

乌蒙乌骨鸡酪氨酸酶基因克隆鉴定与系统发育关系分析

宋兴超, 李新印, 李健, 孟金柱, 吴震洋, 赵园园, 安清明*

(铜仁学院农林工程与规划学院, 贵州省梵净山地区生物多样性保护与利用重点实验室, 贵州铜仁 554300)

摘要: 本研究旨在克隆鉴定乌蒙乌骨鸡酪氨酸酶(*TYR*)基因完整编码区并进行生物信息学分析, 为明确其影响乌骨鸡乌质特性的分子机制提供参考。以乌蒙乌骨鸡血液基因组DNA为模板, 分别在鸡*TYR*基因5'外显子两端设计5对引物, 通过PCR、克隆及测序拼接方法获得*TYR*基因完整编码区序列(Coding DNA Sequence, CDS), 基于生物信息学方法综合分析该基因的结构特征, 利用DNASar 2.0和MEGA 7.0软件分别分析12个鸡形目和6个雁形目*TYR*基因CDS的相似性与系统发育关系。结果表明, 乌蒙乌骨鸡*TYR*基因全长3 686 bp, 包括276 bp 5'UTR、261 bp 3'UTR, 部分内含子1~4长度分别为339、45、355、415 bp, 外显子1~5长度分别为819、217、148、182、224 bp, CDS长度为1 590 bp, 编码529个氨基酸。*TYR*蛋白质分子式为 $C_{2700}H_{4071}N_{739}O_{784}S_{29}$, 分子质量为60.36 kD, 总原子数为8 323, 理论等电点(PI)为6.03, 属于不稳定亲水性蛋白。乌蒙乌骨鸡*TYR*蛋白存在1个信号肽模块、1个酪氨酸酶基因家族核心结构域、1个表皮生长因子样结构域及1个跨膜螺旋结构域。序列相似性及分子系统发育关系分析均显示乌蒙乌骨鸡与沐川乌骨鸡、白来航鸡和原鸡等原鸡属物种的亲缘关系最近, 与雁形目物种亲缘关系较远。本研究成功克隆获得乌蒙乌骨鸡*TYR*基因CDS全长序列, 编码蛋白包括多个功能结构模块, 研究结果可为乌骨鸡乌质性状分子机理解析及鸡形目物种进化探究提供理论依据。

关键词: 乌蒙乌骨鸡; *TYR*基因; 编码区; 乌质性状; 系统发育

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20250423-01

乌蒙乌骨鸡作为贵州省特色药食兼用型优良家禽地方品种, 原产地和中心产区为云贵高原黔西北部乌蒙山区, 其喙、肉髯、胫、皮肤和肉均呈乌黑色, 具有一定的食用和药用价值, 目前广大消费者普遍认为深色肤色乌骨鸡营养及药用价值较好^[1]。《本草纲目》记载, 乌骨鸡入药效果与皮及内脏器官的乌度(黑色素沉积的程度)存在关联^[2], 同时在乌骨鸡新品种培育过程中, 乌质性状也是育种者不可忽视的一个关键目标性状, 利用

分子标记辅助选择可以实现早期、高效选择, 显著缩短遗传进展。黑色素沉积主要由遗传因素决定, 涉及多个基因、调节因子及相关信号通路的复杂精密调控, 其中由酪氨酸酶基因(*Tyrosinase*, *TYR*)编码的酪氨酸酶作为黑色素沉积过程中的一种限速酶, 其浓度和活性可影响许多畜禽被毛、羽毛及内脏器官中黑色素的沉积^[3-4]。因此, 在剖析家鸡色素沉积性状分子基础方面, *TYR*基因相关研究已逐渐成为研究热点。在*TYR*基因结构变异方面, Ferguson等^[5]研究表明, 鸡*TYR*基因5'UTR含有2个能够调控黑色素细胞表达的保守模块; Yang等^[6]对不同羽色家鸡*TYR*基因测序表明, 该基因的变异可影响其羽色表型; 祖盘玉等^[7]研究表明*TYR*基因exon 1中C921T突变可能导致泰和乌骨鸡和赤水乌骨鸡乌度不同; 徐志强等^[8]推测武定乌骨鸡*TYR*基因外显子中C2744T突变形成的CC基因型可能会决定其乌质性状的形成。近年来, 随着大数据组学技术的不断更新与快速发展, Yu等^[9-10]通过RNA高通量测序发现,

收稿日期: 2025-04-23; 修回日期: 2025-06-10

资助项目: 贵州省科技厅科技计划项目(黔科合基础-ZK[2022]一般559); 贵州省高层次创新型“千”层次人才培养项目(2024-[2022]-048); 贵州省大学生创新创业训练计划项目(S2024106651920)

作者简介: 宋兴超(1982-), 男, 河北博野人, 博士, 副教授, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: songxingchao_888@126.com

*通信作者: 安清明(1987-), 男, 甘肃白银人, 教授, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: anqingming2009@163.com

肌肉黑色素生成中起重要作用的 *TYR-AS1* 转录变异体在黑色和白色肌肉之间存在极显著差异表达，且沐川乌骨鸡胸肌 *TYR* 基因表达水平极显著高于非乌骨鸡。综上所述，*TYR* 基因可能通过积累黑色素含量及浓度进而调控家禽肤色表型、羽色与乌质性状。在传统选育乌骨鸡新品种过程中，育种者常利用肉眼判定乌度深浅，主观性较强、遗传进展效果不明显且耗时较长，通过现代分子标记辅助选育可加速乌质性状的选育进度，筛选乌骨鸡乌质性状相关的主效基因或分子标记，并在实际选育过程中对该性状开展前期选择，可达到提高乌骨鸡乌度及缩短新品种培育时间的目的。目前，乌质性状关联 *TYR* 基因调控乌蒙乌骨鸡乌度的分子遗传基础尚不明确，仅见乌蒙乌骨鸡 *TYR* 基因启动子区的相关报道^[1]，但是乌蒙乌骨鸡该基因完整编码区序列（Coding DNA Sequence，CDS）尚未鉴定与公布，其重要结构功能模块尚未明确，不能满足后续开展分子标记育种的前提条件。本研究以 *TYR* 基因为突破口，从分子生物学角度克隆鉴定乌蒙乌骨鸡该基因 CDS 及解析其序列结构特征，并探究鸡形目、雁形目物种该基因的系统发育关系，旨在为后续乌骨鸡新品种（配套系）的分子选育、改良及鸡形目物种的进化研究提供生物学数据参考。

