

基于宏基因组学解析瘤胃微生物调节荷斯坦奶牛乳蛋白含量的研究

吴建民 王 雍 周协琛 耿子健 贾大庆 韩 杨 王建发* 武 瑞*

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院,黑龙江省牛病防治重点实验室,大庆 163319)

摘要: 本试验旨在研究相同饲料结构及饲养环境下,基于宏基因组学解析乳蛋白含量与瘤胃微生物之间的潜在关系。以荷斯坦奶牛为研究对象,选择乳蛋白含量长期偏高(>3.7%)、长期偏低(3.0%~3.3%)的奶牛各3头,采集瘤胃内容物,通过宏基因组学方法分析二者之间的潜在调节作用。结果表明:拟杆菌门(Bacteroidetes)、拟杆菌纲(Bacteroidia)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、普雷沃氏菌科(Prevotellaceae)、拟杆菌目(Bacteroidales)、栖瘤胃普雷沃氏菌(*Prevotella ruminicola*)相对含量在2组间呈现显著差异($P<0.05$),其中*Prevotella ruminicola*为主要差异微生物,并首次发现三角酵母属(*Trigonopsis*)可能对调节乳蛋白含量具有一定作用。在乳蛋白含量长期偏高的奶牛瘤胃内,与乳蛋白前体物生成过程相关的氨基酸代谢和其他氨基酸代谢功能基因的相对丰度显著升高($P<0.05$),与蛋白质降解及氨基酸代谢过程密切相关的COG0542、COG0612、COG1404、COG1506、COG2755、COG4870基因的相对丰度显著升高($P<0.05$),COG1404基因相对丰度富集度最高,其在微生物降解蛋白质过程中通过表达多肽酶发挥功能。综上,在相同饲料结构及饲养环境下,瘤胃内*Prevotella ruminicola*和*Trigonopsis*这2种微生物相对含量的差异对调节乳蛋白含量具有一定作用;微生物通过高表达COG0542、COG0612、COG1404、COG1506、COG2755、COG4870基因增强瘤胃内蛋白质降解及氨基酸代谢作用,影响乳蛋白前体物合成情况,进而调节乳蛋白的含量。

关键词: 荷斯坦奶牛;瘤胃微生物;乳蛋白;前体物

中图分类号:S823

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2020)08-3843-13

乳蛋白所含必需氨基酸对生命健康具有重要作用^[1],乳蛋白含量也是评价奶牛泌乳性能及牛乳质量的关键指标。乳蛋白由饲料营养成分经过奶牛自身复杂生物学系统转化产生,与饲料结构^[2]和体内多种激素^[3]等密切相关。奶牛摄入饲料蛋白质后,经过瘤胃微生物作用分解产生氨基酸,而后发酵成氨态氮用于合成瘤胃微生物蛋白;部分微生物蛋白在瘤胃内降解,但大部分随食糜进入皱胃,受消化酶作用后分解成氨基酸^[4];余下瘤胃未降解蛋白到达小肠后受消化酶作用分解成

氨基酸^[5]。以上途径产生的氨基酸经由小肠吸收进入血液^[6]转变为游离氨基酸(free amino acids, FAA),FAA是决定最终乳蛋白含量的必要物质基础^[7]。血液中FAA流经乳腺时被乳腺组织摄取利用,加工后合成乳蛋白,约占全部乳蛋白的90%^[8],其余乳蛋白来自奶牛血液转运^[9]。由此可见,瘤胃微生物对饲料蛋白质的作用强度直接影响进入小肠的氨基酸含量,进一步对作为乳蛋白前体物的FAA产生影响,从而间接对乳蛋白的自身合成起到一定调节作用。但目前对瘤胃微生物

收稿日期:2020-02-24

基金项目:国家自然科学基金项目(31402157,31772698)

作者简介:吴建民(1994—),男,黑龙江庆安人,硕士研究生,从事牛乳营养品质调控研究。E-mail:wujianmin1994@163.com

*通信作者:王建发,副教授,硕士生导师,E-mail:275229746@qq.com;武 瑞,教授,博士生导师,E-mail:fuhewu@126.com

物与乳蛋白合成相关性的报道相对较少。

瘤胃微生物通过自身合成的酶类对饲料中营养成分进行降解,其中嗜淀粉瘤胃杆菌、溶纤维丁酸弧菌、栖瘤胃普雷沃氏菌等能够降解饲料中的蛋白质^[10]。研究瘤胃内微生物与乳蛋白合成调控之间的关系对提升乳品质具有重要意义,但由于瘤胃微生物不易体外培养,使得相关研究受到限制,而利用宏基因组学技术不仅能够对整个瘤胃微生态进行系统地分析,还可以得到物种、基因和功能三者之间的联系^[11]。孙会增^[12]利用宏基因组学技术分析了瘤胃微生物受饲料结构影响对奶牛生长性能指标产生的变化规律。田彦^[13]通过高通量测序技术分析了瘤胃微生物与乳脂肪合成前体物之间存在的潜在关系。迄今为止,很少有研究者探讨相同饲料结构及饲养环境下,瘤胃微生物与乳蛋白合成前体物之间的潜在关系。本试验以黑龙江省某牧场内荷斯坦奶牛为研究对象,在相同饲料结构及饲养环境下,采集乳蛋白含量长期偏高及长期偏低奶牛的瘤胃内容物样本,通过宏基因组学分析试验组别之间微生态的差异性,旨在探究瘤胃微生物与乳蛋白合成之间潜在的调节关系,为提升乳蛋白含量提供新的参考思路以及数据支持。

1 材料与方 法

1.1 试验设计

本试验选用黑龙江省某牧场荷斯坦奶牛,对牧场内全部奶牛进行为期 12 个月的奶牛生产性能测定(dairy herd improvement, DHI)数据定向追踪,筛选出产奶量[(35.1±2.4) kg/d]相近,且乳蛋白含量长期偏高(>3.7%)的奶牛 3 头,为 HighMP 组;乳蛋白含量长期偏低(3.0%~3.3%)的奶牛 3 头,为 LowMP 组。筛选条件参照中国奶牛数据中心 <https://www.holstein.org.cn/>。为最大限度降低其他因素对本试验结果可能造成的干扰,全部试验牛只来自同一父本且均为 2014 年 2 月出生,其饲养环境、饲料配方[饲喂参照 NRC (2001)标准配制,见表 1。参照 GB/T 6434—2006 方法测定酸性洗涤纤维和中性洗涤纤维含量,参照 GB/T 6432—1994 方法测定粗蛋白质含量,参照 GB/T 6433—2006 方法测定粗脂肪含量,参照 GB/T 6436—2002 方法测定磷含量,参照 GB/T

6435—2002 方法测定钙含量]、产犊胎次(3 胎)都相同,同时试验牛只均处于泌乳中期[泌乳天数为(150±12) d,见表 2]。采取当月(2018 年 6 月)牛乳样本后测定试验牛只产奶量及乳蛋白含量,并进行体细胞数检测,符合要求后进行瘤胃内容物样本采集。

表 1 饲料组成及营养水平(干物质基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the diet (DM basis)

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米青贮 Corn silage	24.47
压片玉米 Pressure com	7.91
玉米 Corn	15.84
棉籽粕 Cottonseed meal	3.42
豆粕 Soybean meal	12.28
菜籽粕 Rapeseed meal	4.78
苜蓿干草 Alfalfa hay	14.35
羊草 <i>Leymus chinensis</i>	10.22
干酒糟及其可溶物 DDGS	3.23
预混料 Premix ¹⁾	2.96
食盐 NaCl	0.54
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels ²⁾	
产奶净能 NE _L /(MJ/kg)	7.12
酸性洗涤纤维 ADF	16.58
中性洗涤纤维 NDF	30.82
粗蛋白质 CP	17.06
粗脂肪 EE	4.92
磷 P	0.44
钙 Ca	0.72

1) 每千克预混料含有 One kilogram premix contained the following: VA 800 000 IU, VD 620 000 IU, VE 1 020 000 IU, Mn 2 500 mg, Zn 5 500 mg, Fe 2 200 mg, Cu 1 600 mg, Se 33 mg, P 44 mg, Co 38 mg, I 90 mg。

2) 产奶净能为计算值,其他营养水平为实测值。NE_L was a calculated value, while the other nutrient levels were measured values.

