

德宏水牛乳和荷斯坦牛乳中上皮粘蛋白的遗传多态性*

李卫真¹, 张永云², 杨忠³, 汤守锬⁴, 田建云⁴, 王兴茂⁴, 徐绍宏⁴,
牛自兵⁴, 王强¹, 李乖¹, 李洁玉¹, 朱仁英⁵, 苗永旺^{1**}

- (1. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南农业大学 农科专业基础实验教学中心, 云南 昆明 650201;
3. 云南生物制药有限公司, 云南 昆明 650224; 4. 德宏州潞西市畜牧兽医局, 云南 潞西 678400;
5. 威信县畜牧兽医局, 云南 威信 657900)

摘要: 本文采用 SDS-PAGE 对 56 头云南德宏水牛和 47 头中国荷斯坦牛的乳上皮粘蛋白 MUC1 进行了基因分型。结果表明: 德宏水牛乳和荷斯坦牛乳中的 MUC1 均呈现多态性。德宏水牛乳中共发现 3 种分子量分别为 208, 185, 168 kD 的电泳谱带, 命名为 A, B 和 C 等位基因; 荷斯坦牛乳中共发现 5 种分子量分别为 196, 191, 188, 176, 159 kD 的电泳谱带, 命名为 D, E, F, G 和 H 等位基因。德宏水牛乳 MUC1 基因座 A, B, C 3 个等位基因频率分别为 0.223 2, 0.330 4 和 0.446 4, 群体期望杂合度为 0.647 5; 荷斯坦牛乳 MUC1 基因座 D, E, F, G, H 5 个等位基因频率分别为 0.468 1, 0.010 6, 0.212 8, 0.255 3 和 0.053 2, 群体期望杂合度为 0.674 7。结果揭示德宏水牛乳 MUC1 蛋白与荷斯坦牛乳 MUC1 蛋白遗传组成存在显著差异, 该座位遗传多态性较丰富。

关键词: 水牛; 荷斯坦牛; 乳; 上皮粘蛋白

中图分类号: S 823.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X (2011) 05-0730-04

Genetic Polymorphism of Epithelial Mucin (MUC1) in the Milk of Dehong Buffalo and Holstein Cow in Yunnan

LI Wei-zhen¹, ZHANG Yong-yun², YANG Zhong³, TANG Shou-kun⁴, TIAN Jian-yun⁴,
WANG Xing-mao⁴, XU Shao-hong⁴, NIU Zi-bing⁴, WANG Qiang¹, LI Guai¹,
LI Jie-yu¹, ZHU Ren-ying⁵, MIAO Yong-wang¹

- (1. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Teaching Center of the Basic Experiments of Agricultural Majors, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
3. Yunnan Biological Pharmaceutical Company, Kunming 650224, China; 4. Animal Husbandry and Veterinary Station of Luxi, Luxi 6678400, China; 5. Animal Husbandry and Veterinary Station of Weixin, Weixin 657900, China)

Abstract: In the present study, the epithelial mucin (MUC1) was assayed by using SDS-PAGE in individual milk samples from 56 Dehong buffalo and 47 Holstein cows. The results showed that there were polymorphisms of MUC1 in two populations. Three MUC1 SDS-PAGE bands (baptized allele A, B and C) which were 208, 185 and 168 kD, respectively, were found in Dehong buffalo according to

收稿日期: 2010-10-28 修回日期: 2010-11-24 网络出版时间:

* 基金项目: 云南省应用基础研究计划面上项目 (2007C057M); 云南省应用基础研究重点项目 (2007C0003Z)。

作者简介: 李卫真 (1967-), 女, 云南大理人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事动物生物化学研究。

E-mail: Liwz0906@126.com

** 通讯作者 Corresponding author: 苗永旺 (1964-), 男, 内蒙古通辽市人, 教授, 主要从事动物遗传学研究。

E-mail: yongwangmiao999@yahoo.com.cn

网络出版地址:

their molecular weight, whereas five MUC1 SDS-PAGE bands (baptized allele D, E, F, G and H) which were 196, 191, 188, 176 and 159 kD, respectively, were found in Holstein cows. Allele frequencies for the allele A, B and C were 0.223 2, 0.330 4 and 0.446 4, respectively, and the expected heterozygosity was 0.647 5 in Dehong buffalo, and that allele frequencies for the allele D, E, F, G and H were 0.468 1, 0.010 6, 0.212 8, 0.255 3 and 0.053 2, respectively, and the expected heterozygosity was 0.674 7 in the Holstein cows. The results indicated that the genetic composition at MUC1 locus in Dehong buffalo is different from that of Holstein cow, and there is rich variation at MUC1 locus in Dehong buffalo population.

