

藏山羊瓣胃溶菌酶基因 *TGOLyz* 的克隆 及组织表达分析

张 鹏^{1,2}, 江明锋^{1,2}, 马晓瑞³, 方 毅⁴, 王 永¹

(1. 青藏高原动物遗传资源保护与利用四川省重点实验室, 四川 成都 610041; 2. 西南民族大学 生命科学与技术学院, 四川 成都 610041; 3. 四川大学 生命科学学院, 四川 成都 610064; 4. 若尔盖畜牧兽医局, 四川 阿坝 624500)

摘要: 基于物种同源性, 应用 PCR 和 RT-PCR 技术, 克隆得到藏山羊瓣胃溶菌酶基因 cDNA 编码序列, 并命名为 *TGOLyz*。应用生物信息学软件对 *TGOLyz* 基因核苷酸序列及预测的蛋白序列进行了分析, 并预测该蛋白的三级结构; 应用 qRT-PCR 技术检测了 *TGOLyz* 在 5 个组织中的定量表达。结果表明, 藏山羊瓣胃溶菌酶基因 *TGOLyz* cDNA 编码区长 444 bp (Accession No. KC558501), 编码 147 个氨基酸, 分子量为 16.29 kDa, 等电点为 6.08。同源性对比显示, *TGOLyz* 与牛胃 1 (Cow stomach 1) 的同源性最高, 达 95.24%, 与牦牛胃 (Yak stomach) 的同源性最低, 仅为 67.61%; 系统进化树显示, 该基因属于 c 型溶菌酶 (c-type lysozyme) 家族; qRT-PCR 分析表明, *TGOLyz* 基因在 5 个组织中均有表达, 在瓣胃中表达量最高。这为进一步深入研究 *TGOLyz* 的抗菌及消化功能的分子调控机制提供了理论基础。

关键词: 藏山羊; *TGOLyz* 基因; 克隆; 定量表达; 生物信息学

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)03-0035-08

Cloning and Expression Analysis of Omasum Lysozyme Gene (*TGOLyz*) in Tibetan Goat

ZHANG Peng^{1,2}, JIANG Ming-feng^{1,2}, MA Xiao-rui³, FANG Yi⁴, WANG Yong¹

(1. Key Laboratory of Sichuan Province for Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Exploitation, Chengdu 610041, China; 2. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 3. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 4. Ruoergai Country Bureau of Animal Husbandry and Veterinary, Aba 624500, China)

Abstract: Based on species homology, the lysozyme cDNA was cloned from omasum in Tibetan goat by PCR and RT-PCR, and named *TGOLyz* gene. The sequence of nucleotides and deduced amino acids of *TGOLyz* was analyzed through bioinformatics methods, and the gene expression levels at five tissues of Tibetan goat were detected through qRT-PCR. The result showed that the coding region of the *TGOLyz* cDNA was 444 bp, and encoded 147 amino acids with a molecular weight of 16.29 kDa and isoelectric point of 6.08. The deduced amino acids sequence of *TGOLyz* shared 95.24% homologies with that from cow stomach 1 and had 67.61% homologies with that from yak stomach. The phylogenetic analysis showed that the *TGOLyz* gene belongs to c-type lysozyme. Real-time quantitative PCR assay demonstrated that the *TGOLyz* could be detected in all 5 tissues with the highest expression level observed in omasum. All these would establish a foundation for *TGOLyz* of its molecular mechanism of antibacterial and digestive function.

Key words: Tibetan goat; *TGOLyz* gene; Clone; qRT-PCR; Bioinformatics

反刍动物的胃包括瘤、网、瓣、皱等 4 个部分, 具有特殊的反刍消化方式, 能有效提高食物的利用率。

溶菌酶 (Lysozyme, LYZ) 是一类酶的统称, 能水解细菌细胞壁中的肽聚糖, 作用位点为 N-乙酰葡萄糖胺

收稿日期: 2013-03-09

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012BAD13B06); 四川省科技创新产业链示范工程重大项目 (2011NZ0003)

作者简介: 张 鹏 (1988-), 男, 山东济宁人, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

通讯作者: 王 永 (1962-), 男, 四川仁寿人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种研究。

和 N-乙酰胞壁酸之间的 β -1,4 糖苷键,从而导致细胞裂解^[1],具有消化分解细菌、抑制病原微生物生长、增强机体免疫力的作用。

1922 年,英国细菌学家 Fleming^[2] 首次在人的唾液和眼泪中发现了一种能明显溶解细菌细胞壁的酶,并将其命名为溶菌酶。1965 年,Blake 等^[3] 用 X 衍射法对鸡蛋清溶菌酶(Hen egg-white lysozyme)进行了结构分析,首次弄清了溶菌酶的三维结构。根据溶菌酶的来源,可将溶菌酶分为 4 种类型,即:噬菌体 T4 溶菌酶、微生物溶菌酶、植物源溶菌酶和动物源溶菌酶^[4];其中动物源溶菌酶是数量最多、分布最广,也是目前研究最广、最透彻的溶菌酶,包括 c 型(Chicken-type)、g 型(Goose-type)和 i 型(Invertebrate-type)溶菌酶^[5]。反刍动物溶菌酶大都属于 c 型溶菌酶。近年来,研究人员陆续在节肢动物大劣按蚊^[6]、虾^[7-8]、环节动物蚯蚓^[9]、软体动物日本扇贝^[10]、皱纹盘鲍^[11]、亚洲硬文蛤^[12]、鱼类大菱鲆^[13]、石斑鱼^[14]、条石鲷^[15]、塞内加尔鲷^[16]、半滑舌鲷^[17]、鸟类鹌鹑^[18]、埃及雁^[19]、日本鹌鹑^[20]和哺乳动物牛^[21-22]、牦牛^[23]等动物体内分离克隆到 lysozyme 基因。