1 材料与方法

- 1.1 试验动物与血液采集 选取贵州省六盘水市某鸡场健康成年雌性乌蒙乌骨鸡 10 只，翅静脉采血 5.0 mL，用于基因组 DNA 的提取。
- 1.2 DNA 提取和引物设计 通过动物血液基因组 DNA 提取试剂盒（天根生化科技有限公司）完成乌蒙乌骨鸡血液基因组 DNA 的提取，通过紫外分光光度计和琼脂

糖凝胶电泳检测浓度与纯度，保存于 -20℃。以鸡基因组（登录号：NC_052532.1）1 号染色体 187 752 871~187 810 203 bp 序列为模板，采用 Primer-BLAST 在线软件分别在 *TYR* 基因 5 个外显子两端设计 5 对引物（表 1），由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.3 PCR 扩增与克隆测序 PCR 扩增体系 40 μL：2×SanTaq Fast PCR Mix 预混液（生工生物工程股份有限公司）20 μL，上下游引物（10 pmol/μL）各 1 μL，模板 DNA（80 ng/μL）3 μL，灭菌超纯水 15 μL。PCR 反应程序：94℃预变性 4 min；94℃变性 30 s，退火（温度见表 1）30 s，72℃延伸（时间见表 1），共 36 个循环；72℃延伸 10 min；4℃保存。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测全部 PCR 产物，合格产物送生工生物工程股份有限公司克隆测序。

1.4 *TYR* 基因结构及功能模块分析 采用 ProtParam（<https://web.expasy.org/protparam/>）和 ProtScale 在线软件^[12]（<https://web.expasy.org/protscale/>）分别分析 *TYR* 蛋白的基本理化特性与亲 / 疏水性；通过 BioEdit 7.2 软件统计 *TYR* 基因编码序列氨基酸含量；乌蒙乌骨鸡 *TYR* 蛋白信号肽与跨膜区由 SignalP-5.0 Server^[13]（<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>）和 TMHMM Server 2.0（<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>）完成；采用 SMART（<http://smart.embl.de/>）在线软件^[14]分析 *TYR* 蛋白功能模块；基于功能蛋白相关网络 STRING 在线软件（<https://cn.string-db.org/>）构建乌蒙乌骨鸡 *TYR* 蛋白互作网络。

1.5 鸡形目与雁形目 *TYR* 基因相似性比对与系统进化分析 沐川乌骨鸡（登录号：MG672516）、原鸡（登录号：S81675）、白来航鸡（登录号：AB023291）、火鸡

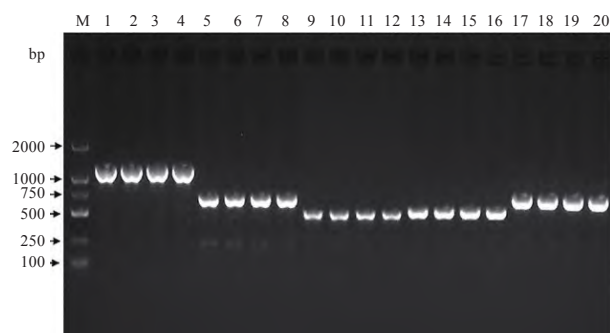
表 1 引物信息

引物	序列（5'→3'）	产物长度 ,bp	退火温度 ,℃	延伸时间 ,s
C-TYR-1	F: TCATTTTGAAACCGTCGGG	1 226	56.9	75
	R: CCAGATAGCGCACCTCACTT			
C-TYR-2	F: CCACAGTAGGGTGATGTTTCT	697	56.9	45
	R: GGATTTAGGGTTTGGTGTAGTC			
C-TYR-3	F: ATTTTCATCTTTGCTATGCCTT	502	55.6	31
	R: TCCAGTGAACGTAAGGACAGT			
C-TYR-4	F: ACTGAAGAAGCTAACCCCAAAC	560	58.2	38
	R: GATGAGAAATGTGAAAACCTTGC			
C-TYR-5	F: ATAGTAAACCCAGTTCCTTCA	701	57.2	45
	R: AAGCCAGTCAGATTCACAGGAG			

(登录号: XM_003203534)、盔珠鸡(登录号: XM_021382303)、环颈雉(登录号: XM_031612426)、日本鹌鹑(登录号: NM_001323239)、小草原松鸡(登录号: XM_052669925)、艾草松鸡(登录号: XM_042839847.1)、岩雷鸟(登录号: XM_048940165)、白尾雷鸟(登录号: XM_042891702)、凤头潜鸭(登录号: XM_032206816.1)、绿头鸭(登录号: XM_005029583)、棕硬尾鸭(登录号: XM_035329184.1)、黑天鹅(登录号: XM_035542570.1)、疣鼻天鹅(登录号: XM_040544288.1)和鸿雁(登录号: XM_013178156) TYR 基因编码区核苷酸及氨基酸序列由 GenBank 数据库获得,通过 DNASTAR 软件分析不同物种 TYR 基因序列相似性;以小家鼠 TYR 基因(登录号: D00440)作为外群,由 ClustalX 1.83 和 MEGA 7.0 软件中 Maximum Parsimony (MP) 方法分析不同物种 TYR 基因的系统进化关系。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增 利用乌蒙乌骨鸡基因组 DNA 作为模板, C-TYR-1、C-TYR-2、C-TYR-3、C-TYR-4 和 C-TYR-5 为引物,经 PCR 扩增得到 5 段特异性产物,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测表明,各条带致密且清晰,并与预期扩增产物大小基本一致(图 1)。



M: DNA 相对分子质量标准;泳道 1~4、5~8、9~12、13~16 和 17~20 分别为引物 C-TYR-1、C-TYR-2、C-TYR-3、C-TYR-4 和 C-TYR-5 的扩增产物。

图 1 乌蒙乌骨鸡 TYR 基因 PCR 扩增结果

2.2 克隆测序与鉴定 5 对引物的克隆测序结果通过拼接,得到长度为 3 686 bp 的核苷酸序列,获得 GenBank 登录号 ON49713458,经过 UCSC 和 NCBI 数据库比对鉴定,获得序列与 UCSC 数据库中的鸡基因组序列 1 号染色体部分区域(Chromosome 1: 189 153 108~189 203 064 bp)一致性为 99.9% (图 2)。通过 NCBI 数据库 BLAST 比对发现,该序列 1~113 bp、1~1226 bp