Key words: buffalo; Holstein cow; milk; MUC1

牛乳中的上皮粘蛋白 (epithelial mucin, MUC1) 是一种相对分子质量高的糖蛋白。在乳分泌过程中, MUC1 随着包裹在乳脂肪球上的上皮细胞顶膜一同进入乳中^[1]。国内外对人、奶牛、牦牛、山羊、小鼠等乳 MUC1 进行了研究^[1-4], 结果显示, 除小鼠外, 其余动物的乳 MUC1 在 SDS-PAGE 上均表现出多态性。乳 MUC1 遗传多态性与某些经济性状有一定的相关性, 例如 PATTON 等报道奶牛乳 MUC1 的分子大小与乳脂率和乳脂产量呈显著正相关^[5]。此外, MUC1 的研究对物种进化、亲缘关系、种群结构、动物遗传育种、疾病防治、繁殖均有一定的理论和现实意义。

德宏水牛是云南省特有的优良地方畜种, 具有体躯高大、结实, 骨骼粗壮, 结构匀称, 具有耐粗饲、持久力、抗病力强等特点。随着农业机械的大量使用, 德宏水牛逐渐退出了农田耕作, 但以德宏水牛做母本, 利用摩拉、尼里等种公牛对其进行杂交改良, 其产乳性能已经得到了较大提高, 因此, 对德宏水牛乳蛋白进行研究, 对揭示其种质特性和进行遗传标记辅助选择具有重要意义。

目前, 研究人员已对德宏水牛的体型外貌、屠宰性能、遗传多样性、乳汁及血清的组分等方面进行了一些研究工作^[6-10], 但对其乳中 MUC1 的遗传特征研究尚未见报道。本文对德宏水牛乳 MUC1 的遗传多态性进行电泳分析, 并与荷斯坦牛乳进行比较, 以期阐明水牛与普通奶牛乳中 MUC1 的差异, 进一步揭示德宏水牛种质遗传特性。

1 材料与方法

1.1 乳样的采集

在云南省德宏州潞西市水牛养殖场采集德宏

水牛乳样 56 份, 在昆明市晋宁县现代奶牛合作社采集荷斯坦牛乳样 47 份, 每个样本 50 mL 左右, 4℃ 携带, -20℃ 保存至分析。

1.2 电泳样品的配制

原乳、含 β -巯基乙醇的样品缓冲液、指示剂 (0.4% 溴酚蓝和甘油) 以 2:1:1 混合。

1.3 乳 MUC1 电泳

电泳样品在沸水浴中处理 5 min, 采用垂直板 SDS-PAGE 进行分离。凝胶厚度为 1 mm, 分离胶浓度为 6%, 浓缩胶浓度 3%, 每个样品槽点样量为 25 μ L, 采用 200 V 电压电泳 4.5 h, 电泳胶按 Morrissey 的方法进行银染^[11]。

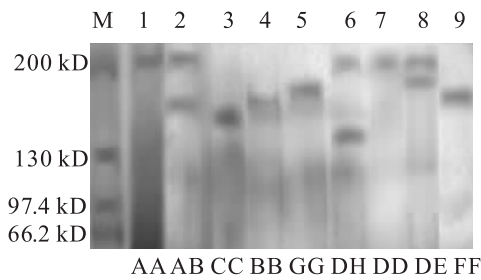
1.4 数据处理

银染结束后, 电泳图谱经 GelDoc™ XR 凝胶成像系统扫描, 采用 BIO-RAD 公司的 Quantity One 软件分析乳 MUC1 分子量。采用 Popgene 1.31 软件^[12] 计算各座位的基因频率、基因型频率和杂合度等参数。

2 结果与分析

乳中 MUC1 的 SDS-PAGE 检测结果见图 1。德宏水牛乳和荷斯坦牛乳 MUC1 对银染敏感, 显色速度高于其他蛋白, 在 SDS-PAGE 上呈现明显的多态性, 每头牛表现为 1 条或 2 条迁移率不同、染色强度相近的区带。该蛋白表现出明显的共显性遗传。

根据 SDS-PAGE 电泳结果, 德宏水牛乳和荷斯坦牛乳 MUC1 共确定 8 种分子量类型, 分别为 208, 185, 168, 196, 191, 188, 176, 159 kD, 将它们分别命名为复等位基因 A, B, C, D, E, F, G, H。在德宏水牛乳中检测到 3 个复等位基因 (即为 A, B 和 C), 4 种基因型 AA, AB, BB, CC; 而在荷斯坦牛乳中检测到 5 个复等位基因



注: M为蛋白质次高分子量标准(kD); 1-4泳道为德宏水牛乳样; 5-9泳道为荷斯坦牛乳样。
Note: M. protein High molecular weight standards (kD); lane 1-4. Milk samples of Dehong buffalo; lane 5-9. Milk samples of Holstein cow.