藏山羊(Tibetan goat)主要分布在高海拔、酷寒、低氧的青藏高原地区,具有特殊的环境适应能力和研究价值,但目前对其研究甚少。目前虽然山羊基因组图谱已公布,但 NCBI 数据库中仅登录了部分反刍动物 lysozyme 基因序列,对藏山羊瓣胃溶菌酶(Tibetan goat omasum lysozyme, TGOLyz)基因的克隆表达分析及功能研究尚未见报道。

表 1 TGOLyz 基因扩增所用引物序列

Tab. 1 Sequences of specific primers used to amplify the TGOLyz gene

引物名称 Primer	引物序列 Sequence(5'→3')	引物设计模板 Template source for primer design	GenBank 登记号 GenBank accession No.
30794293F	ATGAAGGCTCTCGTTATTCTG	Bos taurus lysozyme C-2 mRNA	NM180999
30794293R	TTACAGGGTGCAACCCTCAAC		
387903F	ATGAAGGCTCTCCTTATTCTG	Bos taurus lysozyme 14D mRNA	L23756
387903R	TTACACTCCGCAACCCTTAAC		
387904F	ATGAAGGCTCTCCTCATTCTGG	Bos taurus lysozyme 5A mRNA	L23757
387904R	TTACACTCCACAACCCTGAATG		
163316F	ATGAAGGCTCTCGTTATTCTGGG	Bovine lysozyme c isozyme 2b mRNA	M26243
163316R	TTACAGGGTGCAACCCTCAAC		
163312F	ATGAAGGCTCTCATTATTCTGGG	Bovine lysozyme c isozyme 1b mRNA	M26246
163312R	TTACAGCGTGCAACCCTCAAC		

注:引物 163316F 和 163316R 成功扩增得到 TGOLyz 基因。

Note: The gene-specific primers 163316F and 163316R were used to obtain the TGOLyz gene successfully.

1.3 TGOLyz 基因克隆

基于物种亲缘关系,参照与山羊同属牛科(Bovidae)的牛的溶菌酶序列作为模板设计 5 对特异性引物(表 1),以 cDNA 为模板分别进行 PCR 扩增,反

本研究以藏山羊为研究对象,首次克隆得到与抗菌、消化密切相关的 TGOLyz 基因,分析该基因及蛋白的结构特征并检测该基因在藏山羊不同组织中的表达规律,为今后进一步研究 TGOLyz 的功能及作用机制提供基础,同时为开发应用溶菌酶资源奠定理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以四川若尔盖山羊种羊场饲养的藏山羊为试验材料,于 2011 年 10 月 31 日活体采集 3 只 8 月龄藏山羊的瓣胃、肾、肺、脾、气管组织(2 g/只),立即用经 DEPC 处理的 ddH₂O 冲洗干净,放入 2 mL 冻存管中,做好标记后立即投入液氮罐中保存。

RNA 提取试剂 Trizol reagent 购自 Invitrogen 公司;反转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis 购自 Fermentas 公司;Taq 聚合酶、DNA Marker、pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司;DNA 胶回收试剂盒 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 购自 Axygen 公司;荧光定量试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II 购自 Bio-Rad 公司;E. coli DH5α 菌株由青藏高原动物遗传资源保护与利用四川省重点实验室保存。

1.2 总 RNA 的提取及反转录

参照 Trizol 说明书对瓣胃、肾、肺、脾、气管组织进行 RNA 提取,并用 ddH₂O (RNase free) 溶解 RNA,分别测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值,计算 RNA 浓度和纯度;参照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis 说明书合成第一链 cDNA, -80 °C 保存备用。

应程序为:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收。回收产物与 pMD19-T 载体于 16 °C 连接 1 h

后将连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,进行 Amp 抗性筛选和蓝白斑筛选,挑取 10 个阳性单克隆进行培养,将 PCR 鉴定正确的单克隆送上海生工生物技术有限公司测序。

1.4 实时荧光定量 PCR 分析

以藏山羊瓣胃、肾、肺、脾、气管组织样品总 RNA 反转录产物 cDNA 为模板,使用 Bio-Rad CFX 96 定量 PCR 仪进行实时荧光定量分析。根据藏山羊 *TGOLyz* 基因序列设计定量引物(RT-F: 5'-GCC TTTCTGTGCTGTCCA-3', RT-R: 5'-CATCCAGTCCG AGTTTCTTC-3'),以 *GAPDH* 作为内参基因,并设计引物(*GAPDH*-F: 5'-GCAAGTTCCACGGCACAG-3', *GAPDH*-R: 5'-TCAGCACCAGCATCACCC-3')。PCR 反应体系为: SYBR Green Supermix 5 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O 2 μ L; 每个样品设 3 个重复。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 60 s, 40 个循环,采集信号作融解曲线分析。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法和 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。

