

牦牛乳上皮粘蛋白 MUC1 的遗传多态性研究*

郑玉才¹ 赵兴波^{2,3**} 金素钰¹ 彭先文¹ 白文林¹ 李 宁² 吴常信³

1. 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041; 2. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094;

3. 中国农业大学动物科技学院农业部畜禽遗传育种重点开放实验室, 北京 100094

摘要 采用凝胶电泳方法分离牦牛乳上皮粘蛋白 MUC1, 通过比较乳 MUC1 的多态性发现麦洼牦牛、九龙牦牛、天祝白牦牛、青海牦牛和西藏牦牛共 5 个牦牛群 427 头泌乳牦牛乳 MUC1 存在 9 种 MUC1 类型, 蛋白质分子质量范围为 163—208 ku, 普遍大于普通乳牛; 群体遗传变异分析表明牦牛乳 MUC1 的基因频率、基因型频率存在品种间差异, 基因杂合度较大, 根据乳 MUC1 基因频率可将 5 个牦牛品种明显地聚为两类, 提示牦牛乳 MUC1 存在地方类群的特异性。

关键词 牦牛 乳 遗传多态性 MUC1

MUC1(mucin1)是一种膜结合的高分子量糖蛋白, 分布于乳腺、唾液腺、子宫、气管等多种组织和器官的上皮细胞顶膜^[1,2]。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, 在乳中的含量大约为 40 mg/L^[3]。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、普通牛、山羊、马、豚鼠等动物乳 MUC1 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上均表现出多态性^[4-7], 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 20 个左右的氨基酸串联重复序列的数目不同有关。Huott 等对 119 头荷斯坦牛乳 MUC1 进行了分析, 检测到 5 个等位基因, 编码的 MUC1 分子质量分别为 156, 177, 180, 189 和 193 ku^[8]。

有关 MUC1 的功能目前尚不明确。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。有人推测这一结构可保护上皮细胞防止微生物入侵及酶等化学物质的破坏^[6]; Hens 等对荷斯坦牛的研究表明, 乳 MUC1 分子质量大的个体其乳脂、乳蛋白的含量及产量高^[9]。另外,

MUC1 在人和动物生殖方面的作用近年来也引起了研究人员的关注^[10]。作者已经在牦牛、山羊乳中检测到了 MUC1 的多态性^[11,12]。由于 MUC1 是一种罕见的表达串联重复序列, 因此, 开展该领域的研究对于认识基因中串联重复序列的功能有十分重要的理论意义。本实验对中国 5 个主要牦牛品种乳 MUC1 的蛋白多态性进行研究, 为全面认识牦牛的种类特性、生物多样性提供信息, 同时, 对探索牛乳房炎防治的新途径、动物抗病育种、泌乳性能分子标记以及乳腺生物学的研究等也有重要的参考价值。

1 材料与方法

实验动物: 实验牦牛包括麦洼牦牛($n=108$)、九龙牦牛($n=98$)、天祝白牦牛($n=104$)、青海牦牛($n=67$)和西藏牦牛($n=50$)共 5 个牦牛品种。乳样分别采于四川省红原县、四川省九龙县、甘肃省天祝县、青海省玉树和西藏那曲地区。所有牦牛为全天然放牧, 按当地饲养管理方式饲养。在 7—9 月份产奶季节手工挤取乳样, 加入叠氮化钠至终浓度为 0.02%, 冰冻后用冰瓶带回实验室, -20℃ 保存

2005-10-20 收稿, 2005-11-23 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 39870607)和教育部“新世纪优秀人才支持计划”(NCET-04-0135)资助项目

** 通讯作者, E-mail: zhxb@cau.edu.cn

至分析.

乳 MUC1 多态性分析: 参照 Patton 和 Muller 的方法^[4]进行. 全乳加入含 β -巯基乙醇的样品缓冲液, 在沸水浴中处理 5 min, 用 SDS-PAGE 进行分离, 分离胶浓度 6%, 浓缩胶浓度 3%, 每孔上样相当于 10 μ L 原乳. 电泳后进行银染至显示出清晰的 MUC1 区带, 并根据标准分子质量蛋白计算出 MUC1 的分子量.