1.2 样品采集与处理

1.2.1 牛乳样品的采集与处理

通过牧场转盘式挤奶厅下方的牛乳采样器收集每头试验牛只当日的牛乳样品各 50 mL,其中早、中、晚采样量比例为 4:3:3。牛乳样品送至黑龙江省农垦畜牧兽医研究所 DHI 测定中心检测乳蛋白含量、产奶量及体细胞数。

表 2 各试验牛只基本信息

Table 2 Basic information of trial cows

编号 No.	出生日期 Date of birth	产犊胎次 Parity/胎	泌乳天数 Lactation days/d	体细胞数 SCC/ ($\times 10^5$ 个/mL)	产奶量 Milk yield/ (kg/d)	乳蛋白含量 Milk protein content/%
HighMP1	2014-02-13	3	162	2.1	34.5	3.88
HighMP2	2014-02-22	3	148	6.5	37.5	3.78
HighMP3	2014-02-13	3	154	5.3	34.5	3.91
LowMP1	2014-02-13	3	162	11.8	32.7	3.15
LowMP2	2014-02-13	3	156	18.4	36.0	3.07
LowMP3	2014-02-22	3	138	1.7	37.2	3.23

1.2.2 瘤胃内容物样品的采集与处理

确认上述检测结果后,于牧场奶牛晨饲后 3~4 h 内用瘤胃口腔导管法采集所有试验牛只瘤胃内容物。每头试验牛只采集 36 mL 经 4 层纱布过滤后的瘤胃内容物,首先采用便携式 pH 计(testo-206-pH2)测量瘤胃内容物 pH,再将其中 6 mL 分装于 4 只 1.5 mL 冻存管,立即投入液氮罐中速冻后经干冰运输至实验室,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,以便进行微生物 DNA 的提取与检测。余下 30 mL 分装于 2 只 15 mL 离心管中,立即投入液氮罐中速冻,再转移到实验室, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存备用。为防止采样过程中唾液影响,弃掉起初 50 mL 左右瘤胃内容物;为降低瘤胃口腔导管插入深度和位置对不同试验牛只样本采集的潜在影响,口腔导管均保持相同的插入深度;为减小人为误差,采样固定由 1 名技术娴熟的专业人员负责操作。

1.3 宏基因组 DNA 提取及建库测序

1.3.1 DNA 提取

使用 DNA 提取试剂盒(HiPure Stool DNA Kits,美基生物,广州)从装于 1.5 mL 冻存管的瘤胃内容物中提取基因组 DNA。具体操作严格按照 DNA Kit 的标准规范进行。提取后的 DNA 使用 1% 的琼脂糖电泳、NanoPhotometer[®]微量分光光度计(IMPLEN,美国)和 Qubit[®] 2.0 Fluorometer 核酸浓度检测仪器(Life Technologies,美国)进行 DNA 浓度与质量的检测。全部样品 DNA 总量均大于 $1\text{ }\mu\text{g}$, $\text{OD}_{260/280} \geq 1.8$,条带未见降解。提取后,所有 DNA 样品均保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,直到进行后续处理。

1.3.2 文库构建与测序

每个样本用 $1\text{ }\mu\text{g}$ DNA 作为模板,使用 NEBNext[®] Ultra[™] DNA Library Prep Kit for

Illumina[®](NEB#7370)试剂盒进行文库构建。

1.3.3 上机测序

首先通过 Agilent2100 生物分析仪和实时荧光定量 PCR(real-time PCR)以进行文库质量检测与定量。再取 10 ng 的文库,用 MiSeq Reagent Kit v3(Illumina Inc, San Diego, 美国)在 Illumina MiSeq 中进行双向测序,测序过程在基迪奥生物科技有限公司进行。

1.4 宏基因组数据预处理

1.4.1 数据过滤与去除宿主污染

使用软件 Trimmomatic(v0.32)对原始数据进行过滤,数据过滤内容为:去除含 adapter 的 reads、去除 N 的比例大于 10% 的 reads、去除低质量 reads(质量值 $Q \leq 20$ 的碱基数占整个 read 的 40% 以上),得到 clean reads。将 clean reads 与 bosTau8 宿主基因组数据库比对,比对软件为 bowtie2,得到 HQ clean reads 用于后续分析。

1.4.2 序列组装

利用 MEGAHIT 软件对有效序列进行组装,并在不同 kmer 长度下组装 reads 获得 contigs。

1.5 微生物多样性与功能分析

利用 MetaGeneMark 对 $>500\text{ bp}$ 的 contigs 进行开放阅读框(open reading frame, ORF)预测,再采用 CD-HIT 软件对符合条件(95% 多样性,90% 覆盖率)的预测基因进行聚类,选取最长的基因作为每类代表序列,构建初始非冗余基因集合。获得非冗余基因集后,使用 KEGG orthology 数据库(版本 67.1)进行分级功能分类,以鉴定各种途径之间的层级关系并获得 KEGG 正位标识符和酶委员会(EC)系数。为了获得每组中的独有功能,通过 Mac 终端中的 Mother 程序将所有 6 个样本及

每组3个样本的数据分别组合在一起,并且上传到MG-RAST中以进行相同的功能分析,其中以所有样本组合功能分析作为参考。将得到的可用序列整理到Excel表格中,先计算每个水平微生物或功能在每个样本中的相对比例(相对丰度),然后进行统计分析;对每种微生物或功能进行正态分布检测,符合正态分布的用SAS 22.0中的TTEST模型程序进行统计分析,不符合正态分布的用SAS 22.0中的GLM模型程序进行统计分析。同时将Unigenes通过DIAMOND软件比对到eggNOG数据库,对基因进行进一步功能注释。同时,使用NCBI的RefSeq数据库,对其中的微生物构建索引,使用MetaOthello,在k-mer=31的条件下进行物种注释,并统计各样本的物种注释及丰度信息,获得物种丰度结果。根据基因丰度结果、基因功能注释结果以及物种丰度信息结果,开展组间比较,获得组间差异物种以及差异基因。对物种丰度差异分析采用R包DESeq2(v1.20.0),