1.5 藏山羊 *TGOLyz* 基因和蛋白的生物信息学分析

应用 Mega 5.0、DNAMAN 6.0 进行 *TGOLyz* 核苷酸序列分析、氨基酸同源性比对、构建系统进化

树;应用 SignalP 4.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对蛋白进行信号肽预测;应用 TMpred(http://www.ch.embnet.org/software/TM-PRED_form.html)对蛋白进行跨膜分析;应用 Net-NGLyc 1.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)进行 N 糖基化位点分析;应用 NetOGlyc 3.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>)进行 O 糖基化位点分析;应用 EXPASY(<http://www.expasy.org/prosite>)分析蛋白结构功能域;应用 EBI 数据库(<http://www.ebi.ac.uk/pdb-sum/>)分析蛋白的二级结构;应用 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org>)分析蛋白的三级结构。

2 结果与分析

2.1 藏山羊 *TGOLyz* 基因 RT-PCR 扩增

以 RNA 为模板,经逆转录后得到 cDNA,利用表 1 中的 5 对特异性引物扩增藏山羊 *TGOLyz* 基因,结果显示,引物 163316F、163316R 成功扩增得到 *TGOLyz* 基因。测序结果表明,*TGOLyz* cDNA 编码区长 444 bp(图 1),登录 GenBank(Accession No. KC558501)。

```

1 ATG AAG GCT CTC GTT ATT CTG GGG GTT CTC TGC CTC TGT GTT GCT GTC CAG GGC AAG GTC TTT GAG
1 M K A L V I L G L L C L S V A V Q G K V F E
67 AGA TGT GAG CTT GCC AGA ACT CTG AAG AAA CTC GGA CTG GAT GAC TAT AAG GGA GTC AGC CTG GCA
23 R C E L A R T L K K L G L D D Y K G V S L A
133 AAC TGG TTG TGT TTG ACC AAA TGG GAA AGC GGT TAT AAC ACA AAA GCT ACA AAC TAC AAT CCT GGC
45 N W L C L T K W E S G Y N T K A T N Y N P G
199 AGT GAA AGC ACC GAT TAT GGG ATA TTT CAG ATC AAC AGC AAG TGG TGG TGT AAT GAT GGC AAA ACC
67 S E S T D Y G I F Q I N S K W W C N D G K T
265 CCT GAC GCA GTT GAC GGC TGT CAT GTG TCC TGC AGC GAA TTA ATG GAA AAT GAC ATC GAA AAA GCT
89 P D A V D G C H V S C S E L M E N D I E K A
334 GTA GCA TGT GCA AAG CAC ATT GTC AGT GAG CAA GGC ATT ACA GCA TGG GTG GCA TGG AAA AGT CAT
111 V A C A K H I V S E Q G I T A W V A W K S H
400 TGT CGA GAC CAT GAC GTC AGC AGT TAT GTT GAG GGT TGC ACC CTG TAA
133 C R D H D V S S Y V E G C T L *

```

方框内分别表示起始密码子和终止密码子;粗体下划线表示催化活性位点 Glu53 和 Asp71;粗体表示保守位点;阴影部分为预测的信号肽。

The start codon (ATG) and the stop codon (TAA) are indicated by boxes; The catalytic residues (Glu53, Asp71) are indicated by underlined bold letters; The conserved cysteine residues are in bold letters; The putative signal peptide is indicated by gray shade.

图 1 藏山羊 *TGOLyz* cDNA 序列及氨基酸序列分析

Fig. 1 The analysis of cDNA and deduced amino acid sequences of *TGOLyz* in Tibetan goat

2.2 藏山羊 *TGOLyz* 蛋白性质及结构分析

用 DNAMAN 6.0 分析得知,*TGOLyz* cDNA 编码 147 个氨基酸(图 1),预测蛋白分子量为 16.29 kDa,等电点 pI=6.08。N 端包含一段由 18 个氨基酸残基组成的信号肽。跨膜分析表明,按膜的取向,

由内向外($i \rightarrow o$)有 1 个显著的跨膜螺旋(strong, score 1491),由外向内($o \rightarrow i$)也有 1 个显著的跨膜螺旋(strong, score 1521)(图 2)。卷曲螺旋分析表明,*TGOLyz* 蛋白存在一个明显的卷曲螺旋结构,位于 99~121 aa 处(图 3)。有 3 个明显的疏水区域

