

牦牛乳中上皮粘蛋白 MUC1 的遗传多态性研究

郑玉才¹, 彭先文¹, 钟光辉¹, 毛永江¹, 王永¹, 邹思湘², 陈杰²

(1. 西南民族学院动物科技系, 成都 610041; 2. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

摘要: 采用 SDS-PAGE 研究了 108 头麦洼牦牛和 98 头九龙牦牛乳 MUC1 的生化遗传特性, 结果表明: 牦牛乳 MUC1 呈现出多态性, 表现为一条或两条迁移率不同的区带。SDS-PAGE 分析发现 4 种分子量的 MUC1 区带, 依次为 A: 208 kd, B: 200 kd, C: 196 kd, D: 185 kd, 分子量大于荷斯坦牛。麦洼牦牛乳 MUC1 基因座受 A、B、C、D 4 个复等位基因支配, 有 9 种基因型; 九龙牦牛乳 MUC1 基因座受 A、C、D 3 个复等位基因支配, 显示 5 种基因型。两品种牦牛乳 MUC1 基因型分布差异极显著 ($P < 0.01$), 并且均偏离哈代-温伯格定律 ($P < 0.01$), 麦洼牦牛乳 MUC1 基因座遗传变异程度大于九龙牦牛。

关键词: 牦牛; 乳; MUC1; 多态性

中图分类号: S823.8⁺25

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2002)03-0235-04

MUC1 是一种高度糖基化的膜结合糖蛋白, 分布于多种组织和器官的上皮细胞顶膜, 如乳腺、唾液腺、肾脏、子宫、气管等^[1,2]。在乳分泌过程中, 乳脂以脂肪球的形式通过顶浆分泌进入腺泡腔, MUC1 也随着包裹在脂肪球上的上皮细胞顶膜一同进入乳中, 并主要分布在乳脂肪球膜上^[3]。MUC1 在牛奶中的含量大约为 40 mg/L, 分子量为 180~200 kd。

MUC1 高度糖基化以及分子中富含脯氨酸的特点, 使其在上皮细胞表面呈伸展的细丝状, 长度可达 200~500 nm。研究人员认为这一结构可保护上皮细胞防止微生物入侵及酶等化学物质的破坏作用^[1]。MUC1 分子中含有大量唾液酸成分, 使上皮细胞表面带有强的负电荷。考虑到 MUC1 的分布特点, 它在上皮细胞表面可能在保证导管和腺泡处于开放状态, 以及防止细胞粘连(与肿瘤发生有关)方面有作用^[3,4]。对多种动物乳 MUC1 的研究显示, 它具有特殊的遗传多态性。目前已经研究过的物种中, 除小鼠外, 人、奶牛、山羊、马、豚鼠等动物乳 MUC1 在 SDS-PAGE 上均表现出多态性^[5-7], 可显示出由来自双亲的两个共显性等位基因控制的一条或两条电泳区带。其多态性主要与分子中串联的氨基酸重复序列(20 个左右的氨基酸)的数目不同有关。由于乳 MUC1 分析对研究物种进化和亲缘关

系、疾病防治等具有理论和实际意义, 因此, MUC1 的研究近年来引起研究人员的广泛关注, 目前已对 MUC1 的分子组成和结构、基因结构、基因表达的调控等诸多方面进行了不同程度的研究^[8], 但在牦牛方面尚未见报道。本实验对麦洼牦牛和九龙牦牛乳 MUC1 的遗传多态性进行分析, 以丰富该领域的研究资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物 麦洼牦牛($n=108$)和九龙牦牛($n=98$)乳样分别采于四川省红原县龙日种畜场和九龙县汤古乡, 采集时间分别为 7 月份和 9 月份, 牦牛处于泌乳中期。每头牛手工挤取晨乳, 记录挤奶量, 混匀后每头牛取乳样约 30 ml, 冰冻带回实验室, -20°C 保存至分析。另外于 11 月份在同一牧场对号选择麦洼牦牛, 采集泌乳后期的乳作为 7 月份的对照。

