

DOI:10.11918/j.issn.0367-6234.201511048

水牛和奶牛乳脂肪球膜蛋白组成和功能性的比较

姬晓曦, 马 莺

(哈尔滨工业大学 化工与化学学院, 哈尔滨 150090)

摘要: 为比较不同乳源的乳脂肪球膜蛋白(MFGMPs)蛋白质组成、含量和功能差异,用 iTRAQ 技术对水牛和奶牛 MFGMPs 进行分离、比较.采用 Nano-HPLC-MS 联合 Q-Exactive 的方法,对 MFGMPs 进行分离和鉴定,共鉴定出 $FDR \leq 0.01\%$ 的蛋白质 424 个,差异极显著蛋白 146 个,其中 2 倍(水牛/奶牛)上调蛋白 20 个,下调蛋白 25 个.水牛 MFGMPs 差异蛋白为磷酸钠溶质载体蛋白和 γ -谷氨酰转肽酶,这两种蛋白具有载体和催化活性,为生物体的合成、代谢提供基本组分.奶牛 MFGMPs 差异蛋白为黄嘌呤氧化还原酶和嗜乳脂蛋白,这两种蛋白属于结合蛋白,具有抑制肿瘤细胞的功能特性.结果表明,奶牛和水牛 MFGMPs 中部分功能性蛋白在含量上存在一定的差异.

关键词: 奶牛;水牛;MFGMPs;蛋白质组;功能特性;iTRAQ

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2017)08-0104-05

Comparison of the protein compositions and functional properties for bovine and buffalo MFGMPs

JI Xiaoxi, MA Ying

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: The iTRAQ techniques were used to separate and identify milk fat globule membrane proteins (MFGMPs) from bovine and buffalo milk to compare the differences among composition, contents and functional properties of them. MFGMPs were separated and analyzed by Nano-HPLC tandem MS (MS/MS) analysis coupled with Q-Exactive. The results showed that 424 proteins were identified ($FDR \leq 0.01\%$). The contents of 146 proteins were significantly different between MFGMPs bovine and buffalo in these identified proteins. Among these different proteins, there were 20 up regulated proteins and 25 down regulated proteins by two times (buffalo/bovine). The contents of sodium phosphate solute carrier protein and γ -glutamyl transpeptidase are significantly higher in buffalo MFGMPs than in bovine MFGMPs. The two proteins possess carriers and catalytic activities, and serve as the basic composition of biosynthesis and metabolism. The contents of xanthine oxidoreductase and butyrophilin are significantly higher in bovine MFGMPs than in buffalo MFGMPs. The two proteins, identified as binding protein, can inhibit the growth of tumor cell. The results showed that the significant differences of content existed in some functional protein between the MFGMPs of buffalo and bovine.

Keywords: cow; buffalo; MFGMPs; proteome; functional properties; iTRAQ

乳脂肪球由乳腺上皮分泌细胞形成,先在细胞内质网形成乳脂肪球前体,并从细胞质基质中穿过形成小的脂肪液滴,然后由极性脂质和蛋白质组成的非双分子层物质包裹起来,最终形成乳脂肪球^[1],这层非双分子层物质,即为乳脂肪球膜(MFGM).MFGM 由磷脂、鞘脂类、糖脂、胆固醇和蛋白质组成^[2],具有抑制癌细胞^[3]、治疗孤独症^[4]、抗菌^[5]、抗黏附性^[6]等功能.目前已分离并纯化出的奶牛 MFGMPs 主要有黏蛋白、黄嘌呤氧化酶、嗜乳脂蛋白、脂肪分化相关蛋白、脂肪酸结合蛋白等 40 多

种蛋白质^[7].随着蛋白质组学技术的发展,人们对 MFGM 蛋白的组成和特性有了新的认识.近年来对奶牛 MFGM 蛋白的研究较多,但是关于水牛 MFGM 蛋白的组成和特性的研究鲜有报道.

同位素相对和绝对定量标记(iTRAQ)技术是一种在同位素亲和标记(iCAT)技术的基础上发展起来的,可同时标记 8 种蛋白质样品.该技术对样品的氨基基因进行标记,经串联质谱分离后,通过查询数据库对结果蛋白进行定性定量分析.iTRAQ 技术能鉴定任何类型的蛋白,灵敏度高,对结果蛋白可定性定量并分析其功能特性^[8].

