

DOI:10.3969/j.issn.1000-7083.2011.04.008

山羊乳上皮黏蛋白 MUC1 基因和蛋白多态性的研究

黄林¹, 王永², 隗笑¹, 杨发龙¹, 徐亚欧¹, 郑玉才^{1*}

(1. 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041; 2. 西南民族大学

青藏高原动物遗传资源保护与利用四川省重点实验室, 成都 610041)

摘要: 本研究的目的是从基因水平上检测四川省地方山羊品种乳上皮黏蛋白 MUC1 的遗传多态性。根据 GenBank 中山羊 MUC1 部分基因序列设计引物, 用 PCR 方法扩增出山羊 MUC1 基因的不同数目串联重复区, 长度为 1.7 ~ 2.2 kb。在 4 个地方山羊品种(品系)中共检测到 3 个乳 MUC1 等位基因和 5 种基因型, 其中纯合型的比例高, 基因型和基因频率存在品种(品系)间的差异。本研究为检测山羊乳 MUC1 遗传多态性提供了可靠的方法。

关键词: 山羊; 乳; MUC1; 遗传多态性

中图分类号: S827; Q51; Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2011)04-0596-03

Polymorphisms of Milk Epithelial MUC1 Gene and Protein of Goat

HUANG Lin¹, WANG Yong², KUI Xiao¹, YANG Fa-long¹, XU Ya-ou¹, ZHENG Yu-cai^{1*}

(1. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 2. The Qinghai-Tibet Plateau Animal Genetic Resources Protection and Utilization of Sichuan Province Key Laboratory, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: The objective of the study was to examine the genetic polymorphisms of milk MUC1 gene of goat breeds in Sichuan province. Using primers designed according to partial sequences of goat MUC1 gene from GenBank, a PCR method was established to amplify the variable number tandem repeats of goat MUC1 gene. The amplified fragment was 1.7 ~ 2.2 kb in length. A total of 3 alleles and 5 genotypes were detected in the four goat breeds studied, with high proportion of homozygote, and there were differences in genotype and allele frequencies among the goat breeds. Our experiment has provided a reliable protocol for assaying genetic polymorphisms of goat milk MUC1.

Key words: goat; milk; MUC1; genetic polymorphism

乳上皮黏蛋白 MUC1 是乳中微量的、高度糖基化的高分子量蛋白, 在很多已经研究的哺乳动物中均存在分子量多态性(Patton & Muller, 1992), 但其功能目前尚不清楚, 有人推测 MUC1 可能具有抗某些病原微生物的作用(Patton, 1999; Kvistgaard *et al.*, 2004)。近年来我们先后对牦牛、山羊、猪等动物乳中 MUC1 的多态性进行了分析, 发现乳 MUC1 多态性丰富, 是群体遗传结构分析中有潜在应用价值的表达小卫星序列(彭先文等, 2002; 郑玉才等, 2006; Zheng *et al.*, 2006; 张水滨等, 2010)。MUC1 的多态性源于其基因结构中第 2 外显子存在 60 个碱基(编码 20 个氨基酸)的可变串联重复序列(Patton, 1999)。

由于乳 MUC1 多态性分析仅限于泌乳期的雌性

哺乳动物, 因此研究人员近年来采用 PCR 方法从基因水平上检测乳 MUC1 多态性, 在普通牛、牦牛、山羊和绵羊等动物上均取得了令人满意的结果(Rasero *et al.*, 2002, 2007; Sacchi *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2009)。山羊乳 MUC1 等位基因分子量大, 等位基因之间分子量差异相对较小, 蛋白水平上的准确判型有一定困难(郑玉才等, 2006)。本研究采用 PCR 方法对四川省几个地方山羊品种(品系)乳 MUC1 多态性进行分析, 以期对山羊品种的多态性和种群结构分析等提供可靠的方法。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

分别在四川省乐至、简阳、自贡、南江等县市选

收稿日期: 2010-10-30 接受日期: 2010-12-10 基金项目: “十一五”国家科技支撑计划课题(No. 2008BAD3B01)

作者简介: 黄林(1979~), 男, 硕士研究生, 主要从事动物遗传育种学研究

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yucaizheng@sohu.com

择健康的乐至黑山羊 ($n = 45$)、简阳大耳羊 ($n = 31$)、自贡黑山羊 ($n = 27$) 和南江黄羊 ($n = 22$)，颈静脉采血，肝素抗凝，用于基因组 DNA 的提取。其中乐至黑山羊样品中包括 22 个背最长肌和 23 个抗凝血样品。实验还同时采集了乐至黑山羊部分样品对应的乳样 ($n = 22$)，所有样品用冰瓶带回实验室， -20°C 保存备用。