1.2 乳 MUC1 分析方法 少量原乳加入含 β -巯基乙醇的样品缓冲液、指示剂后在沸水浴中处理 5 min。采用垂直板状 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离^[9], 分离胶浓度为 6%, 浓缩胶为 3%, 每孔上样 10 μl 原乳。电泳后的凝胶按 Morrissey(1981)的方法进行银染至显示出清晰的 MUC1 区带^[10], 并根据标准分子量蛋白计算出 MUC1 的分子量。另外采用 Schiff 试剂以及考马斯亮兰染色法^[11], 以比较 MUC1 对不同染色法的敏感性。

1.3 乳成分的分析 乳蛋白、乳糖、乳脂的含量采

收稿日期: 2000-09-17

基金项目: 国家自然科学基金(39870607); 四川省科委及农业部动物生理生化重点实验室资助。

作者简介: 郑玉才(1965-), 男, 河北人, 副教授, 硕士, 主要从事动物泌乳生理生化研究。

用丹麦 Foss 公司的 Milk Scarr-1340A/B 全自动分析仪测定。全乳以 $800 \times g$ 于 $4^\circ C$ 离心 20 min, 获得下层脱脂乳, 经 12.5% 的 SDS-PAGE 在还原条件下分离^[9], 考马斯亮兰 R-250 染色, Beckman CDS-200 光密度扫描得到脱脂乳主要蛋白组分的相对含量。

1.4 主要试剂 丙烯酰胺为 Sigma 产品, 标准分子量蛋白为 Promega 产品, SDS 为 GIBCO BRL 产品, 其余为国产分析纯或生化规格。

1.5 数据统计处理 牦牛日挤乳量校正成 180 d 的产奶量^[12, 13], 即麦洼牦牛 180 d 产奶量 = $120.0 \times$ 日挤乳量; 九龙牦牛 180 d 产奶量 = $176.5 \times$ 日挤乳量。基因杂合度(h)和有效等位基因数(ne)分别为: $h = 1 - \sum X_i^2$, $ne = 1 / \sum X_i^2$, 其中 X_i 表示第 i 等位基因的频率。实验数据采用 SPSS 软件进行统计。

2 结果

2.1 牦牛乳 MUC1 的多态性

乳 MUC1 对银染色十分敏感, 尽管其含量很低, 但染色时比乳中其它蛋白质先着色; Schiff 试剂染色仅能显示淡淡的粉色, 考马斯亮兰 R-250 染色几乎无法显示 MUC1。在 SDS-PAGE 上牦牛乳 MUC1 显示为一条或两条迁移率不同的区带, 见图 1。麦洼牦牛和九龙牦牛乳 MUC1 为一条区带的分别占 45.37% 和 54.08%。另外, 根据同一块凝胶上 MUC1 区带银染色的深浅可以看出, 牦牛乳 MUC1 的含量高于中国荷斯坦牛(图片未显示)。

表 1 麦洼牦牛(n=108)和九龙牦牛(n=98)乳 MUC1 基因型频率和基因频率

Table 1 Genotype and gene frequencies of MUC1 locus in the milk of Maiwa yaks and Jiulong yaks

| 品 种 Breed | 基因型频率 Genotype frequency | | | | | | | | 基因频率 Gene frequency | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | AA | AB | AC | AD | BB | BC | BD | CC | CD | DD | A | B | C | D |
| 麦洼牦牛 Maiwa yaks | 0.2315 | 0.0648 | 0.0926 | 0.2685 | 0.1111 | 0.0185 | 0.0833 | | 0.0185 | 0.1111 | 0.4445 | 0.1944 | 0.0648 | 0.2963 |
| 九龙牦牛 Jiulong yaks | 0.2755 | | 0.0408 | 0.4184 | | | | 0.0204 | | 0.2499 | 0.5051 | | 0.0408 | 0.4541 |