与 Genbank 数据库中原鸡(登录号: L46805.1)和日本鹌鹑(登录号: AB024279.1) TYR 基因序列中 1 850~3 076 bp 和 1 524~2 637 bp 的一致性分别为 99.67% 和 96.14%,表明扩增产物来源可靠,初步判定本研究获得了乌蒙乌骨鸡 TYR 基因完整编码区。

2.3 TYR 基因序列碱基组成及推导蛋白基本理化特性 参考原鸡等其他物种 TYR 基因编码区序列结构分析表明,乌蒙乌骨鸡该基因包括 5 个外显子,长度分别为 819、217、148、182、224 bp,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA,完整编码区长度为 1 590 bp,碱基 A、C、G、T 含量分别为 27.17%、25.28%、22.01% 和 25.53%,A+T 含量略高于 G+C 含量。推导的乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白由 529 个氨基酸编码,氨基酸种类为 20 种,含量最高的为亮氨酸(Leu),占比 8.9%,色氨酸(Trp)含量最低为 2.3% (图 3)。Prot Param 分析显示,带正电荷的氨基酸残基(Arg+Lys)存在 46 个,占比 11.1%,带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu)存在 53 个,占比 13.9%。乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白分子式为 $C_{2700}H_{4071}N_{739}O_{784}S_{29}$,总原子数达 8 323 个,分子质量、半衰期、理论等电点、不稳定系数和脂溶性指数分别为 60.36 kD、30 h、6.03、56.84 和 72.85,初步推断该蛋白属于不稳定蛋白(系数 <40 表明稳定,系数 >40 表明不稳定)和非脂溶性蛋白(<80)。亲水性总平均值 GRAVY (Grand Average of Hydropathicity) 为 -0.363,推测乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白质存在较强的亲水性。

2.4 TYR 蛋白亲疏水性分析 ProtScale 在线软件分析乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白亲疏水性,结果见图 4,其中分析标准为 Hphob./Kyte & Doolittle,负值表示亲水性,该值越小表明蛋白亲水性越强,正值表示疏水性,该值越大表明蛋白疏水性越强。结果显示,TYR 蛋白平均亲水性指数为 -0.363,属于亲水性蛋白,第 9 位亮氨酸(Leu)最高分值(疏水性最强)为 3.022,第 307 位丝氨酸(Ser)最低分值(亲水性最强)为 -2.944,标度值 <0 的区域比 >0 的区域密集,即 TYR 蛋白的亲水性氨基酸残基数多于疏水性氨基酸,说明乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白为亲水性蛋白。

2.5 信号肽、跨膜区及亚细胞定位 由图 5 可知,乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白第 1~18 个氨基酸具有一段信号肽,剪切位点为 18G~19Q (G 代表甘氨酸,Q 代表谷氨酰胺),属于分泌型蛋白。由图 6 可知,乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白

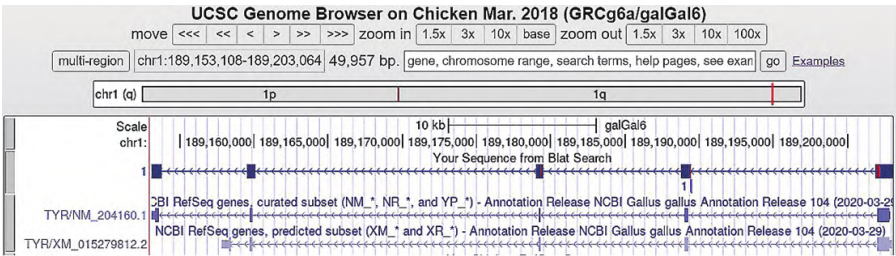
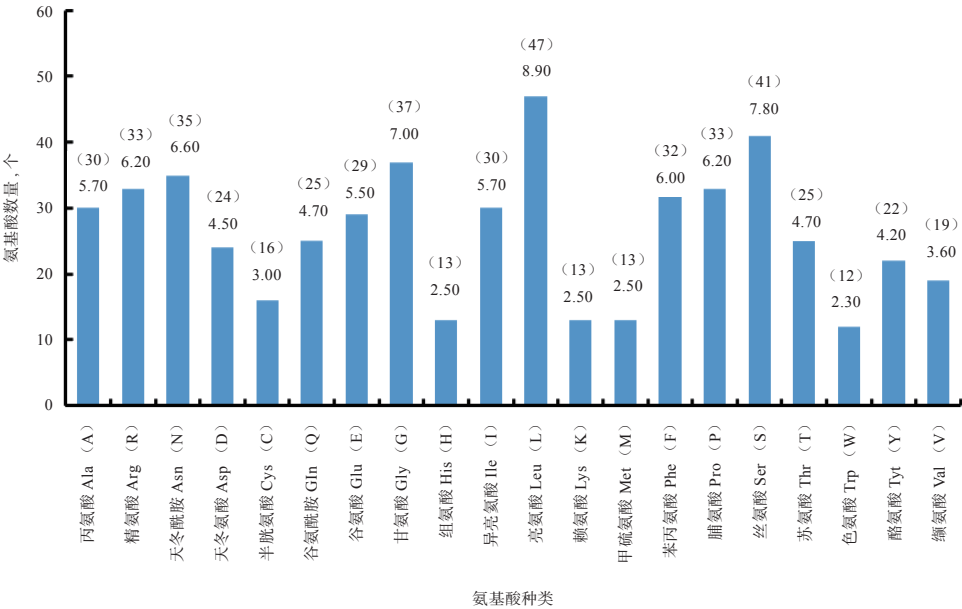