数据统计处理: 采用 SPSS 软件进行统计分析, 计算基因杂合度和有效等位基因数等.

2 实验结果

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, 但染色时比乳中其他蛋白质先染色. 在 SDS-PAGE 上牦牛乳 MUC1 显示为一条或两条迁移率不同的区带(图 1).

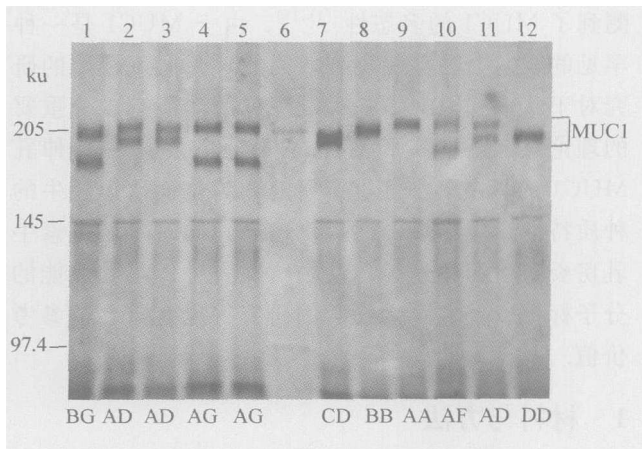


图 1 西藏牦牛乳 MUC1 的 SDS-PAGE 图谱

泳道 6 为蛋白质分子质量标准, 其余为西藏牦牛乳样;

图下字母为 MUC1 表型

实验共检测出 31 种蛋白型(基因型), 9 个等位基因位点(见表 1, 表 2). 5 个牦牛品种中, MUC1 等位基因频率的比率为 $B > F > A > C > G > D > E > H > I$ (见表 2). 优势基因型为: 麦洼牦牛 BB, BF, CC, FF; 九龙牦牛 AF, BB, BF, FF; 天祝白牦牛 BB, BF; 青海牦牛 AG, BB; 西藏牦牛无明显的优势基因型.

在 5 个牦牛品种中, MUC1 为纯合型的比例为: 麦洼牦牛 45.4%, 九龙牦牛 54.1%, 天祝白牦

牛 62.5%, 青海牦牛 44.8%, 西藏牦牛 42.0%. 这种纯合型 MUC1 一般以高分子质量(分子质量 > 200 ku)带型占优势.

表 1 牦牛乳 MUC1 蛋白表型分布

基因型	麦洼牦牛 (n=108)	九龙牦牛 (n=98)	天祝白牦牛 (n=104)	青海牦牛 (n=67)	西藏牦牛 (n=50)
AA	3	7	7	3	2
AC			3		
AD	1			2	5
AE			2	1	1
AF	6	11	4		
AG				16	6
BB	14	21	39	17	5
BC	1		2		
BD	5		1		1
BE	6	4	2	1	
BF	19	30	16		
BG				8	3
BH					2
BI				3	
CC	18		10		6
CD	4				
CE	2				
CF	6		8		
CG					7
CH					3
DD	1			1	3
DE	1			1	
DF	5	1	1		
DG	2			3	1
EE	2	4		1	
EF			2		
EI				1	
FF	12	20	7		
GG				8	2
GI				1	
HH					3

表中数字为样本个体数

表 2 5 个牦牛群乳 MUC1 等位基因频率

等位分子质量 基因 /ku	麦洼牦牛	九龙牦牛	天祝白牦牛	青海牦牛	西藏牦牛
A 208	0.0602	0.1275	0.1106	0.1865	0.1600
B 205	0.2731	0.3878	0.4760	0.3433	0.1600
C 200	0.2269		0.1586		0.2200
D 196	0.0926	0.0051	0.0096	0.0597	0.1300
E 187	0.0602	0.0612	0.0385	0.0448	0.0100
F 185	0.2778	0.4184	0.2067		
G 179	0.0092			0.3284	0.2100
H 172					0.1100
I 163				0.0373	

2.2 牦牛乳 MUC1 的遗传变异

根据等位基因频率计算乳 MUC1 的基因杂合度和有效等位基因数, 结果几个牦牛品种乳 MUC1 的基因杂合度均较高, 有效等位基因数大, 即它们的遗传变异性较高. 九龙牦牛、天祝白牦牛乳 MUC1 的基因杂合度相对较小, 遗传变异小于其他几个品种. 结果见表 3.