Molecular weight: A: 208 kd, B: 200 kd, C: 196 kd, D: 185 kd

2.2 牦牛乳 MUC1 基因座的遗传特点

本实验显示, 牦牛母女间乳 MUC1 在 SDS-PAGE 上均有一条迁移率相同的区带(图 2); 同一牦牛在泌乳中期和后期其乳 MUC1 的电泳带型完全相同。根据等位基因频率计算乳 MUC1 基因座的基因杂合度和有效等位基因数。结果麦洼牦牛和九龙牦牛的基因杂合度高, 有效等位基因数大, 即它们的遗传变异性较高。另外, 麦洼牦牛乳 MUC1 基

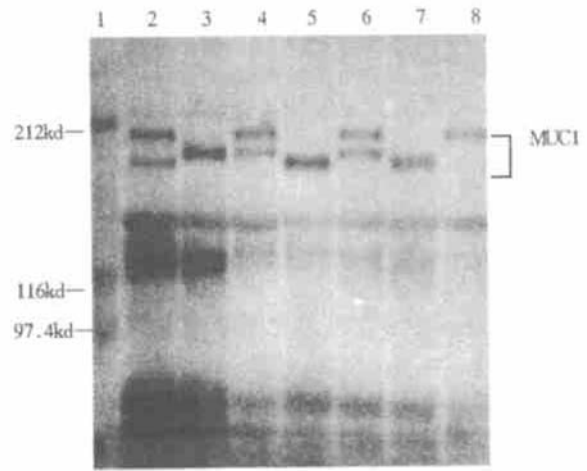


图 1 九龙牦牛乳 MUC1 的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE of MUC1 in the milk of Jiulong yaks
1: Marker; 2-8: yak milk samples with MUC1 genotypes of AD, CC, AC, DD, AC, DD, AA, respectively.

实验共检测出 4 个 MUC1 复等位基因, 编码的 MUC1 分子量分别为 A: 208 kd, B: 200 kd, C: 196 kd, D: 185 kd。麦洼牦牛乳 MUC1 基因型有 9 种, 受 A、B、C、D 4 个复等位基因控制; 九龙牦牛乳 MUC1 基因型有 5 种, 受 A、C、D 3 个复等位基因控制。两品种牦牛乳 MUC1 的 A 和 D 复等位基因占优势, 其基因型频率和基因频率见表 1。适合性 χ^2 检验表明, 两品种牦牛乳 MUC1 基因型分布均偏离哈代-温伯格定律($P < 0.01$)。独立性 χ^2 检验显示, 两品种牦牛乳 MUC1 基因型分布差异极显著。

因座遗传变异性高于九龙牦牛, 结果见表 2。

2.3 牦牛乳 MUC1 多态性与泌乳性能的关系

统计分析表明, 麦洼牦牛乳 MUC1 基因座对其产奶量、乳常规营养成分、乳主要蛋白组分均无显著影响; 九龙牦牛乳 MUC1 基因座 AD 型个体(n=37)乳中 α 乳清蛋白的相对含量显著高于其他基因型的个体($P < 0.05$)。

表 2 牦牛乳 MUC1 的遗传变异
Table 2 Genetic variation of MUC1 in yak milk

| 项目 Item | 麦洼牦牛 Maiwa yaks | 九龙牦牛 Jiulong yaks |
|---|--------------------|----------------------|
| 基因杂合度 Gene heterozygosity | 0.673 | 0.537 |
| 有效等位基因数 Effective number of alleles | 3.055 | 2.160 |

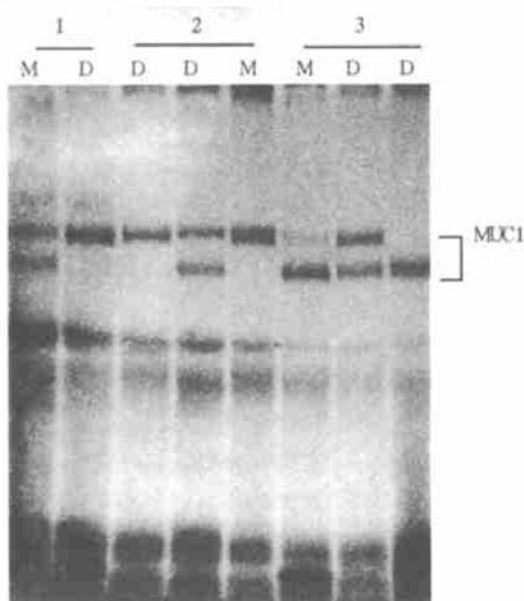


图 2 牦牛母女间乳 MUC1 的电泳图谱

Fig.2 The bands of MUC1 from milk of dams and daughters

M:mother, D:daughter. 1, 2, and 3 stand for three yak families, respectively.