图 2 乌蒙乌骨鸡 TYR 基因序列与 UCSC 数据库比对



柱形上方括号内阿拉伯数字代表每种氨基酸的数量，括号外数字代表每种氨基酸占总氨基酸的比例 (%)。

图 3 乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白氨基酸组成

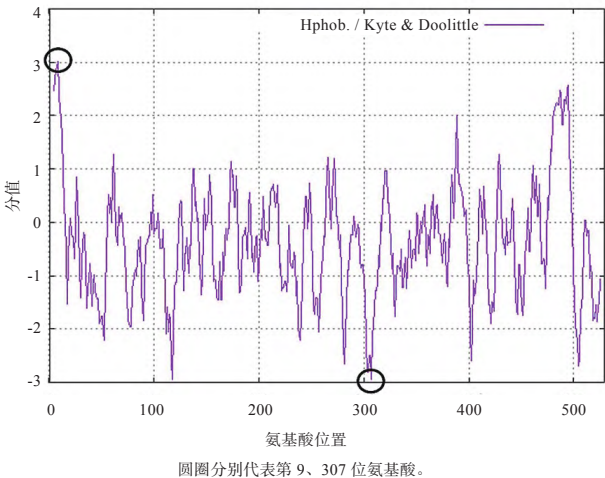


图 4 乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白亲疏水性预测

第 19~476 位氨基酸位于膜外 (Outside)，498~529 位氨基酸位于膜内 (Inside)，477~497 位氨基酸为跨膜螺旋蛋白 (TMhelix)。

2.6 保守结构功能域与蛋白互作网络分析 SMART、NCBI 蛋白保守结构域 CD Search 在线软件预测保守结

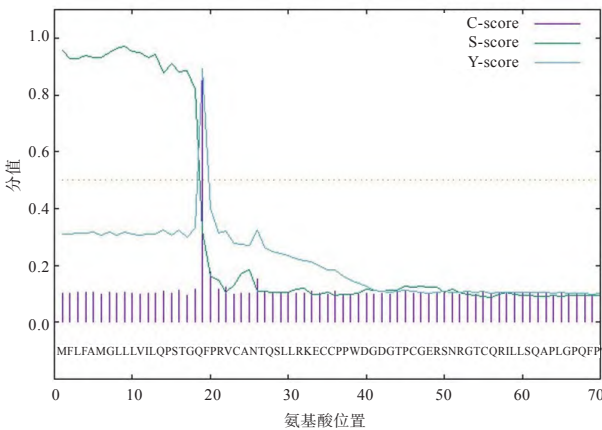


图 5 乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白信号肽分析

构功能域 (图 7) 显示，乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白属于酪氨酸酶超家族 (Tyrosinase Superfamily) 成员，含有 1 个信号肽模块 (Signal Peptide)，1 个表皮生长因子样结构域 (Epidermal Growth Factor-like Domain, EGF)，1 个酪氨酸酶基因家族核心结构模块 (Tyrosinase) 和 1 个跨膜螺旋结构域 (Transmembrane Helix Region)，

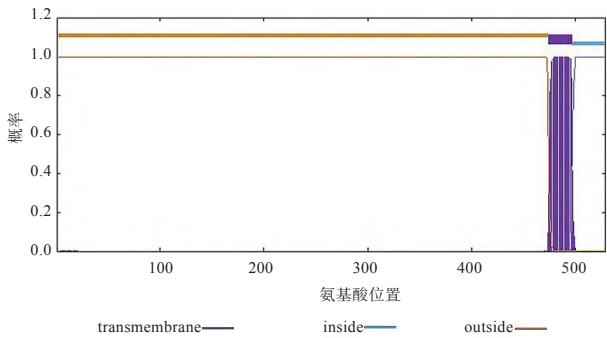


图 6 乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白跨膜结构分析

分别位于 1~18、84~113、170~403 和 474~496 位氨基酸，信号肽模块和跨膜螺旋结构域与 2.5 预测结果相符。Motif Scan 在线程序分析表明，乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白酪氨酸酶基因家族核心结构模块中存在 1 个酪氨酸酶铜 -A 结合区域信号 (Tyrosinase CuA-binding Region Signature, TYROSINASE 1)：202~219 位氨基酸 H...FL...HR...L...E)，1 个酪氨酸酶铜 -B 结合区域信号 (Tyrosinase CuB-binding Region Signature, TYROSINASE 2)：383~394 位氨基酸 (DP...F...H...D)，CuA 和 CuB 结合区域存在 3 个保守的组氨酸残基 (His, H)。

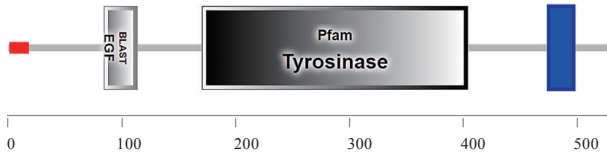


图 7 乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白保守功能模块分析

功能蛋白相关网络 STRING 在线网站分析 (图 8) 表明，与乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白相互作用的关键因子包括小眼畸形相关转录因子 (Microphthalmia-associated Transcription Factor, MITF)、前黑素小体蛋白 (Premelanosome Protein, PMEL)、黑色素瘤抗原蛋白 (Melanoma Antigen Protein, MLANA)、酪氨酸羟化酶 (Tyrosine Hydroxylase, TH)、黑色素细胞膜蛋白 (OCA2 Melanosomal Transmembrane Protein, OCA2)、多巴胺脱羧酶 (Dopa Decarboxylase, DDC)、黑色素细胞刺激激素受体 (Melanocyte-stimulating Hormone Receptor, MC1R)、胺氧化酶 (Amine Oxidase, IL4I1)、苯丙氨酸羟化酶辅助因子 (BH4_AAA_HYDROXYL_2 Domain-containing Protein, THL)、甲状腺过氧化物酶 (Thyroid Peroxidase, TPO)。其中，MITF、PMEL、OCA2 和 MC1R 均为黑色素合成信号通路 (Melanogenesis) 中的重要蛋白，4 种蛋白综合预测互作得分分