图 1 德宏水牛乳和荷斯坦牛乳中MUC1的 SDS-PAGE图谱

Fig. 1 SDS-PAGE of MUC1 in the milk of Dehong buffalo and Holstein cow

(即为 D, E, F, G 和 H), 5 种基因型 GG, DH, DD, DE, FF。德宏水牛乳 MUC1 优势基因型为 BB, CC, 具有这两种基因型的个体占试验牛总数的 75%, 优势基因为 C。荷斯坦牛乳 MUC1 优势基因型为 DD, GG, 具有这两种基因型的个体占试验牛总数的 65%, 优势基因为 D。德宏水牛中纯合基因型的比例约为 95%, 而荷斯坦牛约为 87%。本研究中, 水牛和荷斯坦牛未发现共享等位基因。基因型及基因频率结果见表 1 和表 2。

经统计, 德宏水牛乳 MUC1 座位的平均有效等位基因数 (N_e) 为 2.791 3, 期望杂合度 (h) 为 0.647 5, 荷斯坦牛乳 MUC1 座位的平均有效等位基因数 (N_e) 为 3.007 5, 期望杂合度 (h) 为 0.674 7。适合性 χ^2 检验表明, 德宏水牛乳和荷斯坦牛两个群体 MUC1 基因型分布均偏离哈代-温伯格定律 ($P=0.000\ 000$)。

表 1 德宏水牛乳和荷斯坦牛乳 MUC1 基因型频率

Tab. 1 Genotype frequency of MUC1 locus in the milk of Dehong buffalo and Holstein cow

德宏水牛		荷斯坦牛	
Dehong buffalo		Holstein cow	
基因型	基因型频率	基因型	基因型频率
genotype	genotype frequency	genotype	genotype frequency
AA	0.196 4	GG	0.255 3
AB	0.053 6	DH	0.106 4
BB	0.303 6	DD	0.404 3
CC	0.446 4	DE	0.021 3
		FF	0.212 8

表 2 德宏水牛和荷斯坦牛乳 MUC1 基因频率

Tab. 2 Gene frequencies of MUC1 locus in the milk of Dehong buffalo and Holstein cow

德宏水牛		荷斯坦牛	
Dehong buffalo		Holstein cow	
等位基因	基因频率	等位基因	基因频率
number of alleles	gene frequency	number of alleles	gene frequency
A	0.223 2	D	0.468 1
B	0.330 4	E	0.010 6
C	0.446 4	F	0.212 8
		G	0.255 3
		H	0.053 2

3 讨论

本研究发现, 德宏水牛乳 MUC1 有 AA, AB, BB, CC 4 种基因型, 3 个等位基因 A, B, C; 荷斯坦牛乳 MUC1 有 GG, DH, DD, DE, FF 5 种基因型, 5 个等位基因 D, E, F, G, H。德宏水牛乳 MUC1 以相对分子质量约为 168 kD 的 C 等位基因占优势, 荷斯坦牛乳 MUC1 以相对分子质量约为 196 kD 的 D 等位基因占优势。白文林等在对成都地区某奶牛场的中国荷斯坦牛乳 MUC1 的研究中检测到 5 个等位基因, 其相对分子质量依次为 153, 172, 179, 186, 195 kD^[13]; 郑玉才等在对牦牛乳 MUC1 的研究中检测到 4 个等位基因, 其相对分子质量依次为 208, 200, 196, 185 kD^[2]。本研究结果揭示德宏水牛乳的 MUC1 与其他牛种存在显著差异。以往对一些哺乳动物乳的 MUC1 编码基因研究结果揭示, 其基因中含有表达的小卫星序列, MUC1 蛋白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。由此推测, 水牛中 MUC1 编码基因的小卫星序列可能与其他牛种存在差异。至于本研究中荷斯坦牛乳 MUC1 相对分子质量、等位基因数及其频率等与白文林等的研究结果^[13] 存在一些差异, 可能与试验牛的群体及样品数量不同有关, 不同试验的结果也可能反映了其实际的群体遗传结构特性。