3 讨论

3.1 有关牦牛乳 MUC1 的研究目前尚未见报道。本研究表明, 与其他大多数哺乳动物乳 MUC1 一样^[5-7], 牦牛乳 MUC1 在 SDS-PAGE 上也表现为一条或两条迁移率不同的区带, 呈现出丰富的多态性。大量研究表明, 人、奶牛等动物乳 MUC1 由于基因结构中存在数目可变的串联重复序列而表现出多态性^[9], 推测牦牛乳 MUC1 基因结构中也存在类似结构。Huott 等(1995)对 119 头荷斯坦牛乳 MUC1 进行了分析, 发现了 5 个等位基因, 其 MUC1 分子量分别为 156 kd、177 kd、180kd、189 kd 和 193 kd^[14]。牦牛乳 MUC1 分子量大于荷斯坦牛, 提示其基因结构中可能含有更多的串联重复序列。Campana 等(1992)通过研究证实, 山羊乳 MUC1 的分子量大于

奶牛^[15]。本实验结果也初步显示牦牛乳 MUC1 分子量与其他奶牛品种存在差异。

3.2 遗传变异性分析显示麦洼牦牛乳 MUC1 基因座的遗传变异大于九龙牦牛。蔡立(1990)指出九龙牦牛历史上曾经历过一次大规模的数量减少^[13], 即经历过所谓的“瓶颈效应”, 而且其产地有只输出牦牛而不引进牦牛的习惯, 使九龙牦牛成为一个相对闭锁的群体, 这可能是九龙牦牛乳 MUC1 基因座遗传变异低于麦洼牦牛的重要原因之一。另外, 麦洼牦牛乳 MUC1 基因座具有九龙牦牛中没有的 B 等位基因, 而且二者 MUC1 基因型分布差异极显著, 表明它们具有不同的群体遗传结构, 这为把麦洼牦牛和九龙牦牛划分为不同品种和不同的牦牛类型的观点提供了一个佐证。

3.3 牦牛母女间乳 MUC1 及同一个体在不同泌乳阶段乳 MUC1 电泳特征, 与 Patton 等(1990)和 Campana 等(1992)对奶牛和山羊的研究结果相同^[6, 15], 说明牦牛乳 MUC1 基因座的遗传遵循孟德尔定律, 呈等显性遗传。由于牦牛乳 MUC1 基因座的基因杂合度高, 有效等位基因数大, 多态性丰富, 加上采样方便、分析方法简单, 因此, 乳 MUC1 可能成为一种新的、有效的生化遗传标记, 应用于牦牛数量性状的标记辅助选择及品种分类、亲缘关系研究等领域。但由于乳 MUC1 分析只能在泌乳期进行, 因此从基因水平上开展牦牛 MUC1 多态等方面的研究会有更广泛的应用范围。

3.4 Hens 等(1995)对荷斯坦牛的研究表明, 乳 MUC1 分子量大的个体其乳脂和乳蛋白的含量及产量高^[16]。本实验仅在九龙牦牛中发现 MUC1 的基因型与 α -乳清蛋白的相对含量有关, 但由于每种基因型的样本数量较少, 因此需要扩大样本数进行统计分析才有意义, 这在基因型更为丰富的麦洼牦牛中尤其重要。Patton(1999)分析指出, 基于乳 MUC1 的大小可能与其作为抵抗乳房炎屏障的效率有关的假设, MUC1 的研究对牛乳房炎的防治可能有价值^[3]。牦牛乳 MUC1 分子量较大, 含量高于荷斯坦牛, 是否有更强的抗乳房炎能力值得研究。