1.2 主要试剂和仪器

主要试剂包括 TaKaRa Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0、TaKaRa LA Taq 酶，均购自宝生物(大连)有限公司，SDS 为美国 GIBCO BRL 产品。主要仪器包括 Bio-Rad 公司的 PowerPac 3000 电泳仪、MP3 垂直电泳槽、Versa Doc1000 凝胶成像系统，以及日本日立 CR22g 高速冷冻离心机、英国 Biochrom 公司的 WPA Biowave 核酸蛋白检测仪、德国 Eppendorf 公司的 Mastercycler EP 梯度 PCR 仪。

1.3 基因组 DNA 的提取

山羊基因组 DNA 采用 DNA 提取试剂盒从抗凝血或肌肉组织中提取，核酸蛋白检测仪测定浓度。

1.4 乳 MUC1 基因可变串联重复序列多态性分析

根据 GenBank 中山羊 MUC1 基因的部分 DNA 序列 AY388993、AY388994 和牛 MUC1 基因部分 DNA 序列 AF399757，采用 Primer Premier 软件设计 PCR 引物：Gmuc1-F：5'-CCCAACGTCCAGTCCCA-3'，Gmuc1-R：5'-ATGGAGTGCCCTTGCTGA-3'。上、下游引物均位于第 2 外显子中，扩增区域为 AF399757 序列中 627 ~ 1462，为第 2 外显子的部分序列，扩增长度由于其中的串联序列长度不同而异。引物由上海 Invitrogen 公司合成。

PCR 反应体系：超纯水 5.3 μL ，2 \times GC buffer 12.5 μL ，dNTP 4.0 μL ，上、下游引物各 1 μL ，DNA 1 μL ，LA Taq 酶 0.2 μL 。扩增条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min，10 个循环；95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min，25 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min；4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离，并根据 DNA marker 计算分子量。

1.5 乳蛋白 MUC1 多态性分析

采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析山羊乳 MUC1 的多态性 (Patton & Muller, 1992)。取全乳与含 β -巯基乙醇的上样缓冲液按照 1:3 混合，沸水浴 5 min，快速离心后上样 2 μL 。分离胶浓度 6%，浓缩胶浓度 3%，电泳后按 Morrissey (1981) 的方法银染，同时根据标准分子量

蛋白计算乳 MUC1 的分子量。

2 结果

2.1 山羊乳 MUC1 基因的多态性

本研究设计的 PCR 引物能扩增出山羊乳 MUC1 的基因片段，大小在 1.7 ~ 2.2 kb 之间 (封 3, 图 1)。实验共检测到由 3 个 MUC1 等位基因 (A、B、C) 形成的 5 种基因型，其中纯合型的比例除了简阳大耳羊相对较低 (77.4%) 外，其他 3 个品种 (品系) 均在 90% 以上。4 个山羊品种 (品系) 乳 MUC1 的基因型和基因频率分布存在差异，但优势基因型和基因相同，分别为 BB 型和 B 等位基因 (表 1, 表 2)。

表 1 山羊乳 MUC1 基因型频率
Table 1 Genotype frequencies of milk MUC1 locus in goats

基因型	乐至黑山羊	简阳大耳羊	自贡黑山羊	南江黄羊
AA			0.0370	
AB		0.1613		
BB	0.9111	0.7419	0.9260	0.6818
BC	0.0889	0.0645	0.0370	
CC		0.0323		0.3182

表 2 山羊乳 MUC1 基因频率
Table 2 Gene frequency of milk MUC1 locus in goats

等位基因	乐至黑山羊	简阳大耳羊	自贡黑山羊	南江黄羊
A		0.0806	0.0370	
B	0.9556	0.8549	0.9444	0.6818
C	0.0444	0.0645	0.0186	0.3182

2.2 山羊乳 MUC1 蛋白的多态性

利用 SDS-PAGE 和银染方法能方便地获得乐至黑山羊乳 MUC1 的图谱 (封 3, 图 2)。乐至黑山羊乳 MUC1 显示 1 条或 2 条带，结合 PCR 方法对同一样品 MUC1 基因型的检测结果，乳 MUC1 蛋白有 B、C 两种带型，分子量分别约为 243 kD 和 220 kD。在 22 个乐至黑山羊样品中，SDS-PAGE 显示的仅有 1 个样品乳 MUC1 蛋白表型为 BC 型，其余均为 BB 型，与基因型分析结果吻合。根据乐至黑山羊同一个体 MUC1 基因型和蛋白表型的比对，发现在 SDS-PAGE 上迁移率有微小差异的个体，其基因型实际上是相同的 (图 2 中第 7 泳道样品与其他泳道样品的基因型相同)。