近年来,iTRAQ 技术在蛋白质组学领域获得了广泛的应用.Shi 等^[9]用 iTRAQ 结合 LC-MS/MS 的方法,比较了非油性酿酒酵母和产油白色隐球酵母、

收稿日期: 2015-11-13

基金项目: 国家自然科学基金(30871953)

作者简介: 姬晓曦(1983—),女,博士研究生;

马 莺(1961—),女,教授,博士生导师

通信作者: 马 莺, maying@hit.edu.cn

圆红冬孢酵母的不同脂质积累阶段的蛋白质组,生长初期分离出 132 个蛋白,中、后期分别分离出 122 个和 116 个。Wu 等^[10]对 DIGE (荧光差异凝胶电泳)、iCAT 和 iTRAQ 技术进行了比较。结果表明, iTRAQ 技术可以鉴定出 iCAT 技术不能表达的蛋白和超出 DIGE 技术使用范围的蛋白,且 iTRAQ 技术具有分离鉴定的蛋白质种类更广、数量更多、灵敏度更高、误差更小等优点^[11]。

本文采用 iTRAQ 联合液相色谱串联质谱技术对奶牛和水牛 MFGM 蛋白质组进行混标、分离及精确定量蛋白质组分,并通过数据库和分析软件,查询、分析蛋白质组的详细信息,进一步讨论差异性蛋白的生物学特性,目的是对奶牛和水牛 MFGMPs 组成和特性进行深入了解,为 MFGMPs 的开发、利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

仪器: TripplTOFTM5600 质谱仪 (AB SCIEX)、AKTA Purifier 100 纯化仪 (GE Healthcare)、600 V 电泳仪 (GE Healthcare EPS601)。

药品: iTRAQ 8 标试剂盒 (AB SCIEX)、BCA 蛋白定量试剂盒 (Pierce)、乙腈 (Acetonitrile)、丙烯腈 (默克)、C18 Cartridge (66872-U sigma)。

1.2 样品采集

奶牛乳取自黑龙江省哈尔滨市牧场,水牛乳取自广西壮族自治区水牛研究所。本实验奶样为 50~80 头不同泌乳期的牛乳混合样。样品取出后 12 h 内送入实验室进行分离实验。

1.3 MFGMPs 的分离和蛋白含量的测定

参照 Pisanu 等^[12]方法用酸沉将酪乳中的 MFGMPs 沉淀,高速离心分离出来,冻干备用。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定样品中的蛋白质浓度。

1.4 SDS-PAGE 电泳分离 MFGM 样品

取过滤后的样品,加入上样缓冲液(样品:缓冲液=5:1 (v/v)),沸水浴后高速短时离心,取上清进行 SDS-PAGE 电泳分离(14 mA×90 min),分离胶片进行考马斯亮蓝染色。

1.5 联合纳升液相色谱和串联质谱分析

1.5.1 酶解、肽段定量及标记

样品加入 DTT,沸水浴。冷却后依次加入尿素缓冲液、UA 缓冲液和 IAA 溶液,离心。依次加入尿素缓冲液和溶解缓冲液,离心后振荡。静置过夜后离心,OD280 肽段定量^[13]。根据 iTRAQ 8 标试剂盒说明书对样品进行标记,奶牛和水牛样品分别被标记为 113 和 115。

1.5.2 毛细管高效液相色谱和质谱分析

采用纳升流速 HPLC 液相系统 Easy Nano-LC 分离。色谱柱以 95% 的缓冲液 A (0.1% 甲酸水溶液) 平衡,样品富集到上样柱 (2 cm×100 μm, 5 μm-C18),再经过分析柱 (75 μm×100 mm, 3 μm-C18) 分离肽段。在质荷比为 300~1800 m/z 进行 1 次全扫描的质谱分析,检测正离子,时长 240 min。

1.5.3 数据分析

采用 Proteome Discoverer 1.4 和 Mascot 2.2 对肽段报告离子峰强度值进行定量分析。用数据库 uniprot_cetartiodactyla.fasta 查询蛋白质组的信息。

2 结果与讨论

2.1 蛋白质定量及 SDS-PAGE 电泳分离

采用 BCA 试剂盒测定奶牛和水牛 MFGMPs 浓度分别为 10.8 μg/μL 和 3.13 μg/μL。MFGMPs 样品的 SDS-PAGE 分离如图 1 所示。图 1 中 A 为奶牛 MFGM 蛋白, B 为水牛 MFGM 蛋白。

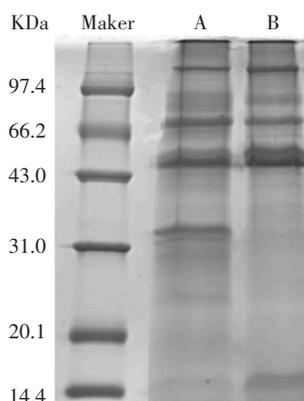


图 1 奶牛和水牛 MFGM 蛋白样品的 SDS-PAGE 分离

Fig.1 SDS-PAGE of MFGMPs from bovine and buffalo

由图 1 可见,奶牛和水牛 MFGMPs 在 97.4~66.2 kDa 和 35.0~20.1 kDa 两个区段条带数目有明显的差异,在 66.2~43.0 kDa 和 15.0~14.4 kDa 两个区段条带深浅有明显差异。说明两组样品的蛋白质在种类和含量上均存在差异,在进一步研究中,采用二维质谱和质谱联用技术对 MFGMPs 的组成及相对含量进行分离和鉴定的进一步分析。