研究 MUC1 的同源性和差异性, 对分析物种起源、生物进化、品种鉴定和亲缘关系都有重要的价值^[14]。由于乳 MUC1 多态性丰富, 有效等位基因数大, 加上采样方便, 分析方法简单,

可作为一种新的有效的生化遗传标记,应用于品种亲缘关系和种群结构等的研究。MUC1 高度糖基化并且分子中富含脯氨酸,在上皮细胞表面呈伸展的长细丝状,有人推测这一结构特性可保护上皮细胞防止微生物入侵及酶等化学物质的破坏。PATTON 分析指出,基于乳 MUC1 分子量大小可能与其作为抵抗乳房炎屏障效应的假设有关, MUC1 的研究对牛乳房炎的防治可能有价值^[15]。另外, HENS 等对荷斯坦牛的研究表明,乳 MUC1 相对分子质量大的个体的乳脂、乳蛋白的含量高,乳产量也高^[14]。但本文由于样本数量有限,有关水牛乳 MUC1 相对分子质量大小与生产性能的相关性需要扩大样本数量进行进一步深入研究。本文在 56 头德宏奶水牛乳和 47 头荷斯坦奶水牛乳样中检测到较丰富的 MUC1 多态性,揭示了德宏奶水 MUC1 蛋白与普通奶水的差异以及该座位的群体遗传组成,将为该水牛选育利用提供参考。

[参考文献]

- [1] PATTON S, MULLER L D. Genetic polymorphism of the epithelial mucin, PAS-I, in milk samples from the major dairy breeds [J]. *Journal of Dairy Science*, 1991, 175 (3): 863-867.
- [2] 郑玉才, 彭先文, 钟光辉, 等. 牦牛乳中上皮粘蛋白 MUC1 的遗传多态性研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2002, 33 (3): 235-238.
- [3] COMPANA W M, JOHNSON V G, PATTON S. Presence and genetic polymorphism of an epithelial mucin in milk of the goat (*Capra hircus*) [J]. *Comparative Biochemistry And Physiology B Comparative Biochemistry*, 1992, 103 (1): 261-266.
- [4] JOHNSON V G, GREENWALT D E, HEID H W, et al. Identification and characterization of the principal proteins of the fat-globule membrane from guinea-pig milk [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1985, 151 (2): 237-244.
- [5] PATTON S, SANDRA J G, ANDERW P S. The epithelial MUC1 of milk, mammary gland and other tissues [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, 1241 (3): 407-423.
- [6] 王晓华, 黄启超, 邵俊花, 等. 德宏水牛及其杂交品种体尺测定 [J]. *中国农学通报*, 2007, 23 (1): 21-23.
- [7] 汤守锟, 葛长荣, 曹振辉, 等. 德宏水牛及其不同杂交组合品种屠宰性能研究 [J]. *中国农学通报*, 2007, 23 (2): 31-33.
- [8] 杨泽宇, 苗永旺, 李大林, 等. 德宏水牛微卫星标记分析的群体遗传变异 [J]. *动物学研究*, 2007, 28 (6): 659-663.
- [9] 李卫真, 张永云, 王强, 等. 云南德宏水牛乳基本组分的研究 [J]. *中国奶牛*, 2010 (1): 50-52.
- [10] 王强, 李卫真, 张永云, 等. 云南德宏水牛和奶水牛血清钙, 磷及碱性磷酸酶的测定 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2010, (3): 50-51.
- [11] MORRISSEY J H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity [J]. *Analytical Biochemistry*, 1981, 117 (2): 307-310.
- [12] YE H F C, YANG R C, BOYLE T. POPGENE Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis Release 1.31 [M]. Edmonton: University of Alberta, 1999.
- [13] 白文林, 郑玉才, 王杰, 等. 中国荷斯坦牛牛乳生化组成及乳蛋白遗传多态性 [J]. *四川畜牧兽医*, 2002, 29 (3): 23-24.
- [14] HENS J R, ROGERS G W, HUOTT M L, et al. Association of the epithelial mucin, PAS-I with yield, health, and reproductive traits in Holstein dairy Cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 1995, 78 (11): 2473-2480.
- [15] PATTON S. Some practical implications of the milk mucins [J]. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82 (6): 1115-1117.