(1~18 aa, 40~49 aa 和 109~116 aa 处), 大多数氨基酸都是亲水的, 按分值大小划分其疏水最大值为 3.33, 分别位于第 6 aa 和 7 aa 处, 最小值为 -2.56, 位于第 134 aa 处(图 4)。TGOLyz 蛋白不存在 N 糖基化位点, 但有一个 O 糖基化位点, 位于 146 aa 处(Potential 值 > Threshold 值)(图 5-A、5-B)。应用 EXPASY 分析藏山羊 TGOLyz 蛋白具有生物学意义的位点、模式和轮廓, 发现该蛋白在第 95~113 aa 处有一个 c 型溶菌酶(Lysozyme c)蛋白活性功能区(图 6)。

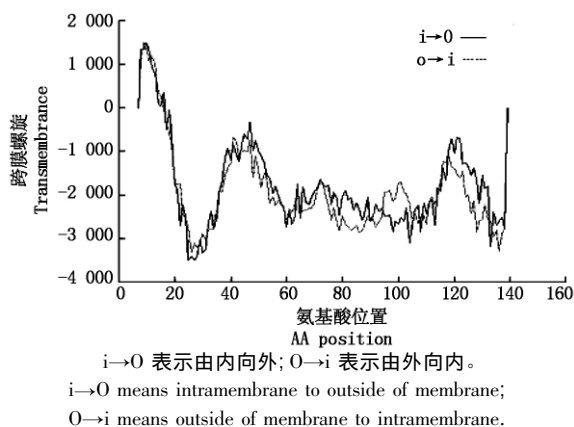


图 2 藏山羊 TGOLyz 蛋白跨膜螺旋分析
Fig. 2 The analysis of the protein transmembrane of TGOLyz in Tibetan goat

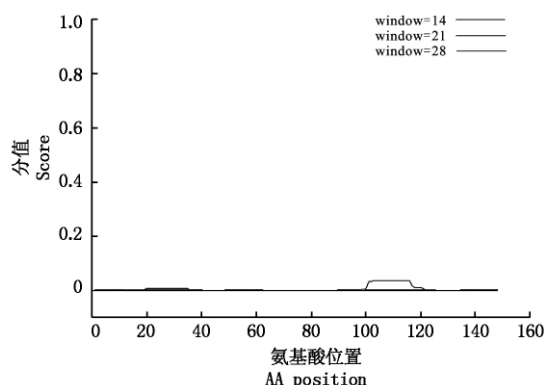


图 3 藏山羊 TGOLyz 蛋白卷曲螺旋预测
Fig. 3 The prediction of the coiled-coil of TGOLyz in Tibetan goat

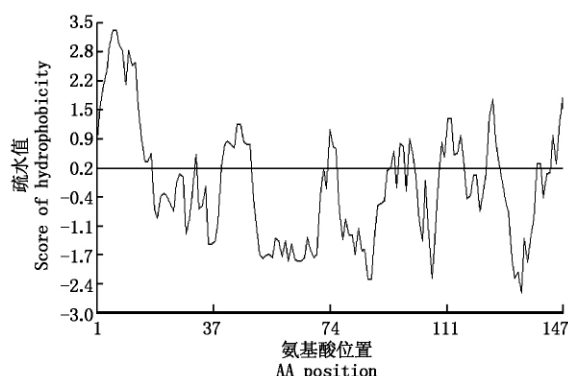


图 4 藏山羊 TGOLyz 蛋白疏水性分析
Fig. 4 The analysis of the hydrophobicity of TGOLyz protein in Tibetan goat

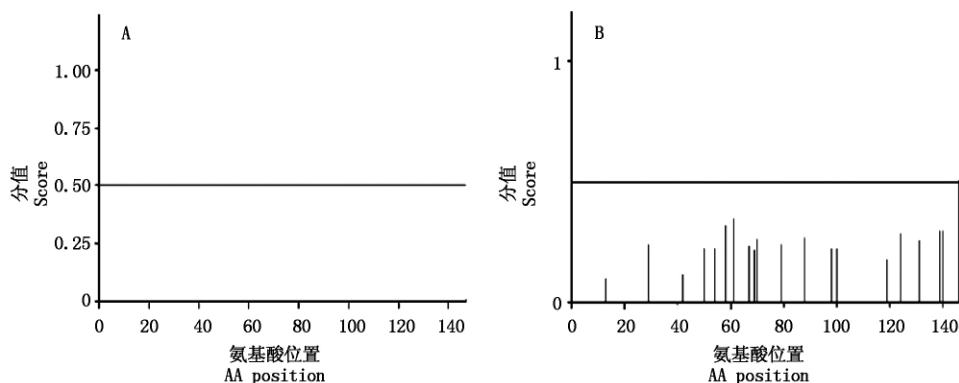


图 5 藏山羊 TGOLyz 蛋白糖基化位点分析
Fig. 5 Analysis of glycosylation sites of TGOLyz protein in Tibetan goat



图 6 藏山羊 TGOLyz 蛋白功能域分析
Fig. 6 The analysis of the functional domain of TGOLyz protein in Tibetan goat

2.3 藏山羊 TGOLyz 蛋白高级结构分析

应用 EBI 数据库分析藏山羊 TGOLyz 蛋白的二级结构, 结果表明, 该蛋白属于一种混合型蛋白, 包含 7 个 α 螺旋、1 个 β 折叠、14 个 β 转角、2 个 β 发卡, 2 个催化活性位点(Glu 53 和 Asp 71)和 4 个二硫键(图 7)。利用同源建模, 从 SWISS-MODEL 中