Wald 测验 (fitType = “parametric”) 方法进行差异微生物相关性分析。

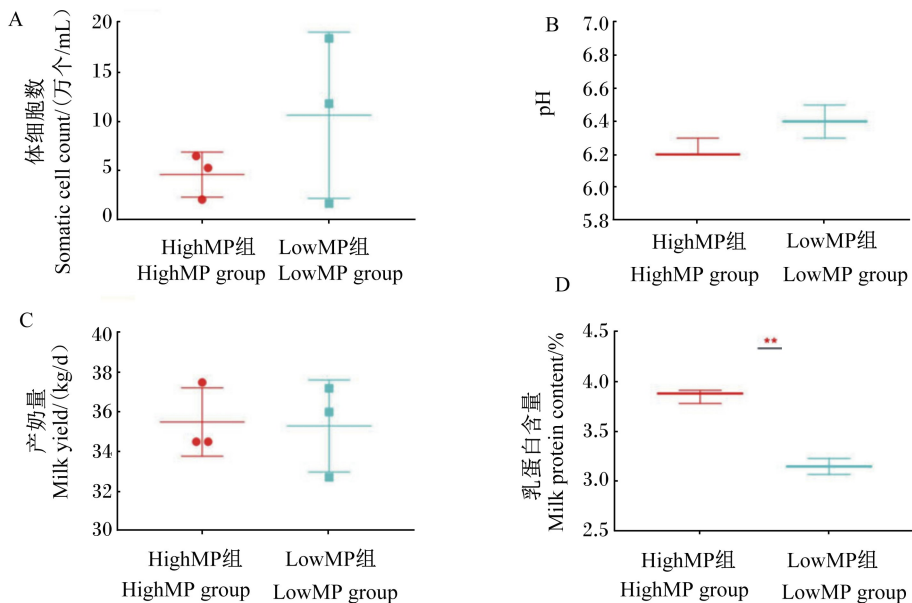
1.6 统计分析

使用SPSS 22.0中的Mann-Whiney U检验比较2组间统计结果的差异。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 不同乳蛋白含量奶牛相关参数

全部样本牛乳体细胞数均小于200 000个/mL(图1-A),符合欧盟规定的奶牛健康乳腺判定标准(体细胞数 $< 300\ 000$ 个/mL)^[14]。pH介于6.2~6.5,符合健康奶牛瘤胃标准^[15]。HighMP组奶牛体细胞数和产奶量与LowMP组差异不显著($P = 0.299$, $P = 0.911$)(图1-A、图1-C);瘤胃pH略低于LowMP组(图1-B),但并不具有统计学意义($P = 0.067$);乳蛋白含量极显著高于LowMP组($P < 0.001$)(图1-D)。



** : $P < 0.01$ 。

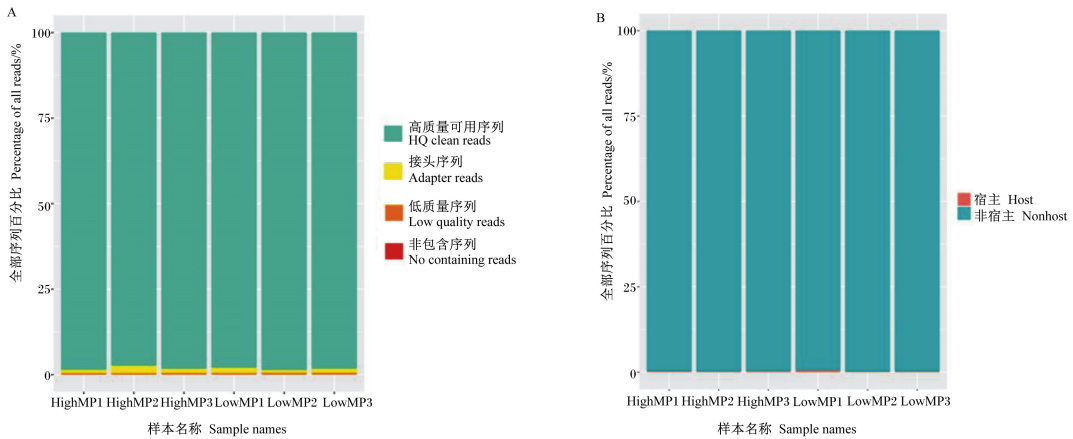
图1 不同乳蛋白含量奶牛相关参数

Fig.1 Related parameters of dairy cows with different milk protein contents

2.2 不同乳蛋白含量奶牛瘤胃微生物组成结构

试验共收集6例奶牛瘤胃内容物样本进行宏基因组分析,将测序后得到的raw data进行过滤(图2-A),进一步去除宿主污染后共产生314 525 919条HQ clean reads(图2-B),其中HighMP组共获得149 239 610条HQ clean reads,平

均每个样本49 746 537条HQ clean reads;LowMP组共获得165 286 309条HQ clean reads,平均每个样本55 095 436条HQ clean reads。所有样本中包含HQ clean reads最多的为58 340 861条,最少的为48 027 731条。



去除接头序列、低质量序列和非包含比例大于10%的序列(质量值 $Q \leq 20$ 的碱基数占全部序列的40%以上)的统计情况(A);去除宿主序列统计情况(B)。

Statistical results of remove the reads with adapter, the reads with N ratio greater than 10% and the reads with low quality (the base number with $Q \leq 20$ accounts for more than 40% of the whole read) (A); statistical results of removing host sequences (B).

图2 原始数据过滤统计

Fig.2 Raw data filtering and statistics

主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)图中明确地展示出 HighMP 组与 LowMP 组微生物物种基因的趋向特征(图 3-A)。物种分析结果显示,瘤胃内细菌相对含量在 69.23%~70.83%,真菌相对含量在 18.32%~19.80%,其他微生物相对含量在 10.54%~10.97%(图 3-B)。检测结果中共鉴定得到 39 门、1 774 属和 5 567 种的微生物。其中 HighMP 组各样本均检测到 39 门、1 743 属、5 493 种的微生物;LowMP 组各样本均检测到 39 门、1 744 属、5 496 种的微生物(图 3-C)。

本次试验结果显示,门水平微生物有 30 种细菌,8 种真菌,1 种原虫,且在 HighMP 组与 LowMP 组各样本中均检测到。其中变形菌门(Proteobacteria, 30.79%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 16.44%)、厚壁菌门(Firmicutes, 13.89%)是主要优势菌门。属水平 HighMP 组与 LowMP 组共有微生物 1 739 个类别,其中普雷沃氏菌属(*Prevotella*, 12.56%)是主要优势菌属。在种水平共检测到 1 122 种优势微生物(相对含量>0.01%)。

2.3 高乳蛋白含量奶牛瘤胃内特征性微生物

依据线判别分析及影响因子(LEfSe)进化分支图及线性判别分析(LDA)值分布图(图 4-A、图 4-B)可知,在 HighMP 组中,Bacteroidetes、拟杆菌

纲(Bacteroidia)、*Prevotella*、普雷沃氏菌科(Prevotellaceae)、拟杆菌目(Bacteroidales)、栖瘤胃普雷沃氏菌(*Prevotella ruminicola*)等微生物显著富集,且具有较大影响。

对种水平优势微生物(相对含量>0.01%)的基因相对丰度分析后发现,HighMP 组表达 *Prevotella ruminicola* 的基因相对丰度极显著升高($P < 0.01$),表达 *Prevotella* 的基因相对丰度显著升高($P < 0.05$)(图 5-A、图 5-B);同时,三角酵母属(*Trigonopsis*)是 HighMP 组独有微生物。