参考文献:

- [1] Patton S, Gendler S J, Spicer A P. The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, 1241: 407-424.
- [2] Pemberton L, Taglor-Papadimitriou J, Gendler S J. Anti-

- bodies to the cytoplasmic domain of the MUC1 mucin show conservation throughout mammals[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 185: 167~ 175.
- [3] Patton S. Some practical implications of the milk mucins [J]. *J Dairy Sci*, 1999, 82: 1115~ 1117.
- [4] Schrotten H, Hanisch FG, Plogmann R, et al. Inhibition of adhesion of *S-fimbriated Escherichia Coli* to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction [J]. *Infect Immun*, 1992, 60: 2893~ 2899.
- [5] Patton S, Muller LD. Genetic polymorphism of the epithelial mucin, PAS- I, in milk samples from the major dairy breeds [J]. *J Dairy Sci*, 1991, 175: 863~ 867.
- [6] Patton S, Patton RS. Genetic polymorphism of PAS- I, the mucin-like glycoprotein of bovine milk fat globule membrane [J]. *J Dairy Sci*, 1990, 73: 3567~ 3574.
- [7] Patton S. Detection of large fragment of the human mucin MUC1 in the feces of breast-fed infants [J]. *J Pediatr Gastro Enterol Nutr*, 1994, 18: 225~ 230.
- [8] Lancaster CA, Peat N, Duhig T, et al. Structure and expression of the human polymorphic epithelial mucin gene: an expressed VNTR unit [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 173: 1019~ 1029.
- [9] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680~ 685.
- [10] Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform activity [J]. *Anal Biochem*, 1981, 117: 307~ 310.
- [11] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987, 342~ 343.
- [12] 钟光辉. 九龙牦牛选育研究 [M]. 成都: 四川民族出版社, 1996, 51.
- [13] 蔡立. 四川牦牛 [M]. 成都: 四川民族出版社, 1990, 96~ 99.
- [14] Huott ML, Josephson RV, Hens JR. Polymorphic forms of the epithelial mucin, PAS- I (MUC1), in milk of Holstein cows (*Bos taurus*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1995, 111B: 559~ 565.
- [15] Campana WM, Josephson RV, Patton S. Presence and genetic polymorphism of an epithelial mucin in milk of the goat (*Capra Hircus*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1992, 103B: 261~ 266.
- [16] Hens JR, Rogers GW, Huott ML, et al. Associations of the epithelial mucin, PAS- I, with yield, health, and reproductive traits in Holstein dairy cows [J]. *J Dairy Sci*, 1995, 78: 2473~ 2480.

Genetic Polymorphism of Epithelial Mucin, MUC1, in Milk of Yaks

ZHENG Yurcai¹, PENG Xianwen¹, ZHONG Guanghui¹,

MAO Yongjiang¹, WANG Yong¹, ZOU Sixiang², CHEN Jie²

(1. Department of Animal Science and Technology, Southwest Nationalities College, Chengdu 610041;

2. College of Animal Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: The epithelial mucin, MUC1, in individual milk samples from 108 Maiwa yaks and 98 Jiulong yaks was resolved on SDS-PAGE. Polymorphism of MUC1 consisted of one or two bands showing variable mobility. Mobility indices established for these bands provided evidence of four polymorphic forms according to their molecular weight on SDS-PAGE: A: 208 kd, B: 200 kd, C: 196 kd, D: 185 kd, most of which were higher than that reported in Holstein cows. Milk MUC1 locus of Maiwa yak was controlled by A, B, C, and D alleles, exhibited nine genotypes; while in Jiulong yak was controlled by A, C, and D alleles, exhibited five genotypes. Significant difference of milk MUC1 genotypes distribution, which was not in accordance with Hardy-Weinberg balance in Maiwa yaks or Jiulong yaks, existed between the two yak breeds. The genetic variation of milk MUC1 locus of Maiwa yaks was higher than that of Jiulong yaks.

Key words: Yak; Milk; MUC1; Polymorphism