选取 1 个和 TGOLyz 蛋白相似性达 96.12% 的晶体结构 2z2fa 作为模型, 构建了 TGOLyz 蛋白的三级结构模型(图 8)。

2.4 TGOLyz 蛋白同源性分析

将 DNAMAN 6.0 翻译 TGOLyz 所得的氨基酸序列与 GenBank 中其他反刍动物溶菌酶的氨基酸序列进行对比, 结果表明, TGOLyz 与牛胃 1(Cow stomach 1)的同源性最高, 达 95.24%, 与牦牛胃的同源性最低, 为 67.61%(图 9)。将 TGOLyz 氨基酸序列与 GenBank 中其他 c 型、i 型、g 型动物源溶菌酶序

列进行系统进化分析,并用 Mega 5.0 构建进化树(图 10) 结果表明 *TGOLyz* 蛋白先与牛胃溶菌酶聚为一类,再与孟加拉黑山羊血液溶菌酶聚为一类;从

图中可以直观看出 *TGOLyz* 与其他动物 c 型溶菌酶聚为一类,这说明 *TGOLyz* 属于 c 型溶菌酶家族(c-type lysozyme)。

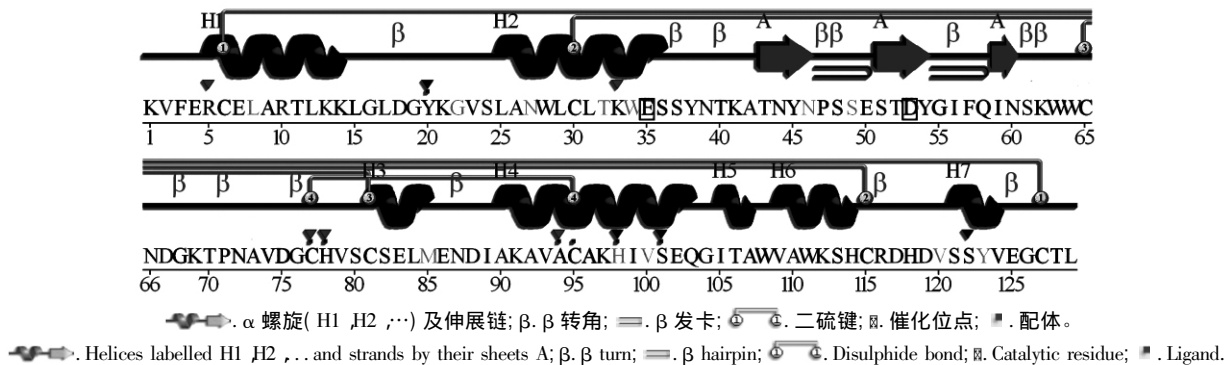


Fig. 7 The analysis of the secondary structure model of *TGOLyz* in Tibetan goat



图 8 藏山羊 *TGOLyz* 蛋白三级结构预测
Fig. 8 The predicted tertiary structure of *TGOLyz* protein in Tibetan goat

胃、气管、肾、肺、脾中的表达情况。结果表明 *TGOLyz* 基因在 5 种组织中都有表达,瓣胃中表达最强,其次是气管、肾、肺,在脾中表达量最低(图 11)。

3 讨论

溶菌酶作为生物体内重要的非特异性免疫因子,同时自身也是一种活性蛋白,具有与抗生素不同的抗菌机制,在抑杀病原体的同时不易产生抗药性,在动物组织中广泛分布^[24]。