2.4 不同乳蛋白含量奶牛瘤胃微生物基因功能差异

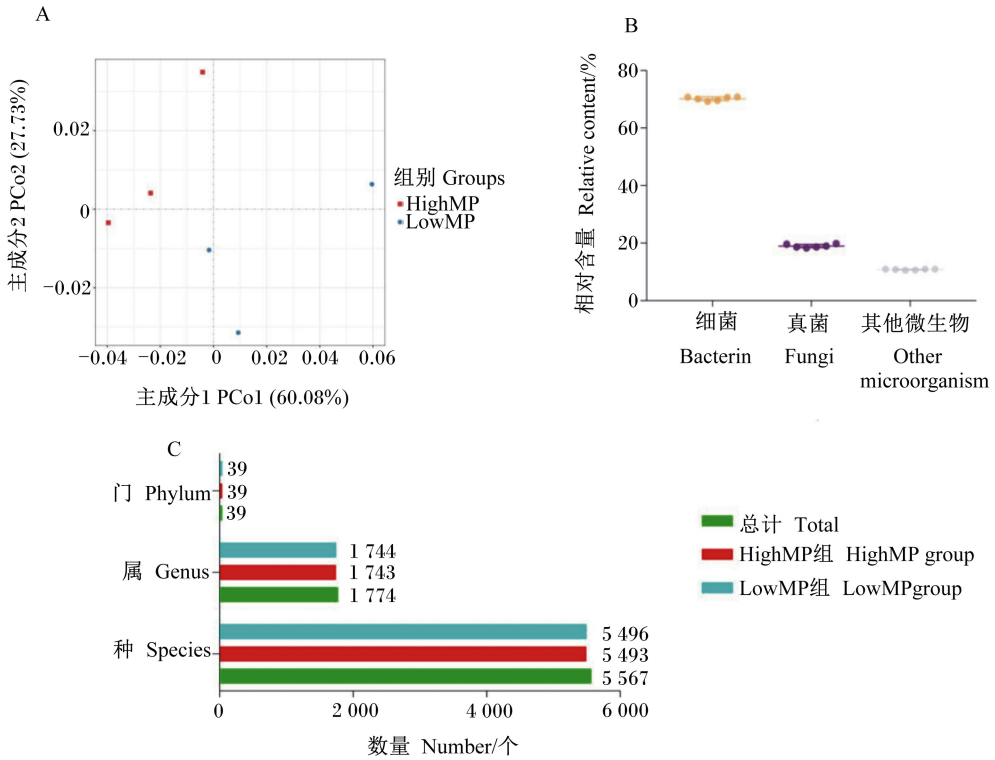
将检测结果中的 raw data 经处理后得到非冗余基因集,再通过 DIAMOND 软件(阈值 $evalue \leq 1e-5$)比对到 KEGG、eggNOG 数据库,同时集合基因的相对丰度表格计算不同数据库比对结果的丰度信息。

2.4.1 与蛋白质生理代谢相关的功能基因富集情况

京都基因与基因组百科全书通路注释(kyoto encyclopedia of genes and genomes pathway annotation, KEGG pathway annotation)结果表明,瘤胃内微生物基因功能主要富集于碳水化合物代谢、氨

基酸代谢、核苷酸代谢等生理过程(图 6-A)。试验进一步筛选出与蛋白质生理代谢相关的功能后,发现功能基因主要富集于半胱氨酸和蛋氨酸代谢过程(图 6-B)。对比 2 组基因功能后发现,

瘤胃内微生物的氨基酸代谢和其他氨基酸代谢功能基因存在显著差异(图 6-C、图 6-D),HighMP 组显著高于 LowMP 组($P<0.05$)。



HighMP 组与 LowMP 组奶牛瘤胃内微生物物种基因主坐标分析 (A); 全部样本瘤胃微生物组成结构分析结果 (B); HighMP 组与 LowMP 组瘤胃微生物门、属、种水平数量统计 (C)。

PCoA analysis of microbial species gene in rumen of dairy cows in HighMP group and LowMP group (A); analysis results of microbial composition and structure in rumen of all samples (B); quantitative statistics of phylum, genus and species levels in rumen of dairy cows in HighMP group and LowMP group (C).

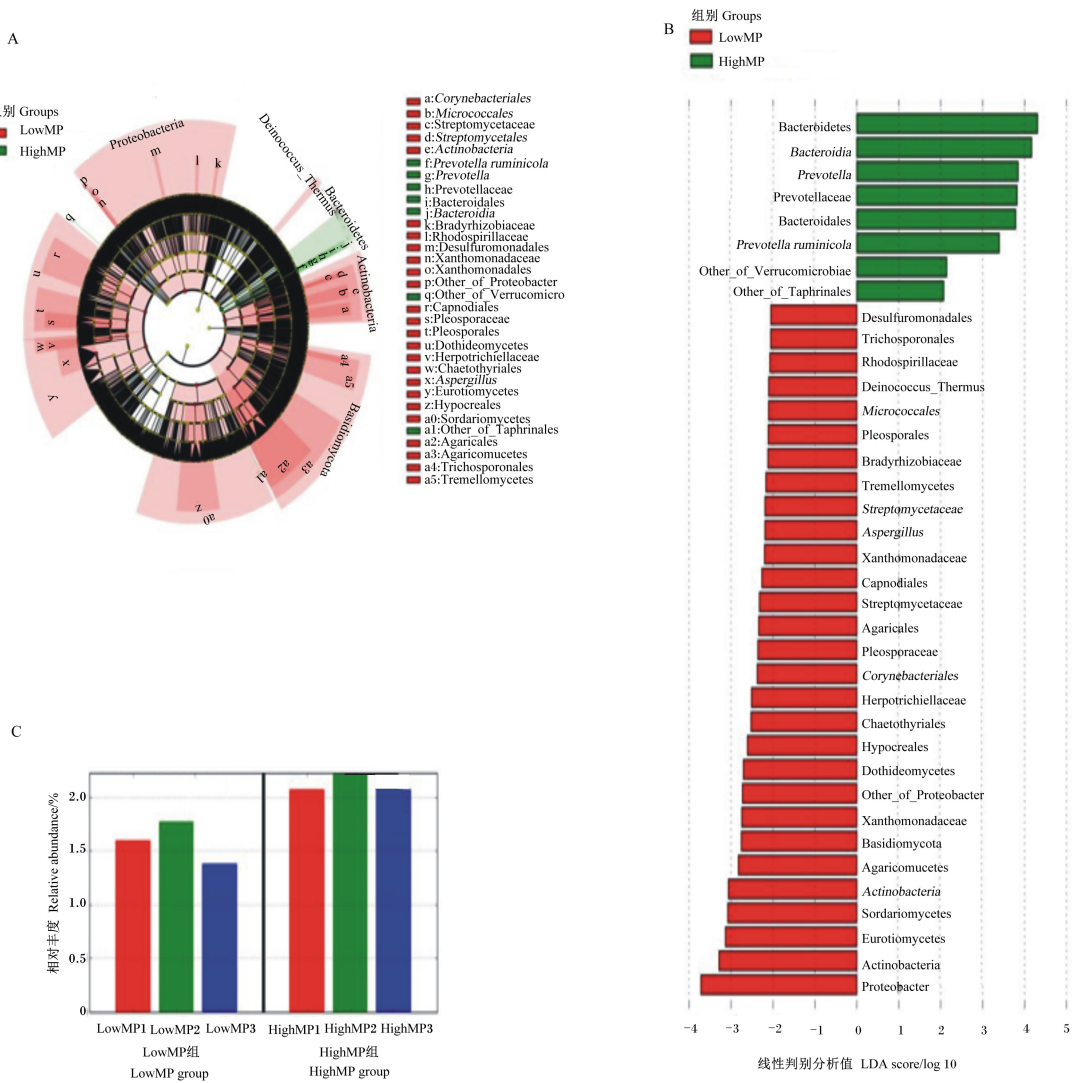
图 3 瘤胃微生物组成及多样性

Fig.3 Rumen microbial composition and diversity

2.4.2 与蛋白质生理代谢相关的差异基因

通过对比 HighMP 组与 LowMP 组 eggNOG 数据库反馈结果,得到 2 组微生物基因在蛋白质降解及氨基酸代谢功能上的区别。在结果中选取相对丰度前 30% 的基因分析后发现,与氨基酸转运与代谢相关功能基因中,COG2755 呈现高度富集状态(图 7-A);与翻译后修饰、蛋白质转换、蛋白质伴侣相关功能基因中,COG0524、COG0612、COG0526、COG1404 呈现高度富集状态(图 7-B)。为进一步研究瘤胃内蛋白质生理代谢的生