表 3 牦牛乳 MUC1 的遗传变异

品种	基因杂合度	有效等位基因数
麦洼牦牛	0.781	4.564
九龙牦牛	0.655	2.894
天祝白牦牛	0.688	3.208
青海牦牛	0.733	3.783
西藏牦牛	0.827	5.787

根据牦牛 MUC1 的等位基因频率对中国 5 个牦牛品种进行了聚类分析. 实验牦牛被分为两大类: 麦洼牦牛首先与天祝白牦牛聚为一类, 再与九龙牦牛聚为一类; 青海牦牛与西藏牦牛聚为另一类. 根据乳 MUC1 分析得到 5 个牦牛品种的欧氏遗传距离和聚类图分别见表 4 和图 2.

表 4 中国 5 个牦牛品种间的欧氏遗传距离

品种	麦洼牦牛	九龙牦牛	天祝白牦牛	青海牦牛	西藏牦牛
麦洼牦牛	0				
九龙牦牛	0.311	0			
天祝白牦牛	0.245	0.274	0		
青海牦牛	0.504	0.541	0.455	0	
西藏牦牛	0.395	0.592	0.473	0.341	0

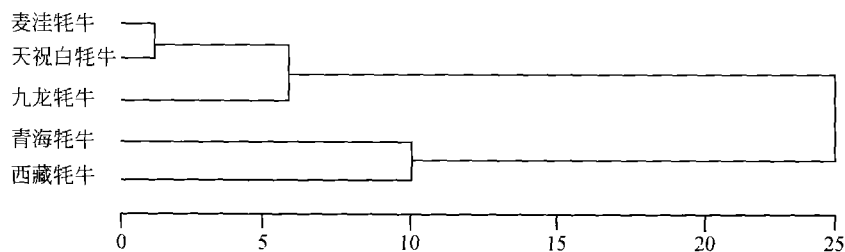


图 2 中国 5 个牦牛品种的聚类图

3 讨论

与其他大多数哺乳动物乳 MUC1 相同^[4-7], 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, 提示牦牛乳 MUC1 基因结构中也存在可变串联重复序列. 本实验中牦牛乳 MUC1 分子质量普遍大于 Holstein 牛^[8], 提示其基因结构中可能含有更多的串联重复序列. 乳 MUC1 的分子大小与其分子中串联氨基酸重复序列的数目有关, 也受糖基结构影响. Huott 等证实^[8], 牛 MUC1 的基因结构是决定其分子质量最主要的因素. 因此, 本研究中确定的 9 种 MUC1 分子质量表型可能代表 9 个基因座.

本研究表明, 九龙牦牛乳 MUC1 基因座的遗传变异小于其他牦牛品种. 这可能与九龙牦牛产地有只输出而不引进牦牛的生产习惯有关, 使九龙牦牛成为一个相对封闭的群体. 另外, 天祝白牦牛乳 MUC1 的基因杂合度也较小, 表明该品种相对较纯. 这一结果与天祝白牦牛特有的单一毛色特征一

致. 本研究根据乳 MUC1 等位基因频率计算了 5 个牦牛品种间的遗传距离并进行了聚类分析, 5 个牦牛品种可分为两类: 麦洼牦牛、天祝白牦牛、九龙牦牛聚为一类, 而青海牦牛、西藏牦牛聚为另一类. 从生态地理条件来看, 九龙牦牛生活在高山地区, 而麦洼牦牛、天祝白牦牛生活在高原地区, 它们聚为一类可能与麦洼牦牛育种中引入过九龙牦牛有关. 有学者根据生态条件、外貌特征等把中国牦牛划分为横断高山型(简称高山型或山谷型)和青藏高原型(简称高原型或草地型)两个大的生态类型. 九龙牦牛和麦洼牦牛分别属于高山型和高原型. 本研究中九龙牦牛与麦洼牦牛显示出类似的乳 MUC1 表型, 结果与上述分类不完全一致. 由于乳 MUC1 多态性丰富, 有效等位基因数大, 是个表达的微卫星序列^[13], 因此, 采用 MUC1 进行品种表型特性分析有一定优势. 本研究中牦牛乳 MUC1 基因座的基因杂合度高, 有效等位基因数大, 多态性丰富, 因此, 乳 MUC1 可能成为一种新的、有效的遗传标记, 可应用于牦牛数量性状的标记辅助选择及品种