3 讨论

乳 MUC1 的功能目前仍不清楚，但近年来的研究初步显示，纯化的 MUC1 在体外具有抑制病毒的功能，还能结合细菌从而阻止其与上皮细胞的结合，

可能在乳腺的自身防卫或保护新生幼仔胃肠道健康方面有作用(Habte *et al.*, 2007; Sando *et al.*, 2009; Parker *et al.*, 2010)。本研究建立了 PCR 方法从基因水平上分析山羊乳 MUC1 的多态性,为检测包括公羊在内的不同年龄山羊 MUC1 遗传多态性提供了可靠的方法。乳 MUC1 多态性的分析对于了解山羊的群体遗传结构,或许对今后检测不同分子量 MUC1 的生物学活性有潜在的价值。我们曾利用 Sacchi 等(2004)研究中设计的 PCR 引物扩增本试验山羊 MUC1 的基因序列,但未获得预期结果,推测可能与不同山羊品种 MUC1 基因存在差异有关。

本研究同时检测了乐至黑山羊部分样品 MUC1 基因和蛋白的多态性,发现尽管个别样品的乳 MUC1 在 SDS-PAGE 上的迁移率存在微小的差异(封 3,图 2),但利用 PCR 方法扩增的基因片段大小相同。我们认为这是由于乳 MUC1 的糖基化程度不同造成的(Patton & Muller, 1992),并非不同的基因型,否则群体中应该有较多的 MUC1 杂合体,但实际上几个山羊品种(品系)MUC1 纯合度很高(表 1)。因此,从基因水平上检测 MUC1 多态性更可靠。但需要注意的是,由于山羊乳 MUC1 等位基因之间的分子量差异相对较小,因此对电泳分离的分辨率要求也比较高。

本研究中检测到的山羊乳 MUC1 等位基因比我们以前在其他山羊品种中检测到的少(彭先文等, 2002;郑玉才等,2006),其原因一方面可能与采用的分析方法不同有关,另一个主要的方面可能与样品来源有关。本研究中的山羊样品采集范围小,可能小的群体相对纯合,以前在成都麻羊上就发现过类似情况(彭先文等,2002;郑玉才等,2006)。因此,如果进行群体遗传结构分析,则要求样品来源有代表性。本研究获得的几个山羊品种(品系)MUC1 多态性信息对相应群体的选育有一定参考价值。

4 参考文献

彭先文, 钟光辉, 郑玉才, 等. 2002. 山羊乳中上皮粘蛋白 MUC1 的

- 遗传多态性[J]. 动物学研究, 23(1): 15~18.
- 张水滨, 黄卫平, 薛楠, 等. 2010. 猪乳中上皮黏蛋白 MUC1 和一组高分子量蛋白多态性的研究[J]. 农业生物技术学报, 18(3): 514~518.
- 郑玉才, 王杰, 白文林. 2006. 山羊乳上皮黏蛋白 MUC1 的遗传多态性及其在进化分析中的应用[J]. 畜牧兽医学报, 37(10): 967~971.
- Habte HH, Kotwal GJ, Lotz ZE, *et al.* 2007. Antiviral activity of purified human breast milk mucin[J]. Neonatology, 92(2): 96~104.
- Kvistgaard AS, Pallesen LT, Arias CF, *et al.* 2004. Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections[J]. Journal of Dairy Science, 87: 4088~4096.
- Morrissey JH. 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity[J]. Analytical Biochemistry, 117(2): 307~310.
- Patton S, Muller LD. 1992. Genetic polymorphism of the epithelial mucin, PAS-I, in milk samples from the major dairy breeds[J]. Journal of Dairy Science, 75(3): 863~867.
- Patton S. 1999. Some practical implications of the milk mucins[J]. Journal of Dairy Science, 82: 1115~1117.
- Parker P, Sando L, Pearson R, *et al.* 2010. Bovine MUC1 inhibits binding of enteric bacteria to Caco-2 cells[J]. Glycoconjugate Journal, 27(1): 89~97.
- Rasero R, Sacchi P, Rosati S, *et al.* 2002. Molecular analysis of the length polymorphic MUC1 gene in cattle[J]. Journal of Animal Breeding and Genetics, 119: 342~349.
- Rasero R, Bianchi L, Cauvin E, *et al.* 2007. Analysis of the sheep MUC1 gene: structure of the repetitive region and polymorphism[J]. Journal of Dairy Science, 90: 1024~1028.
- Sacchi P, Caroli A, Cauvin E, *et al.* 2004. Analysis of the MUC1 gene and its polymorphism in *Capra hircus*[J]. Journal of Dairy Science, 87(9): 3017~3021.
- Sando L, Pearson R, Gray C, *et al.* 2009. Bovine MUC1 is a highly polymorphic gene encoding an extensively glycosylated mucin that binds bacteria[J]. Journal of Dairy Science, 92(10): 5276~5291.
- Zheng YC, Zhao XB, Jin SY, *et al.* 2006. Genetic polymorphisms of milk epithelial mucin of yaks[J]. Progress in Natural Science, 16(11): 1222~1226.
- Zheng Y, Fan Q, Liu Y, *et al.* 2009. Analysis of yak MUC1 protein polymorphisms and the corresponding VNTR structure[J]. Animal Biotechnology, 20(4): 231~237.