本研究为国内外首次克隆得到藏山羊 *TGOLyz*

2.5 *TGOLyz* 基因在不同组织中的表达分析

应用 qRT-PCR 方法检测了 *TGOLyz* 在藏山羊瓣

孟加拉黑山羊血液			
Black Bengal Capra Hircus blood	MKALILILGLLLLSVAVQGRKFERCELARTLKKRFGMDGFRGISLANWMCIA	50	
牛乳 Cow Milk			
牛乳 Cow Milk	MKALILIVGLLLLSVAVQGRKFERCELARTLKKKLGIDGYRGVSLANWVCIA	50	
牛胃1 Cow stomach 1			
牛胃1 Cow stomach 1	MKALILILGLFLLLSVAVQGRKFERCELARTLKKKLGIDGYRGVSLANWICIT	50	
牛胃2 Cow stomach 2			
牛胃2 Cow stomach 2	MKALILILGLFLLLSVAVQGRKFERCELARTLKKKLGIDGYRGVSLANWICIT	50	
牛胃3 Cow stomach 3			
牛胃3 Cow stomach 3	MKALILILGLFLLLSVAVQGRKFERCELARTLKKKLGIDGYRGVSLANWICIT	50	
藏山羊瓣胃			
Tibetan Goat Omasum	MKALILILGLLLLSVAVQGRKFERCELARTLKKKLGIDGYRGVSLANWICIT	50	
牦牛胃 Yak Stomach			
牦牛胃 Yak Stomach	MKALILILGLLLLSVAVQGRKFERCELARTLKKKLGIDGYRGVSLANWVCIA	50	
孟加拉黑山羊血液			
Black Bengal Capra Hircus blood	RWESSYNTQATNYPNPSSESTDYGIFQINSRWCNDGKTEGAVNACHIPCS	100	
牛乳 Cow Milk			
牛乳 Cow Milk	RWESSYNTRASNYPNPSSESTDYGIFQINSRWCNDGKTEGAVNACHIPCS	100	
牛胃1 Cow stomach 1			
牛胃1 Cow stomach 1	RWESSYNTRASNYPNPSSESTDYGIFQINSRWCNDGKTEGAVNACHIPCS	100	
牛胃2 Cow stomach 2			
牛胃2 Cow stomach 2	RWESSYNTRASNYPNPSSESTDYGIFQINSRWCNDGKTEGAVNACHIPCS	100	
牛胃3 Cow stomach 3			
牛胃3 Cow stomach 3	RWESSYNTRASNYPNPSSESTDYGIFQINSRWCNDGKTEGAVNACHIPCS	100	
藏山羊瓣胃			
Tibetan Goat Omasum	RWESSYNTRASNYPNPSSESTDYGIFQINSRWCNDGKTEGAVNACHIPCS	100	
牦牛胃 Yak Stomach			
牦牛胃 Yak Stomach	RWESSYNTRASNYPNPSSESTDYGIFQINSRWCNDGKTEGAVNACHIPCS	100	
孟加拉黑山羊血液			
Black Bengal Capra Hircus blood	ALLQDDITQAVACAKRVVSDPQGITAWVAWRSHQONQDLTSYIQGGCV	148	
牛乳 Cow Milk			
牛乳 Cow Milk	ALLKDDITQAVACAKRVVSDPQGITAWVAWRNKQONRDLRSYVQGCORV	148	
牛胃1 Cow stomach 1			
牛胃1 Cow stomach 1	ELMENDIAKAVACAKHIVSE.QGITAWVAWKSHCRDHDVSSSYVEGCTL	147	
牛胃2 Cow stomach 2			
牛胃2 Cow stomach 2	ELMENDIAKAVACAKHIVSE.QGITAWVAWKSHCRDHDVSSSYVEGCTL	147	
牛胃3 Cow stomach 3			
牛胃3 Cow stomach 3	ELMENDIAKAVACAKHIVSE.QGITAWVAWKSHCRDHDVSSSYVEGCTL	147	
藏山羊瓣胃			
Tibetan Goat Omasum	ELMENDIEKAVACAKHIVSE.QGITAWVAWKSHCRDHDVSSSYVEGCTL	147	
牦牛胃 Yak Stomach			
牦牛胃 Yak Stomach	ALLKDDITQAVACAKRVVSDPQGITAWVAWRKKVSKP..RS.QELC..	143	

氨基酸序列(登录号): 孟加拉黑山羊血液(ACX 50258), 牛乳(AAT 92538), 牛胃 1(AAC 37310), 牛胃 2(AAC 37311), 牛胃 3(AAC 37312), 牦牛胃(ACJ 03829); 阴影代表相同的氨基酸残基, 颜色越深表示同源性越高; ★代表催化活性位点 E53 和 D71; △代表保守的半胱氨酸残基; 点代表该位点存在氨基酸缺失。

Amino acid sequences (GenBank Accession No.): Black Bengal capra hircus blood (ACX 50258), Cow milk (AAT 92538), Cow stomach 1 (AAC 37310), Cow stomach 2 (AAC 37311), Cow stomach 3 (AAC 37312) and Yak stomach (ACJ 03829); Similar residues are shaded and the darker color denotes higher homology of amino acid residues; ★. Catalytic residues E53 and D71 are marked with an asterisk; △. The conserved cysteine residues are marked with a white triangle; The points denotes amino acid deletion.

图 9 *TGOLyz* 与其他反刍动物 c 型溶菌酶的氨基酸序列比对及二级结构分析
Fig. 9 Alignment and second structure analysis of amino acid sequences of *TGOLyz* with c-type lysozymes from other ruminant animals

cDNA 编码序列,对其蛋白序列分析可知,TGOLyz 含有 3 个精氨酸残基,它们对在富含酸和蛋白酶的胃中维持蛋白稳定非常重要^[22-23];TGOLyz 蛋白存在 3 个显著的疏水区 2 个跨膜螺旋,含有一个信号肽,这与其在胃中发挥的生物学功能是一致的。TGOLyz 蛋白在第 95~113 aa 处具有一个 c 型溶菌酶(Lysozyme C)蛋白活性功能区,可能与其抗菌、消

化功能有关。Jiang 等^[23]研究表明,牦牛胃溶菌酶蛋白结构中含有 Glu53 和 Asp71 这 2 个催化活性位点,并证明牦牛重组胃溶菌酶蛋白对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)有抑菌活性。对 TGOLyz 蛋白序列分析发现,TGOLyz 蛋白结构中也含有这 2 个催化活性位点,表明 TGOLyz 蛋白有潜在的生物学活性,为下一步研究提供了理论依据。