物学过程,试验筛选结果中与蛋白质降解及氨基酸代谢过程密切相关的 COG0006、COG0265、COG0542、COG0612、COG0826、COG1404、COG1506、COG2195、COG2755、COG4870 基因,比对后发现:HighMP 组 COG0542、COG0612、COG1404、COG1506、COG2755、COG4870 的基因数量显著高于 LowMP 组,而 COG0006、COG0265、COG0826、COG2195 的基因数量虽然略高于 LowMP 组,但不具有统计学意义($P<0.05$, 图7-C~图 7-L)。

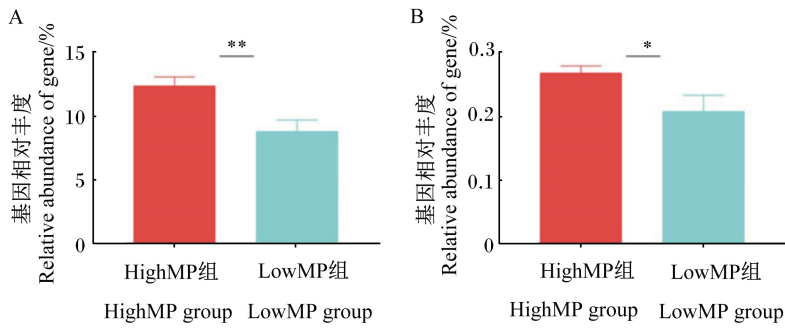


Corynebacteriales: 棒状杆菌; *Micrococcales*: 微球菌; *Streptomycetaceae*: 链霉菌科; *Streptomycetales*: 链霉菌; *Actinobacteria*: 放线杆菌; *Prevotella ruminicola*: 栖瘤胃普雷沃氏菌; *Prevotella*: 普雷沃氏菌; *Prevotellaceae*: 普雷沃氏菌科; *Bacteroidales*: 拟杆菌目; *Bacteroidia*: 拟杆菌; *Bradyrhizobiaceae*: 慢生根瘤菌科; *Rhodospirillaceae*: 红螺菌科; *Desulfuromonadales*: 除硫单胞菌目; *Xanthomonadaceae*: 黄色单胞菌科; *Xanthomonadales*: 黄色单胞菌目; *Other_of_Proteobacter*: 变形菌门未分类微生物; *Other_of_Verrucomicro*: 尤微菌纲未分类微生物; *Capnodiales*: 煤炱目; *Pleosporaceae*: 格孢菌科; *Pleosporales*: 格孢菌目; *Dothideomycetes*: 座囊菌纲; *Herpotrichiellaceae*: 小蔓毛壳科; *Chaetothyriales*: 刺盾目; *Aspergillus*: 曲霉菌; *Eurotiomycetes*: 散囊菌纲; *Hypocreales*: 肉座菌目; *Sordariomycetes*: 粪壳菌纲; *Other_of_Taphrinales*: 外囊菌目未分类微生物; *Agaricales*: 伞菌目; *Agaricomucetes*: 伞菌纲; *Trichosporonales*: 丝孢酵母目; *Tremellomycetes*: 银耳纲; *Bacteroidetes*: 拟杆菌门; *Deinococcus_Thermus*: 异常球菌-栖热菌门; *Basidiomycota*: 担子菌门; *Proteobacteria*: 变形菌门。

进化分支图 (A); 线性判别分析值分布柱状图 (B); HighMP 组与 LowMP 组栖瘤胃普雷沃氏菌基因的相对丰度对比分析 (C)。Evolution branch diagram (A); LDA value distribution histogram (B); comparative analysis of relative abundance of *Prevotella luminicola* between HighMP group and LowMP group (C)。

图 4 线性判别分析及影响因子

Fig.4 Linear discriminant analysis and effect factors



表达瘤胃普雷沃氏菌基因的相对丰度在 HighMP 组与 LowMP 组对比分析 (A); 表达普雷沃氏菌属基因的相对丰度在 HighMP 组与 LowMP 组对比分析 (B)。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

The relative gene abundances of *Prevotella ruminicola* were compared in the HighMP group and LowMP group (A); the relative gene abundances of *Prevotella* were compared in the HighMP group and LowMP group (B). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

图 5 HighMP 组与 LowMP 组表达瘤胃普雷沃氏菌和普雷沃氏菌属基因的相对丰度对比

Fig.5 Comparison of relative abundance of *Prevotella ruminicola* and *Prevotella* genes expressed in HighMP and LowMP groups

对 HighMP 组显著升高基因的富集度进一步统计发现, *COG1404* 为主要富集基因, 之后依次为 *COG0612*、*COG2755*、*COG0542*、*COG1506*、*COG4870* (图 8)。

3 讨论

目前, 在相同饲料结构及饲养环境下对瘤胃微生物群与宿主乳蛋白含量之间相互作用关系的报道较少。本试验通过宏基因组学技术, 综合分析瘤胃微生物、微生物基因、基因功能与宿主合成乳蛋白之间的潜在调节作用。

3.1 不同乳蛋白含量奶牛瘤胃微生物组成结构的差异

本试验结果显示, 奶牛瘤胃内优势门水平微生物为 Proteobacteria、Bacteroidetes、Firmicutes, 优势属水平微生物为 *Prevotella*, 与马健等^[16] 以及 Jami 等^[17] 分析荷斯坦奶牛瘤胃内优势微生物的结果相一致, 而与逢宾宾等^[18] 以及李子健等^[19] 的研究结果在 3 种优势微生物相对含量顺序上有一定差异, 引起这种情况的原因可能与外界环境、饲养方式^[20]、饲料结构^[21] 等多方面因素有关, 有待进一步的研究。本试验结果显示, 在相同饲料结构及饲养环境下, 高乳蛋白含量奶牛瘤胃内种水平微生物 *Prevotella ruminicola* 的相对含量显著升高, 与 Xue 等^[22] 的研究结果一致。Hazlewood 等^[23] 的研究表明, *Prevotella ruminicola* 是瘤胃内具有降解蛋白质功能数量最多的微生物, 能够分