别为 0.975、0.957、0.926 和 0.915。

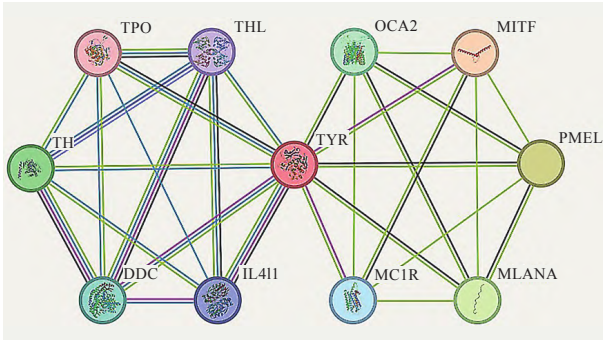


图 8 乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白互作网络分析

2.7 鸡形目与雁形目 TYR 基因相似性与分子系统进化分析 由表 2 可知，乌蒙乌骨鸡与艾草松鸡、白尾雷鸟、岩雷鸟、小草原松鸡、日本鹌鹑、环颈雉、盔珠鸡、火鸡、原鸡、白来航鸡、沐川乌骨鸡等鸡形目物种 TYR 基因编码区核苷酸序列相似性为 95.8%~99.9%，氨基酸序列相似性为 95.8%~100.0%。与疣鼻天鹅、鸿雁、棕硬尾鸭、黑天鹅、凤头潜鸭、绿头野鸭等雁形目物种核苷酸序列相似性为 91.5%~92.0%，氨基酸序列相似性为 92.6%~93.2%。其中，乌蒙乌骨鸡与白来航鸡和沐川乌骨鸡该基因核苷酸和氨基酸序列相似性均最高，分别为 99.9% 和 100.0%，与疣鼻天鹅核苷酸序列相似性最低，为 91.5%，与凤头潜鸭氨基酸相似性最低，为 92.6%，表明 TYR 基因编码区核苷酸和氨基酸序列在鸡形目和雁形目物种个体间保守性较强，差异较低。

为了精准分析鸡形目和雁形目不同物种的进化关系，以小家鼠 TYR 基因编码区氨基酸序列作为外群，采用 Mega 5.0 软件中的最大简约法 (Maximum Parsimony)，构建鸡形目和雁形目共计 18 个物种的系统发育树。结果显示 (图 9)，系统发育树分为 2 枝：鸡形目 (Galliformes) 构成第一支，包括原鸡属、盔珠鸡属、鹌鹑属、火鸡属、雉属、雷鸟属、艾草松鸡属和草原松鸡属；第二支为雁形目 (Anseriformes)，包括潜鸭属、鸭属、硬尾鸭属、雁属和天鹅属，这与物种形态学分类结果一致，表明基于 TYR 基因编码核苷酸序列构建的系统发育树可以较好地反映鸡形目和雁形目物种的进化历程。

3 讨论

TYR 基因属于酪氨酸酶基因家族中的一个重要成员，主要在皮肤、肌肉、内脏等组织的黑色素小体中表达，

表 2 鸡形目和雁形目物种 TYR 基因序列的相似性

物种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1		100.0	99.8	100.0	96.4	97.4	96.8	96.4	97.4	96.6	95.8	96.4	92.6	93.0	93.2	93.2	93.0	93.2
2	99.9		99.8	100.0	96.4	97.4	96.8	96.4	97.4	96.6	95.8	96.4	92.6	93.0	93.2	93.2	93.0	93.2
3	99.7	99.8		99.8	96.2	97.2	96.6	96.2	97.2	96.4	95.7	96.4	92.4	92.8	93.0	93.0	92.8	93.0
4	99.9	99.9	99.7		96.4	97.3	96.8	96.4	97.3	96.6	95.8	96.4	92.6	93.0	93.2	93.2	93.0	93.2
5	96.4	96.5	96.6	96.5		97.2	96.5	96.2	96.6	96.6	96.8	95.8	93.4	93.7	94.6	93.2	93.3	93.5
6	96.3	96.4	95.2	96.3	95.7		96.8	96.2	97.4	97.0	96.4	96.7	93.0	93.4	93.6	93.4	93.4	93.2
7	96.2	96.4	96.4	96.3	97.2	95.2		96.4	97.2	96.8	96.2	95.8	93.0	93.3	93.3	92.4	92.4	92.6
8	96.2	96.4	96.2	96.3	95.7	95.4	95.4		96.4	95.8	95.5	95.7	92.1	92.4	92.4	92.2	91.9	92.1
9	96.2	96.4	96.4	96.3	97.3	95.4	97.5	95.2		98.9	97.7	97.8	93.2	93.7	93.7	92.8	93.1	93.7
10	95.8	96.0	96.0	95.9	97.2	95.0	97.0	95.0	98.9		97.7	97.2	93.0	93.4	93.6	92.8	93.0	93.6
11	96.0	96.1	96.2	96.0	97.4	95.0	97.1	95.1	98.6	98.5		98.2	92.6	93.0	93.8	92.8	93.0	93.8
12	95.9	96.1	96.2	96.0	96.9	95.0	96.7	95.1	98.7	98.4	99.0		91.8	92.3	92.5	92.1	92.3	92.8
13	91.9	92.1	92.0	92.0	92.0	91.9	91.3	91.8	91.3	91.3	91.3	90.5		99.6	97.0	96.6	96.4	96.6
14	92.0	92.1	92.1	92.1	92.1	91.8	91.5	91.7	91.5	91.4	91.3	90.7	99.2		97.4	97.0	96.8	97.0
15	91.6	91.8	91.7	91.7	92.3	91.6	91.3	91.5	91.8	91.6	91.4	90.4	96.7	96.7		97.4	97.6	97.8
16	91.7	91.8	91.8	91.7	91.5	91.5	90.4	91.2	90.9	91.0	90.8	90.2	96.6	96.5	97.2		99.4	98.5
17	91.5	91.6	91.6	91.5	91.6	91.6	90.6	91.4	91.1	91.1	90.8	90.5	96.6	96.4	97.3	99.4		98.7
18	91.6	91.8	91.7	91.7	91.8	91.4	90.8	91.3	91.4	91.3	91.1	90.4	96.7	96.6	97.6	98.7	98.9	

注：对角线上方为氨基酸序列相似性，对角线下方为核苷酸序列相似性。1：乌蒙乌骨鸡；2：沐川乌骨鸡；3：原鸡；4：白来航鸡；5：火鸡；6：盔珠鸡；7：环颈雉；8：日本鹌鹑；9：小草原松鸡；10：艾草松鸡；11：岩雷鸟；12：白尾雷鸟；13：凤头潜鸭；14：绿头鸭；15：棕硬尾鸭；16：黑天鹅；17：疣鼻天鹅；18：鸿雁。