分类等。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乳 MUC1 多态性研究有更广泛的应用范围。近年来有关普通牛和山羊乳 MUC1 基因多态性已有一些报道^[14,15]。

MUC1 存在于哺乳动物的许多组织中, 其分子中含有大量唾液酸成分, 使上皮细胞表面带有大量负电荷, 可能有助于保证导管和腺泡处于开放状态和防止细胞粘连^[3]。还有研究人员推测乳 MUC1 的大小可能与其作为抵抗乳房炎屏障的效率有关^[3]。因此, 乳 MUC1 的研究对牛乳房炎的防治可能有潜在的应用价值。而牦牛乳 MUC1 分子质量较大, 这是否使牦牛具有更强的抗乳房炎能力值得研究。本研究获得的有关中国几个主要牦牛品种乳 MUC1 多态性结果, 对于认识牦牛地方品种或类群的特异性以及牦牛的改良具有一定意义。

参 考 文 献

- Patton S, Gendler S J, Spicer A P. The epithelial MUC1 of milk, mammary gland and other tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1241: 407—424
- Pemberton L, Taglor-Papadimitriou J, Gendler S J. Antibodies to the cytoplasmic domain of the MUC1 mucin show conservation throughout mammals. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 185: 167—175
- Patton S. Some practical implications of the milk mucins. *J Dairy Sci*, 1999, 82: 1115—1117
- Patton S, Muller D. Genetic polymorphism of the epithelial mucin, PAS-I, in milk samples from the major dairy breeds. *J Dairy Sci*, 1992, 75: 863—867
- Patton S. Detection of large fragment of the human mucin MUC1 in feces of breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1994, 18: 225—230
- Johnson V G, Greenwalt D E, Held H W, et al. Identification and characterization of the principal proteins of the fat-globule membrane from guinea-pig milk. *Eur J Biochem*, 1985, 151: 237—244
- Patton S, Patton R S. Genetic polymorphism of PAS-I, the mucin-like glycoprotein of bovine milk fat globule membrane. *J Dairy Sci*, 1990, 73: 3567—3574
- Houtt M L, Josephson R V, Hens J R, et al. Polymorphic forms of the epithelial mucin, PAS-I (MUC1), in milk of Holstein cows (*Bos taurus*). *Comp Biochem Physiol*, 1995, 111B: 559—565
- Hans 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 Dairy Sci*, 1995, 78: 2473—2480
- Goulart L R, Vieira G S, Martelli L, et al. Is MUC1 polymorphism associated with female infertility? *Reprod Biomed Online*, 2004, 8(4): 477—482
- 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. *畜牧兽医学报*, 2002, 3: 235—238
- 彭先文, 钟光辉, 郑玉才, 等. 山羊乳中上皮粘蛋白 MUC1 的遗传多态性. *动物学研究*, 2002, 23(1): 15—18
- Lancaster C A, Peat N, Duhig T, et al. Structure and expression of the human polymorphic epithelial mucin gene: An expressed VNTR unit. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 173: 1019—1029
- Rasero R, Sacchi P, Rosati S, et al. Molecular analysis of the length polymorphic MUC1 gene in cattle. *J Anim Breed Genet*, 2002, 119: 342—349
- Sacchi P, Caroli A, Cauvin E, et al. Analysis of the MUC1 gene and its polymorphism in *Capra hircus*. *J Dairy Sci*, 2004, 87(9): 3017—3021