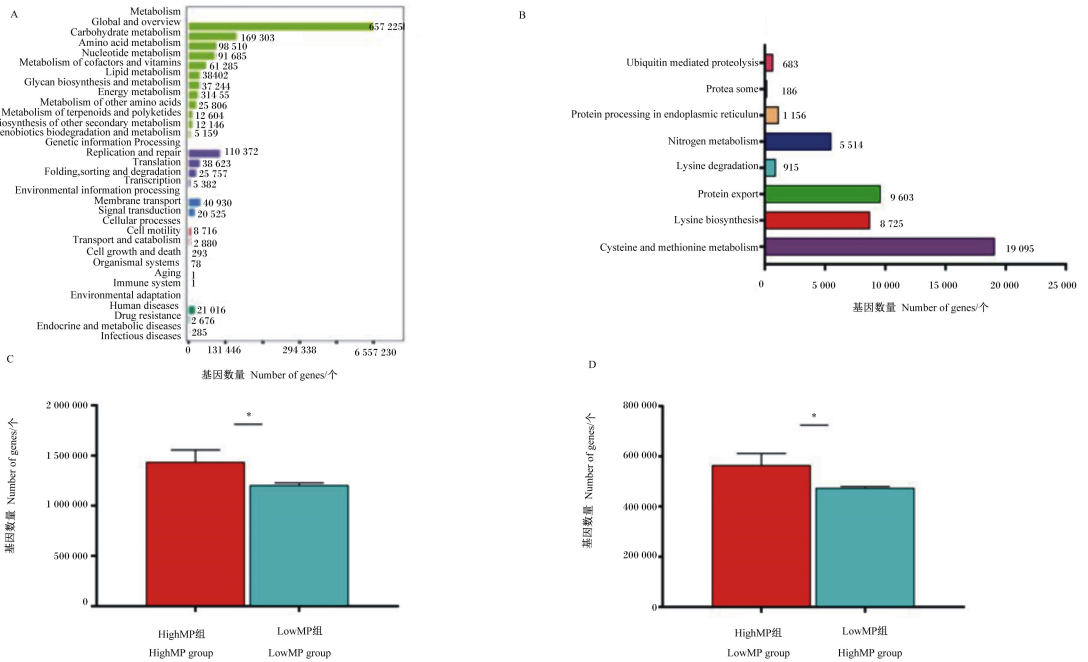
泌多种蛋白酶。Gruninger 等^[24] 的研究同样表明 *Prevotella ruminicola* 与瘤胃内蛋白质和氨基酸的代谢紧密相关。此外, 本试验首次发现, 乳蛋白含量可能与瘤胃微生物 *Trigonopsis* 有关, 赵沁沁等^[25] 的研究表明, *Trigonopsis* 与氨基酸代谢密切相关。酵母类微生物的生存条件受到 pH 的影响^[26], HighMP 组奶牛瘤胃内相对较低的 pH 环境可能为 *Trigonopsis* 的生长提供了一定的条件。因此, 在相同饲料结构及饲养环境下, *Prevotella ruminicola* 和 *Trigonopsis* 的相对含量的差异可能是导致 HighMP 组奶牛乳蛋白含量显著升高的主要原因。以上结果表明, HighMP 组奶牛具有特定功能的微生物群通过作用于瘤胃内蛋白质及氨基酸进而产生了一种稳定的微生态系统, 并倾向于增强瘤胃内氨基酸代谢的能力。

3.2 不同乳蛋白含量奶牛瘤胃微生物基因功能的差异

综合分析 KEGG 和 eggNOG 数据库结果可知, 奶牛瘤胃内微生物基因功能主要富集于碳水化合物代谢和氨基酸代谢的生理过程, 与孙会增^[12] 的研究结果相一致。瘤胃内碳水化合物代谢包括对饲料中结构性碳水化合物和非结构性碳水化合物的代谢^[27], 通过表达纤维素、木葡聚糖、甘露聚糖、(1,3:1,4)- β -D-葡聚糖、木聚糖、鼠李聚半乳糖醛酸等相关降解酶发挥作用^[28]; 瘤胃内与乳蛋白合成相关的氨基酸代谢主要为限制性氨基酸代谢^[29], 包括对蛋氨酸、苏氨酸、赖氨酸、精氨

酸、色氨酸和组氨酸等^[30]的作用。本试验结果显示,HighMP组奶牛半胱氨酸与蛋氨酸代谢功能的基因相对丰度显著升高,通常情况下蛋氨酸为奶牛第一限制性氨基酸,李吕木等^[31]的研究表明,在瘤胃微生物无其他氮源和碳源的情况下,添加蛋氨酸可加速缬氨酸、丝氨酸、半胱氨酸和组氨酸的

利用,同时改变组氨酸的代谢情况,使产物中游离甘氨酸含量增加。此外,本试验结果显示,HighMP组奶牛表达氨基酸代谢和其他氨基酸代谢功能基因的相对丰度显著升高,因此能够增强瘤胃内氨基酸代谢能力。



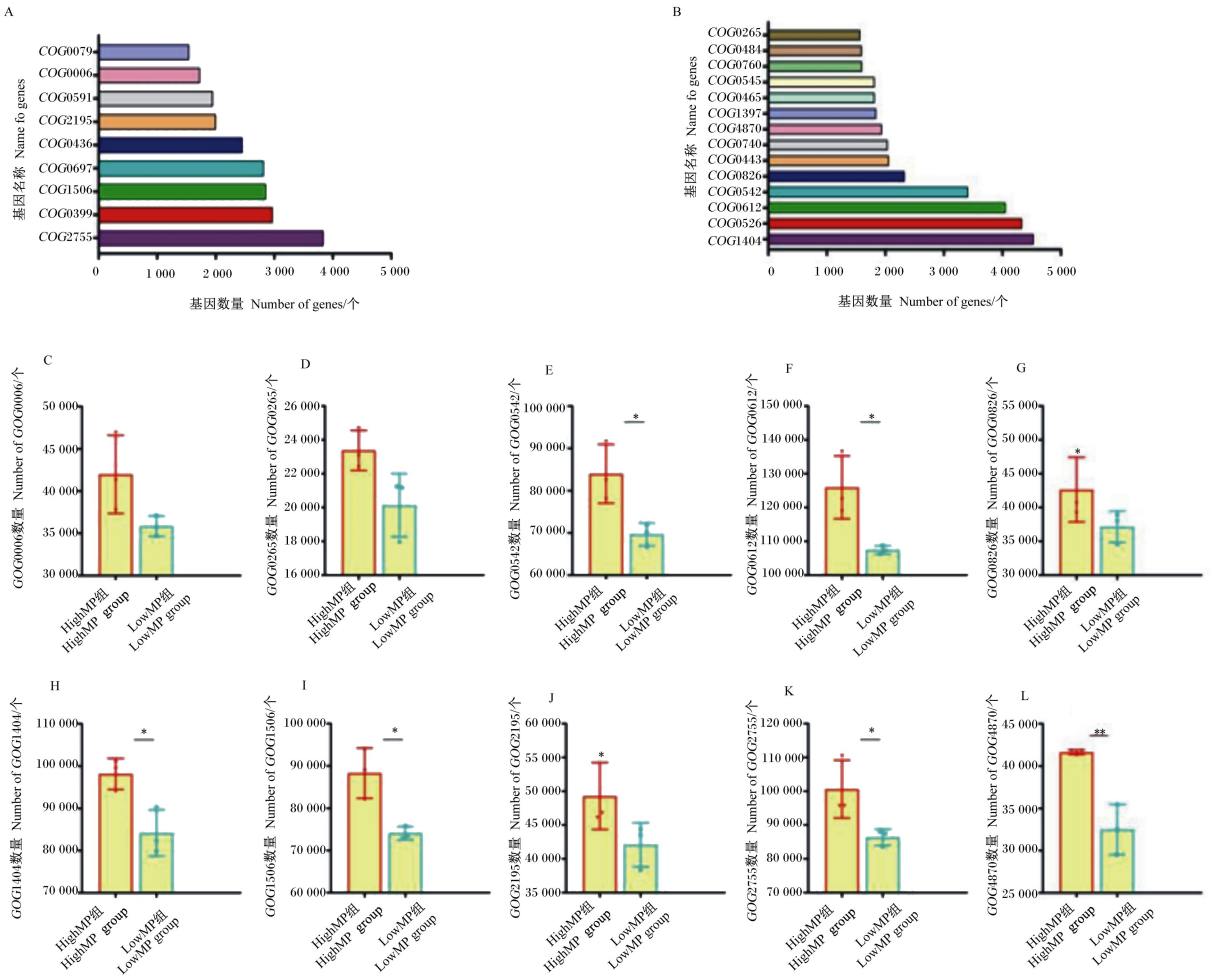
KEGG pathway annotation:京都基因与基因组百科全书通路注释信息;Metabolism:新陈代谢;Global and overview:全部被匹配基因;Carbohydrate metabolism:碳水化合物代谢;Amino acid metabolism:氨基酸代谢;Nucleotide metabolism:核苷酸代谢;Metabolism of cofactors and vitamins:辅酶和维生素代谢;Lipid metabolism:脂质代谢;Glycan biosynthesis and metabolism:聚糖生物合成与代谢;Energy metabolism:能量代谢;Metabolism of other amino acids:其他氨基酸代谢;Metabolism of terpenoids and polyketides:萜类化合物与聚酮类化合物代谢;Biosynthesis of other secondary metabolites:其他次生代谢产物生物合成;Xenobiotics biodegradation and metabolism:外源生物降解与代谢;Genetic information processing:遗传信息处理;Replication and repair:复制与修复;Translation:翻译;Folding, sorting and degradation:折叠,分类和降解;Transcription:转录;Environmental information processing:环境信息处理;Membrane transport:膜转运;Signal transduction:信号转导;Cellular processes:细胞周期;Cell motility:细胞运动;Transport and catabolism:运输与分解代谢;Cell growth and death:细胞生长与凋亡;Organismal systems:组织系统;Aging:老化;Immune system:免疫系统;Environmental adaptation:环境适应;Human diseases:人类疾病;Drug resistance:耐药性;Endocrine and metabolic diseases:内分泌代谢疾病;Infectious diseases:传染病;Ubiquitin mediated proteolysis:泛素介导的蛋白质水解;Proteasomes:蛋白酶体;Protein processing in endoplasmic reticulum:内质网蛋白质加工;Nitrogen metabolism:氮代谢;Lysine degradation:赖氨酸降解;Protein export:蛋白质分泌;Lysine biosynthesis:赖氨酸生物合成;Cysteine and methionine metabolism:半胱氨酸和蛋氨酸代谢。