是一个与黑色素合成存在直接关系的限速酶^[15-17]。因此，如能在乌蒙乌骨鸡新品种选育过程中开发出调控其乌度的分子标记对于缩短家禽育种周期及提高产业经济价值具有重要意义。本研究通过克隆测序获得 3 686 bp 乌蒙乌骨鸡 TYR 基因序列，CDS 区序列长 1 590 bp，共编码 529 个氨基酸。在 TYR 基因 CDS 长度方面，人^[18]和原鸡^[19]为 1 590 bp，家兔^[20]、牛^[21]、山羊^[22]和猪^[23]等农业经济动物均为 1 593 bp，而黄颡鱼^[24]、虹鳟^[25]等硬骨鱼类分别为 1 602 bp 和 1 629 bp，说明不同物种

TYR 基因 CDS 长度存在较大差异。蛋白理化特性分析表明，乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白属于酸性不稳定亲水蛋白，与郭跃跃等^[26]、王瑞宁等^[27]和宋兴超等^[28]分别对黑豹 TYRP1 蛋白、赤狐 TYRP2 蛋白和水貂 TYR 蛋白分析的理化特性基本一致，充分表明同属酪氨酸酶基因家族的成员具有相似的理化特性。亲水蛋白由于含有较多的亲水氨基酸残基，倾向于与水分子形成氢键，从而保证蛋白质易于在水中溶解或在水相环境中稳定存在，通常在细胞外或细胞质中发挥生物学功能^[29]。ProtScale

在线软件分析乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白的亲水性氨基酸残基数量多于疏水性氨基酸,从不同角度证明了该蛋白的亲水性物理特性。

本研究表明,乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白 N-端含有一段信号肽,由 18 个氨基酸构成,表明乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白属于一种能够在细胞外发挥其功能的分泌蛋白。前人研究发现,信号肽是一段长度为 5~30 个氨基酸的短肽链,主要位于氨基酸序列 N 端,可引导新合成的蛋白与细胞特定区域分泌通路转移并与细胞膜中特定受体结合进而完成跨膜转运的调控作用^[30],由此推测乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白肽链 N 端信号肽的存在能够确保其发挥正常的调控功能。这与山羊^[22]、猪^[23]和食蟹猕猴^[31]等哺乳动物该蛋白结构解析获得的结果基本一致。另外,跨膜螺旋结构模块在线软件预测到乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白 C 端存在由 21 个氨基酸(477~497 位)组成的一个跨膜螺旋结构域。前人研究发现,山羊^[22]、水貂^[28]、朱鹮^[32]、西里伯斯青鳉^[33]、日本树蛙^[34]和豹蛙^[35]等脊椎动物 TYR 蛋白均存在 1 个由不同数量和种类氨基酸构成的跨膜螺旋结构模块,提示乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白该跨膜结构在色素积累过程中可能发挥关键调控功能。另外,EGF 结构域、Tyrosinase 核心结构模块的分析结果也从侧面反映了乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白在调节色素合成方面的关键作用。在与乌蒙乌骨鸡 TYR 蛋白存在相互作用的蛋白中,MITF、PMEL、OCA2 和 MC1R 均为黑色素合成信号通路(Melanogenesis)中的重要蛋白,OCA2 蛋白是存在于黑色素细胞中的一种重要膜蛋白,主要参与黑色素的合成与运输,可调控黑色素体的酸碱平衡^[36]。本研究由生物信息学在线软件预测分析 TYR 基因的相关结构特性尚需通过后续实验进行进一步验证,目前在缺少乌蒙乌骨鸡该基因相关基础数据的前提下,可为进一步解析该基因调控乌质性状的分子机理提供有价值的功能线索。

鸡形目(Galliformes)和雁形目(Anseriformes)在生物分类学上属于鸟纲(Aves)、今鸟亚纲(Ornithurae)中的 2 个目。目前,鸡形目和雁形目动物的系统进化关系一直是国内外研究的热点。在鸡形目系统分类方面,Hoyo 等^[37]研究表明,Galliformes 目的一个公认分类包括 7 个科:冢雉科、凤冠雉科、珠鸡科、齿鹑科、松鸡科、雉科和吐绶鸡科。Crowe 等^[38]提出了一个初步修订的鸡形目分类方法,包括 5 科:冢雉科、凤冠雉科、

珠鸡科、雉科、齿鹑科,其中雉科包括 7 个亚科:山鹧鸪亚科(Arborophilinae)、鹌鹑亚科(Coturnicinae)、孔雀亚科(Pavoninae)、原鸡亚科(Gallininae)、吐绶鸡亚科(Meleagridinae)、松鸡亚科(Tetraoninae)、雉亚科(Phasianinae)。随着生物技术的快速发展,分子生物学方法已成为解析动物分类和系统进化尤为重要的一种手段,特别是线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)、核基因序列及 DNA 条形码已成为鸟类分类学的几种常用方法。Shen 等^[39]研究表明,线粒体基因组分析恢复了强大的系统发育关系,并提出鸡形目形成了一个研究形态和行为进化的模型组。崔丽君等^[40]基于黑素皮质激素受体 1(MC1R)基因序列构建了 12 个鸡形目物种的系统分化树,表明火鸡和珠鸡最早聚为一类,其次与鹌鹑、蓝胸鹑聚在一个分支。本研究利用 TYR 基因构建的鸡形目与雁形目物种系统发育树显示,盔珠鸡属的盔珠鸡首先与乌蒙乌骨鸡等原鸡属聚为一类,然后与鹌鹑属的日本鹌鹑聚在一个分支,该结果与前人^[40]获得的结果基本一致,说明作为核基因的 TYR 基因可用于进行鸡形目物种的系统发育分析。传统分类学一般认为,雁形目除南极大陆外,在世界范围内广泛分布,现存约 43 属 150 种,其中,鸭科是雁形目最大的一科,多数存在季节性迁徙的习性^[41]。在系统分类方面,联合传统形态学和现代分子生物学方法有效助推了雁形目鸟类分类学的定性发展。吕小燕等^[42]通过线粒体基因组序列将同属天鹅属的黑天鹅和疣鼻天鹅聚在同一个分支,本研究中,6 种鸭科动物共分为 4 个分支,潜鸭属和鸭属、硬尾鸭属、雁属、天鹅属,黑天鹅和疣鼻天鹅聚在一支,与前人^[42]研究一致,特别有趣的是潜鸭属和鸭属聚为一类,亲缘关系最近,尚需通过其他分类方法进行确认分析。通过对选取的鸡形目和雁形目 TYR 基因序列进行系统发育分析,获得的初步结果与动物传统形态学分类结果基本一致,表明核基因 TYR 适宜开展物种系统进化分析,可对通过线粒体基因序列进行物种起源进化研究具有较好的补充作用。