图 10 TGOLyz 同其他 c 型、i 型及 g 型动物源溶菌酶的系统进化分析

Fig. 10 Phylogentic analysis of the TGOLyz protein with other c-, i- and g-types animal-borne lysozymes

进化分析表明,TGOLyz 蛋白与牛胃溶菌酶亲缘关系较近,其次是孟加拉黑山羊血液溶菌酶;分析还表明,TGOLyz 与其他动物 c 型溶菌酶聚为一类,且与 g 型、i 型溶菌酶有较远的亲缘距离,这说明 TGO-Lyz 属于 c 型溶菌酶(c-type lysozyme)。另外,亲缘关系较近的物种的溶菌酶也分别聚为一类,这也在蛋白水平佐证了动物分类学的可靠性。

TGOLyz 在藏山羊瓣胃、气管、肾、肺、脾中都有表达,这可能是由于 TGOLyz 是一种分泌蛋白,具有广泛的表达谱^[25],在藏山羊不同组织中存在基础性表达,这也符合 TGOLyz 含有一段信号肽的事实;另一方面,TGOLyz 在藏山羊瓣胃中表达量最高,其次气管、肾、肺,在脾中表达量最低,TGOLyz 在藏山羊不同组织中表达水平存在差异,可能与 TGOLyz 基

因在不同组织的功能作用有关。需要特别指出的是, *TGOLyz* 在瓣胃中表达量最高, 这可能与 *TGOLyz* 在胃中的消化功能有关。反刍动物具有瘤、网、瓣、皱 4 个胃, 具有特殊的反刍消化方式, 胃内含有大量微生物帮助其消化食物, 溶菌酶的作用之一就是消化分解细菌, 并吸收微生物分解后的组分作为自身的营养成分。

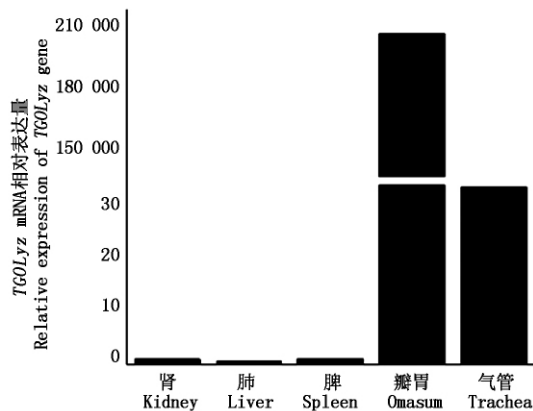


图 11 *TGOLyz* 基因 mRNA 在不同组织中的相对表达量

Fig. 11 Relative expression of *TGOLyz* gene in various tissues in Tibetan goat

本研究为国内外首次从藏山羊瓣胃中克隆得到溶菌酶 *TGOLyz* 基因, 对 *TGOLyz* 基因核苷酸序列及预测的蛋白序列进行了分析, 并对 *TGOLyz* 基因的组织定量表达进行了分析, 这为进一步研究 *TGOLyz* 的酶学性质和功能奠定了基础, 为开发应用溶菌酶资源提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Jolles P. Lysozymes: model enzymes in biochemistry and biology [M]. Berlin: Birkhäuser, 1996: 9–31.
- [2] Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions [J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 1922, 93: 306–317.
- [3] Blake C C, Koenig D F, Mair G A *et al.* Structure of hen egg-white lysozyme: a three-dimensional fourier synthesis at 2 Å resolution [J]. Nature, 1965, 206(986): 757–761.
- [4] Gavilanes J G, Menéndez-Arias L, Rodríguez R. Comparative study on the secondary structure of lysozymes from different sources [J]. Comp Biochem Physiol B, 1984, 77: 83–88.
- [5] Callewaert L, Michiels C W. Lysozymes in the animal kingdom [J]. J Biosci, 2010, 35: 127–160.
- [6] Lapcharoen P, Komalamisra N, Rongsriyam Y *et al.* Investigations on the role of a lysozyme from the malaria vector *Anopheles dirus* during malaria parasite development [J]. Dev Comp Immunol, 2012, 36(1): 104–111.
- [7] Kaizu A, Fagutao F F, Kondo H *et al.* Functional analysis of c-type lysozyme in penaeid shrimp [J]. J Biol Chem, 2011, 286(52): 44344–44349.
- [8] Peregrino-Uriarte A B, Muhlia-Almazan A T, Arvizu-Flores A A *et al.* Shrimp invertebrate lysozyme i-lyz: gene structure, molecular model and response of c and i lysozymes to lipopolysaccharide (LPS) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 32(1): 230–236.
- [9] Fiolka M J, Zagaja M P, Hulas-Stasiak M *et al.* Activity and immunodetection of lysozyme in earthworm *Dendrobaena veneta* (Annelida) [J]. J Invertebr Pathol, 2012, 109(1): 83–90.
- [10] He C, Yu H, Liu W *et al.* A goose-type lysozyme gene in Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*): cDNA cloning, mRNA expression and promoter sequence analysis [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2012, 162(1–3): 34–43.
- [11] Ding J, Li J, Bao Y *et al.* Molecular characterization of a mollusk chicken-type lysozyme gene from *Haliotis discus hannai* Ino and the antimicrobial activity of its recombinant protein [J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(1): 163–172.
- [12] Yue X, Liu B, Xue Q. An i-type lysozyme from the Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* potentially functioning in host immunity [J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(2): 550–558.
- [13] Zhao L, Sun J S, Sun L. The g-type lysozyme of *Scophthalmus maximus* has a broad substrate spectrum and is involved in the immune response against bacterial infection [J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(2): 630–637.
- [14] Harikrishnan R, Kim J S, Kim M C *et al.* Molecular characterization, phylogeny and expression pattern of c-type lysozyme in kelp grouper *Epinephelus bruneus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 31(4): 588–594.
- [15] Whang I, Lee Y, Lee S *et al.* Characterization and expression analysis of a goose-type lysozyme from the rock bream *Oplegnathus fasciatus*, and antimicrobial activity of its recombinant protein [J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(2): 532–542.
- [16] Ponce M, Salas-Leiton E, Garcia-Cegarra A *et al.* Genomic characterization, phylogeny and gene regulation of g-type lysozyme in sole (*Solea senegalensis*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 31(6): 925–937.
- [17] Sha Z X, Wang Q L, Liu Y *et al.* Identification and expression analysis of goose-type lysozyme in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 32(5): 914–921.
- [18] Maehashi K, Matano M, Irisawa T *et al.* Molecular characterization of goose- and chicken-type lysozymes in emu (*Dromaius novaehollandiae*): Evidence for extremely low