京都基因与基因组百科全书通路注释结果(A);与蛋白质生理代谢功能相关的基因相对丰度(B);氨基酸代谢在HighMP组与LowMP组对比分析(C);其他氨基酸代谢在HighMP组与LowMP组对比分析(D)。* : $P < 0.05$ 。

KEGG pathway annotation (A); relative abundance of genes related to protein physiological metabolism (B); comparative analysis of amino acid metabolism between HighMP group and LowMP group (C); comparative analysis of other amino acids between HighMP group and LowMP group (D). * : $P < 0.05$.

图6 与蛋白质生理代谢功能相关的基因相对丰度分析

Fig.6 Analysis of relative abundance of genes related to protein physiological metabolism



与氨基酸转运与代谢相关的功能基因含量(A);与翻译后修饰、蛋白质转换、蛋白质伴侣相关的功能基因含量(B);与蛋白质降解及氨基酸代谢过程相关基因在 HighMP 组与 LowMP 组对比分析(C~L)。* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ 。

Functional genes related to amino acid transport and metabolism (A); functional genes related to posttranslational modification, protein turner, and chaperones (B); comparative analysis of genes related to protein degradation and amino acid metabolism process between HighMP group and LowMP group (C to L). * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$.

图7 差异基因统计

Fig.7 Statistics of differential genes

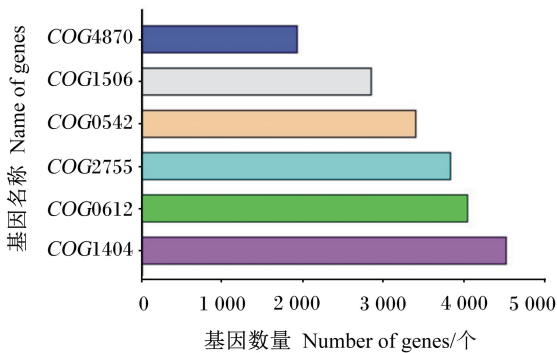


图8 显著差异基因

Fig.8 Significant difference genes

本试验结果显示,HighMP 组微生物在瘤胃内蛋白质降解及氨基酸代谢过程中,COG0542、COG0612、COG1404、COG1506、COG2755、COG4870 的基因数量显著高于 LowMP 组,其中 COG1404 为主要富集基因。结合 eggNOG 数据库分析可知,基因 COG1404、COG0612 在微生物对蛋白质降解过程中通过表达多肽酶发挥功能,基因 COG2755 在氨基酸生理代谢过程中通过表达脂解蛋白 GDSL 发挥作用,基因 COG0542 在微生物对蛋白质降解过程中通过表达 ATP 依赖性 Clp 蛋白酶 ATP 结合亚基发挥作用,基因 COG1506 在

氨基酸生理代谢过程中通过作用于多肽酶 s9 脯氨酰寡肽酶活性位点域蛋白发挥功能,基因 *COG4870* 在氮循环中通过表达组织蛋白酶发挥作用。升高的 *COG0542*、*COG0612*、*COG1404*、*COG1506*、*COG2755*、*COG4870* 基因为 HighMP 组奶牛提供了更好的蛋白质降解及氨基酸代谢能力。以上结果表明,微生物促进了饲料蛋白质向乳蛋白前体物的转化,同时也促进了瘤胃内蛋白质降解及氨基酸代谢的生理过程。HighMP 组奶牛瘤胃内微生物的组成与功能均具有更好地促进乳蛋白前体物合成的能力。

4 结 论

在相同饲料结构及饲养环境下,瘤胃内 *Prevotella ruminicola* 和 *Trigonopsis* 这 2 种微生物相对含量的差异对调节乳蛋白含量具有一定作用;瘤胃内微生物可能通过高表达 *COG0542*、*COG0612*、*COG1404*、*COG1506*、*COG2755*、*COG4870* 基因,增强瘤胃内蛋白质降解及氨基酸代谢作用,影响乳蛋白前体物合成情况,进而调节乳蛋白的产量。

参考文献:

- [1] 马美蓉.提高奶牛乳蛋白率的措施[J].饲料研究,2004(8):35-37.
- [2] 马露,周凌云,卜登攀,等.日粮营养水平对奶牛乳蛋白合成的影响及其作用机理的研究进展[J].中国畜牧兽医,2012,39(10):121-127.
- [3] 张海波.日粮补充棕榈酸对泌乳早期荷斯坦奶牛泌乳性能、血液生化指标和激素水平的影响[J].畜牧兽医学报,2019,50(1):203-210.
- [4] LAPIERRE H, MARTINEAU R, HANIGAN M D, et al. Review: impact of protein and energy supply on the fate of amino acids from absorption to milk protein in dairy cows [J]. *Animal*, 2020, 14 (Suppl.1): S87-S102.
- [5] ZANG Y, SILVA L H P, GHELICHKhan M, et al. Incremental amounts of rumen-protected histidine increase plasma and muscle histidine concentrations and milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet [J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(5):4138-4154.
- [6] 李树聪,王加启.泌乳奶牛小肠可吸收氨基酸来源及其调控[J].中国奶牛,2005(4):14-17.
- [7] 刘公明.小肠可消化必需氨基酸的构成对泌乳奶山羊乳蛋白合成的影响[D].硕士学位论文.泰安:山东农业大学,2017.
- [8] ZHOU Y, SONG F, LI Y S, et al. Double-antibody based immunoassay for the detection of β -casein in bovine milk samples [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(1):167-173.
- [9] 陈文亮,毛仁淡.加热对牛乳中 β -乳球蛋白(β -LG)的影响[J].中国乳业,2006(2):54-55.
- [10] 孙福昱,赵一广,熊北海,等.海带粉对饲喂高精饲料粮奶牛瘤胃发酵参数和菌群结构的影响[J].动物营养学报,2019,31(6):2842-2853.
- [11] 牛化欣,常杰,胡宗福,等.基于组学技术研究反刍动物瘤胃微生物及其代谢功能的进展[J].畜牧兽医学报,2019,50(6):1113-1122.
- [12] 孙会增.基于系统生物学技术解析饲草质量影响奶牛泌乳性能的生理与代谢机制[D].博士学位论文.杭州:浙江大学,2017.
- [13] 田彦.基于高通量测序的中国荷斯坦奶牛瘤胃宏转录组研究[D].博士学位论文.北京:中国科学院北京基因组研究所,2015.
- [14] BLASCO C, PICÓ Y, TORRES C M. Progress in analysis of residual antibacterials in food [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26(9):895-913.
- [15] NASROLLAHI S M, ZALI A, GHORBANI G R, et al. Variability in susceptibility to acidosis among high producing mid-lactation dairy cows is associated with rumen pH, fermentation, feed intake, sorting activity, and milk fat percentage [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2017, 228:72-82.
- [16] 马健, SHAH A M, 王之盛.瘤胃微生物区系的影响因素及其调控措施[J].动物营养学报,2020, 32(5):1957-1964.
- [17] JAMI E, ISRAEL A, KOTSER A, et al. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood [J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(6):1069-1079.
- [18] 逢宾宾,王雨,杨妍,等.健康中国荷斯坦奶牛不同发育阶段瘤胃的菌群多样性研究[J].黑龙江畜牧兽医,2018(5):14-18,261.
- [19] 李子健,李大彪,高民,等.不同生理阶段荷斯坦奶牛瘤胃细菌多样性研究[J].动物营养学报,2018, 30(8):3017-3025.
- [20] MALMUTHUGE N, GUAN L L. Understanding host-microbial interactions in rumen: searching the best opportunity for microbiota manipulation [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2017, 8(2):300-306.
- [21] MARTIN C, FERLAY A, MOSONI P, et al. Inceas-

- ing linseed supply in dairy cow diets based on hay or corn silage: effect on enteric methane emission, rumen microbial fermentation, and digestion [J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(5): 3445–3456.
- [22] XUE M Y, SUN H Z, WU X H, et al. Assessment of rumen bacteria in dairy cows with varied milk protein yield [J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(6): 5031–5041.
- [23] HAZLEWOOD G P, ORPIN C G, GREENWOOD Y, et al. Isolation of proteolytic rumen bacteria by use of selective medium containing leaf fraction 1 protein (ribulosebiphosphate carboxylase) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 45(6): 1780–1784.
- [24] GRUNINGER R J, RIBEIRO G O, CAMERON A, et al. Invited review: application of meta-omics to understand the dynamic nature of the rumen microbiome and how it responds to diet in ruminants [J]. *Animal*, 2019, 13(9): 1843–1854.
- [25] 赵沁沁, 刘军. 变异三角酵母 *D*-氨基酸氧化酶基因的克隆与表达 [J]. *武汉工业学院学报*, 2011, 30(1): 22–25.
- [26] 刘树臣, 谢澜漪, 李春, 等. 热带假丝酵母细胞内 pH 的测定及其与生长代谢活性的关系 [J]. *生物工程学报*, 2004, 20(2): 279–283.
- [27] 吴浪, 卢冬亚, 张艳, 等. 苜蓿干草与苜蓿青贮碳水化合物分子结构特征及其与奶牛瘤胃内细菌含量相关性研究 [J]. *家畜生态学报*, 2019, 40(9): 39–44.
- [28] LEVASSEUR A, DRULA E, LOMBARD V, et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6: 41.
- [29] RICHARDSON C R, HATFIELD E E. The limiting amino acids in growing cattle [J]. *Journal of Animal Science*, 1978, 46(3): 740–745.
- [30] 刘倩, 符潮, 周传社, 等. 反刍动物瘤胃微生物限制性氨基酸代谢研究进展 [J]. *家畜生态学报*, 2017, 38(2): 83–87.
- [31] 李吕木, 乐国伟, 施用晖. 蛋氨酸为氮、碳源对瘤胃微生物氨基酸代谢的影响 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2006, 34(7): 22–26.

Rumen Microorganism Regulating Milk Protein Content in Holstein Dairy Cows Based on Metagenomic Analysis

WU Jianmin WANG Yong ZHOU Xiechen GENG Zijian JIA Daqing
HAN Yang WANG Jianfa* WU Rui*

(Key Laboratory of Prevention and Control of Cattle Diseases in Heilongjiang Province, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: This experiment was in order to study a potential relationship between the milk protein content and rumen microorganism in dairy cows under the same dietary structure and feeding environment. Three Holstein dairy cows with high milk protein content ($>3.7\%$) for a long time and three Holstein dairy cows with low milk protein content (3.0% to 3.3%) for a long time were selected. Their rumen fluid was collected and their regulatory effects were analyzed by macrogenomics. This experiment showed that Bacteroidetes, Bacteroidia, *Prevotella*, Prevotellaceae, Bacteroidales, *Prevotella ruminicola* showed significant differences between the two groups ($P<0.05$), *Prevotella ruminicola* was the main difference microorganism. It was found for the first time that *Trigonopsis* may had a certain effect in regulating milk protein content. There were a significant increase on the relative abundance of functional genes of amino acid metabolism and metabolism of other amino acids in the rumen of dairy cows of high milk protein content for a long time ($P<0.05$); there were a significant increase on the gene number of *COG0542*, *COG0612*, *COG1404*, *COG1506*, *COG2755* and *COG4870* that closely related to protein degradation and amino acid metabolism ($P<0.05$), and the highest concentration of *COG1404* gene was found, which could function through the expression of peptidase. In conclusion, *Prevotella ruminicola* and *Trigonopsis* in rumen under the same dietary structure and feeding environment have a certain effect on the regulation of milk protein content. Through high expression of *COG0542*, *COG0612*, *COG1404*, *COG1506*, *COG2755* and *COG4870* genes, rumen protein degradation and amino acid metabolism are enhanced, which affect the synthesis of milk protein precursors, and then regulate milk protein content. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(8):3843-3855]

Key words: Holstein dairy cows; rumen microorganisms; milk protein; precursor

* Corresponding authors: WANG Jianfa, associate professor, E-mail: 275229746@qq.com; WU Rui, professor, E-mail: fuhewu@126.com