4 结 论

本研究克隆鉴定了 1 590 bp 乌蒙乌骨鸡 TYR 基因完整编码区序列,共编码 529 个氨基酸,TYR 蛋白存在 EGF 结构域、Tyrosinase 家族核心结构模块、CuA 和 CuB 结合区域信号,通过 TYR 基因编码区序列构建的系

统发育树能够反映鸡形目与雁形目物种的进化关系。

参考文献:

- [1] 国家畜禽遗传资源委员会. 中国畜禽遗传资源志 - 家禽志 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [2] 李鹏, 高巧琴, 曲湘勇, 等. 120 日龄雪峰乌骨鸡乌色度与肌肉黑色素含量的相关性分析 [J]. 经济动物学报, 2019, 23(4): 219-222.
- [3] Seruggia D, Josa S, Fernández A, *et al.* The structure and function of the mouse tyrosinase locus[J]. *Pigm Cell Melanoma R*, 2021, 34(2): 212-221.
- [4] 彭灿阳, 郭松长, 柳序, 等. 乌骨鸡黑色素沉积机理及相关候选基因 [J]. 动物营养学报, 2018, 30(1): 30-36.
- [5] Ferguson C A, Kidson S H. Characteristic sequences in the promoter region of the chicken tyrosinase-encoding gene[J]. *Gene*, 1996, 169(2): 191-195.
- [6] Yang C W, Ran J S, Yu C L, *et al.* Polymorphism in MC1R, TYR and ASIP genes in different colored feather chickens[J]. *3 Biotech*, 2019, 9(5): 203.
- [7] 祖盘玉, 李维, 林家栋, 等. 赤水乌骨鸡 TYR 基因多态性及生物信息学分析 [J]. 南方农业学报, 2019, 50(12): 2806-2811.
- [8] 徐志强, 李丰耘, 赵净颖, 等. 武定乌骨鸡 TYR 基因多态性与黑色素沉积的关联研究 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学), 2021, 36(4): 608-615.
- [9] Yu S, Wang G, Liao J, *et al.* Five alternative splicing variants of the TYR gene and their different roles in melanogenesis in the Muchuan black-boned chicken[J]. *Br Poult Sci*, 2019, 60(1): 8-14.
- [10] Yu S, Wang G, Liao J, *et al.* Identification of key microRNAs affecting melanogenesis of breast muscle in Muchuan black-boned chickens by RNA sequencing[J]. *Br Poult Sci*, 2020, 61(3): 1466-1799.
- [11] 宋兴超, 王云艳, 孟金柱, 等. 乌蒙乌骨鸡 TYR 基因启动子区克隆及分子结构特征分析 [J]. 中国畜牧杂志, 2024, 60(12): 215-223.
- [12] Walker J M. The Proteomics Protocols Handbook[M]. New York: Humana Press, 2005: 571-607.
- [13] Nielsen H. Predicting Secretory Proteins with SignalP[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1611:59-73.
- [14] Letunic I, Khedkar S, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): 458-460.
- [15] Nganvongpanit K, Kaewkumpai P, Kochagul V, *et al.* Distribution of melanin pigmentation in 33 organs of Thai black-bone chickens(*Gallus gallus domesticus*)[J]. *Animals (Basel)*, 2020, 10(5): 1-13.
- [16] Khumpeerawat P, Duangjinda M, Phasuk Y. Factors affecting gene expression associated with the skin color of black-bone chicken in Thailand[J]. *Poult Sci*, 2021, 100(11): 101440.
- [17] Liu X, Zhou R, Peng Y, *et al.* Feather follicles transcriptome profiles in Bashang long-tailed chickens with different plumage colors[J]. *Genes Genom*, 2019,41(11):1357-1367.
- [18] Lai X, Wichers H J, Soler-Lopez M, *et al.* Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins[J]. *Chem*, 2018, 24(1): 47-55.
- [19] Sato S, Otake T, Suzuki C, *et al.* Mapping of the recessive white locus and analysis of the tyrosinase gene in chickens[J]. *Poult Sci*, 2007, 86(10): 2126-2133.
- [20] Song Y, Xu Y, Deng J, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated mutation of tyrosinase (Tyr) 3' UTR induce graying in rabbit[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1569.
- [21] Dongre V B, Awandkar S P, Salunke V M, *et al.* The investigation on allelic, genotypic frequencies and gene expression study in coding region of tyrosinase gene in Deoni cattle breed of western India[J]. *Anim Biotechnol*, 2023, 34(2): 208-217.
- [22] Chen W, Wang H, Dong B, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of tyrosinase gene in the skin of Jining gray goat (*Capra hircus*)[J]. *MCB*, 2012, 366(1-2): 11-20.
- [23] Okumura N, Hayashi T, Sekikawa H, *et al.* Sequences and mapping of genes encoding porcine tyrosinase (TYR) and tyrosinase-related proteins (TYRP1 and TYRP2)[J]. *Anim Genet*, 2005, 36(6): 513-516.
- [24] Zhang X T, Wei K J, Chen Y Y, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of tyr and tyrp1 genes in normal and albino yellow catfish *Tachysurus fulvidraco*[J]. *J Fish Biol*, 2018, 92(4): 979-998.
- [25] Boonanuntanasarn S, Yoshizaki G, Iwai K, *et al.* Molecular cloning, gene expression in albino mutants and gene knockdown studies of tyrosinase mRNA in rainbow trout[J]. *Pigment Cell Res*, 2004, 17(4): 413-421.
- [26] 郭跃跃, 张宇飞, 王天骄, 等. 黑猪 TYRP1 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(5): 1299-1307.
- [27] 王瑞宁, 赵子雅, 冯硕, 等. 赤狐 DCT 基因生物信息学分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019(23): 127-130, 173.
- [28] 宋兴超, 刘琳玲, 潘虹军, 等. 水貂酪氨酸酶 (TYR) 基因克隆、SNPs 筛查及其皮肤组织 mRNA 差异表达分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(1): 66-76.
- [29] Thawabteh A M, Jibreen A, Karaman D, *et al.* Skin pigmentation types, causes and treatment-A review[J]. *Molecules*, 2023, 28(12): 4839.
- [30] 赵宝庆, 任伟超, 王震, 等. 酸橙柠檬酸合酶基因电子克隆和生物信息学分析 [J]. 东北林业大学学报, 2019, 47(12): 79-83.
- [31] Kim Y H, Park S J, Choe S H, *et al.* Identification and characterization of the tyrosinase gene(TYR) and its transcript variants (TYR_1 and TYR_2) in the crab-eating macaque(*Macaca fascicularis*)[J]. *Gene*, 2017, 630(6): 21-27.
- [32] Yang J, Liu X, Zhang J, *et al.* Molecular cloning and biochemical analysis of Tyrosinase from the Crested Ibis in China[J]. *Biochem Genet*, 2012, 50(11-12): 936-945.
- [33] 马元, 仲颖, 郭婧, 等. 西里伯斯青鳞 tyr 和 slc24a5 的克隆及表达分析 [J]. 水生生物学报, 2022, 46(3): 282-291.
- [34] Takase M, Miura I, Nakata A, *et al.* Cloning and sequencing of the cDNA encoding tyrosinase of the Japanese pond frog, *Rana nigromaculata*[J]. *Gene*, 1992, 121(2): 359-363.
- [35] Zanna P T, Maida I, Arciuli M, *et al.* Molecular cloning and