- lysozyme levels in emu egg white [J]. *Gene* 2012 ,492 (1) : 244 – 249.
- [19] Kawamura S ,Toshima G ,Chijiwa Y ,*et al.* Amino acid sequence of Egyptian goose egg-white lysozyme and effects of amino acid substitution on the enzymatic activity [J]. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012 ,76(4) : 691 – 698.
- [20] Lhyam Myint S ,Kinoshita K ,Shimogiri T *et al.* Effect of polymorphism in egg white lysozyme on muramidase and antibacterial activities as well as hatchability in the Japanese quail (*Coturnix japonica*) [J]. *J Anim Sci* 2012 , 90(6) : 1747 – 1755.
- [21] Nonaka Y ,Akieda D ,Aizawa T *et al.* X-ray crystallography and structural stability of digestive lysozyme from cow stomach [J]. *FEBS J* 2009 276(8) : 2192 – 2200.
- [22] Irwin DM. Evolution of cow nonstomach lysozyme genes [J]. *Genome* 2004 47(6) : 1082 – 1090.
- [23] Jiang M ,Chen Y ,Wang Y *et al.* Yak (*Bos Grunniens*) stomach lysozyme: molecular cloning ,expression and its antibacterial activities [J]. *Anim Biotechnol* 2010 ,21 (1) : 25 – 35.
- [24] Irwin D M ,Biegel J M ,Stewart C B. Evolution of the mammalian lysozyme gene family [J]. *BMC Evol Biol* , 2011 ,11: 166.
- [25] Xue Q G ,Itoh N ,Schey K L. A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes [J]. *Cell Mol Life Sci* , 2007 64: 82 – 95.

《华北农学报》征订启事

《华北农学报》1986 年创刊 ,由河北、北京、天津、河南、山西、内蒙古自治区六省市农科院及农学会联合主办 ,为全国首家跨省、市、区多单位联办的农业学术刊物。本刊立足华北 ,面向全国和全世界。主要刊载农业各学科的学术论文、研究报告以及科研简报 ,报道农业学术动态。主要服务于农业高等院校师生和农业科研机构的研究人员。

《华北农学报》为中国科学引文数据库核心期刊(CSCD 核心库) 、中国科技核心期刊、中文核心期刊、RCCSE 中国权威学术期刊和中国农业核心期刊。2011 年《华北农学报》影响因子达到 2.086 ,被引频次 4682 次 ,学科排名全国第 1 位 ,成为全国有代表性的农业学术刊物。同时,《华北农学报》多次荣获国家级及省级奖励: 全国优秀科技期刊评比三等奖、全国优秀农业期刊学术类一等奖、首届“北方十佳期刊奖”、“河北省十佳期刊奖”、“河北省荣誉期刊”及“河北省优秀期刊奖”等奖项; 2011 年被评选为“中国精品科技期刊”。

《华北农学报》国内外公开发行 ,国内统一刊号: CN13 – 1101 /S ,国际刊号 ISSN1000 – 7091。双月刊 ,双月 28 日出版 ,国际标准大 16 开本 ,240 页 ,每期定价 12 元 ,全年 72.00 元。邮发代号: 18 – 10 ,国外发行代号: 5918。全国各地邮局均可订阅。可随时汇款到编辑部订阅 ,请写清刊名、份数、收刊人姓名、地址、邮编 ,以免误投或无法投递。

欢迎订阅 ,欢迎投稿!

通信地址: 石家庄市和平西路 598 号《华北农学报》编辑部

邮 编: 050051

电 话: 0311 – 87652166

E-mail: hbnxb@163.com

网 址: <http://www.hbnxb.net/>