不同海拔牦牛骨骼肌 *HSP70* 相关基因的表达分析

付一依, 权君莲, 张勤文*

(青海大学农牧学院, 青海西宁 810016)

摘要: 为了探究不同海拔对牦牛 (*Bos grunniens*) 骨骼肌中 *HSP70* 相关基因的表达特点及其低氧适应机制, 试验选取青海省化隆县 (海拔 1 900 m, 简称低海拔组)、海晏县 (3 200 m, 简称中海拔组) 和班玛县 (4 500 m, 简称高海拔组) 的健康雄性成年牦牛各 5 头, 屠宰后取骨骼肌 (股四头肌) 组织置于 4% 多聚甲醛溶液固定, 另取部分组织在液氮中保存。以低海拔牦牛作为对照, 用实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹技术检测不同海拔牦牛骨骼肌 *HSP70* 相关基因的 mRNA 和蛋白的表达变化。结果表明, 低氧会诱导缺氧诱导因子 1 (Hypoxia-Inducible Factor-1, *HIF1*) 的产生, 并且长期的缺氧环境会造成骨骼肌中线粒体的损伤, 同时诱导一些热应激因子发挥作用, 共同维持细胞代谢和能量代谢的守恒, 从而增强机体对低氧的适应。本研究为青海地区高原动物的低氧适应机制以及高原病的治疗提供了理论依据和新的思路。

关键词: 高原牦牛; 骨骼肌; *HSP70*; 低氧适应机制

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20250610-03

机体发生应激过程中会产生一系列生理变化, 激活热休克转录因子 (Heat Shock Transcription Factor, *HSF*), 并介导热休克蛋白 70 (Heat Shock Protein 70, *HSP70*) 基因与蛋白表达发生变化^[1]。研究发现, 热休克转录因子 1 (Heat Shock Transcription Factor 1,

HSF1) 和热休克转录因子 4 (Heat Shock Transcription Factor 4, *HSF4*) 是 *HSF* 中比较关键的 2 个成员。低氧等应激条件下, *HSF1* 调节热休克蛋白 (Heat Shock Protein, *HSP*) 的表达为: 在细胞质中 *HSF1* 和 *HSF4* 形成三聚体, 进入细胞核后与 *HSP* 启动子上的热休克元件 (Heat Shock Element, *HSE*) 相结合, 促进 *HSP* 蛋白的表达^[2]。*HSP* 的转录、*HSF1* 的激活和 *HSF1* 与 *HSE* 的结合都是 *HSP* 的转录调控的, 在正常生理状态下, *HSF1* 与 *HSE* 很难结合; 而在应激条件下, 两者的结合力会快速增加, 且在短时间内达到高峰^[3]。研究发现, 在应激发生时, 检测到 *HSP70* 表达上调是由 *HSF1* 所介导的^[4]。低氧环境中会发生氧化应激反应和炎症反

收稿日期: 2025-06-10; 修回日期: 2025-07-16

资助项目: 青海省自然科学基金项目 (No.2023-ZJ-722)

作者简介: 付一依 (2001-), 女, 硕士研究生, 研究方向为高原家畜形态学结构特点与高原环境的关系, E-mail: 1179961999@qq.com

* 通信作者: 张勤文 (1972-), 男, 教授, 硕士, 硕士生导师, 研究方向为高原家畜形态学结构特点与高原环境的关系, E-mail: 82321200@qq.com

- biochemical characterization of the skin tyrosinase from *Rana esculenta* L[J]. *Comp Biochem Phys B*, 2009, 152(3): 234-242.
- [36] Zhang X, Qi Y, Pang Y, et al. Identification of polymorphisms in the *HERC2-OCA2* gene locus and their association with feather color in quail[J]. *J Poult Sci*, 2023, 60(2): 2023013.
- [37] del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J. *Handbook of the Birds of the World*[M]. Barcelona: Lynx Editions, 1994: 434-557.
- [38] Crowe T M, Bowie R C K, Bloomer P, et al. Phylogenetics, biogeography and classification of, and character evolution in, gamebirds (Aves: Galliformes): effects of character exclusion, data partitioning and missing data[J]. *Cladistics*, 2006, 22(6): 495-532.

- [39] Shen Y Y, Liang L, Sun Y B, et al. A mitogenomic perspective on the ancient, rapid radiation in the Galliformes with an emphasis on the Phasianidae[J]. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 132.
- [40] 崔丽君, 张桂贤, 王雪娇, 等. 鸡形目黑素皮质素受体 1 基因多态性研究[J]. *畜牧与兽医*, 2014, 46(7): 10-16.
- [41] 王加连. 基于生物信息学的雁形目鸟类分类及其系统发育关系[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(9): 39-41.
- [42] 吕小艳, 李斌强, 崔晶, 等. 基于线粒体基因组分析鸭科部分鸟类的遗传多样性[J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(Z1): 2008-2019.

(责任编辑: 赵楠)