2.2 奶牛和水牛乳脂肪球膜蛋白质组的生物信息

奶牛和水牛 MFGMPs 经质谱分析和数据分析共定量鉴定出奶牛 MFGMPs 为 424 个,水牛为 422 个。Ma^[14]采用无标记法定量测定出奶牛 MFGMPs 为 460 个,水牛为 330 个。本研究测定出的蛋白质有 407 个具有功能性。对于蛋白质功能性的分类参照基因本体 (gene ontology, GO) 的方法进行^[15] (图 2),涵盖生物学的 3 个方面:即分子功能、细胞组分和生物过程。

从图 2 的结果可以看出,具有催化活性和蛋白质结合功能的蛋白最多,其次为核苷酸结合域;46.46%的蛋白质参与了生物代谢过程,其次是应激反应和生物过程调节;分别有 43.40%和 42.69%的蛋白质处在细胞膜和细胞质中。

在水牛 MFGMPs 中未检出开创性核糖核酸酶和 Uncharacterized protein (AC:F1ML83).前者处在

胞外基质,具有酶催化活性,参与生物体代谢过程;后者在细胞膜上.核糖核酸酶作为一种核酸水解酶模型蛋白常被应用在分子生物学中^[16],与生物的器官生成、宿主防御机制、控制肿瘤血管生成、杀灭肿瘤细胞和抑制病毒复制等^[17]有关.牛乳开创性核糖核酸酶是 RNaseA 的同系物,具有特异性抗肿瘤、无精子生成和免疫抑制力活性^[18].

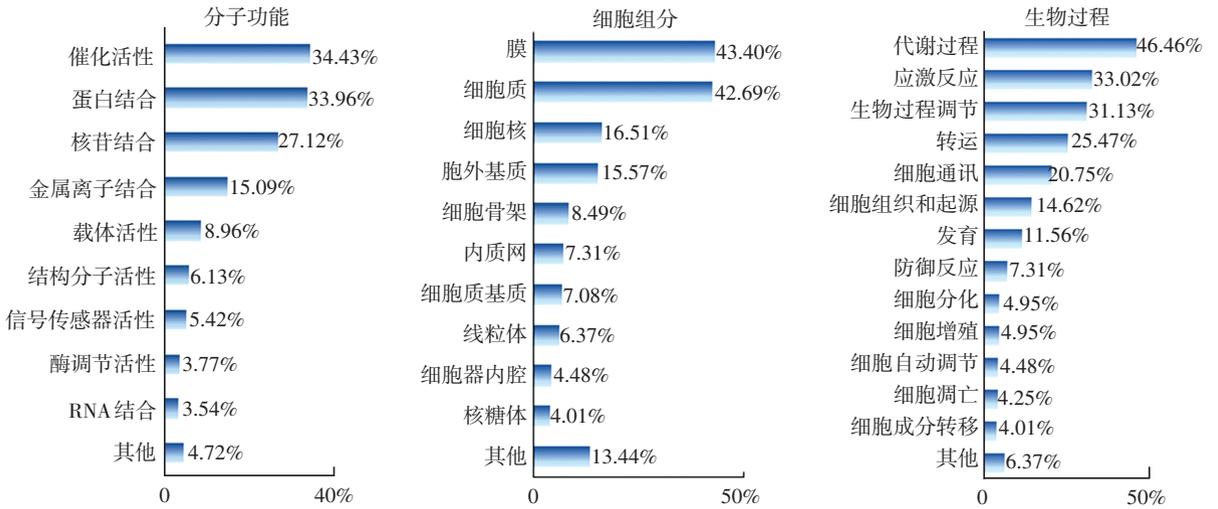


图 2 奶牛和水牛 MFGMPs 的 GO 功能分类

Fig.2 The classifications of GO for MFGMPs of bovine and buffalo

2.3 奶牛和水牛乳脂肪球膜蛋白质显著差异蛋白功能活性分析

对奶牛和水牛 MFGM 蛋白质组中 146 个蛋白含量差异极显著蛋白质的 GO 功能进行分析归类,结果如图 3 所示。

具有蛋白质结合和催化活性的蛋白质最多;大部分的蛋白质处在膜上;参与的生物过程最多为代谢过程.图 3 的结果与图 2 几乎完全一致,说明差异显著性蛋白表现出的功能特性和生物功能可以代表已鉴定蛋白的功能特性。



图 3 奶牛和水牛 MFGM 差异显著蛋白 GO 功能分类

Fig.3 The classifications of GO for significant difference MFGMPs of bovine and buffalo

2.4 奶牛和水牛乳脂肪球膜蛋白质显著差异蛋白的比较
为表征奶牛和水牛 MFGMPs 之间的差异表达,以奶牛 MFGMPs 为内参对鉴定出的蛋白质分析比对,得到差异极显著($p \leq 0.01$)蛋白 146 个.在这些蛋白中以 2 倍(水牛/奶牛)蛋白质相对含量的比值

为限定标准,确定上调和下调蛋白质的组成,统计结果见表 1.

由表 1 可见,在 147 个差异蛋白中共得出上调蛋白 20 个,下调蛋白 25 个.在上调蛋白中,水牛 MFGMPs 中的磷酸钠溶质载体和 γ -谷氨酰转肽酶

(GGT)显著地高于牛乳.上调蛋白中有 7 个蛋白属于结合蛋白;处在膜上的蛋白有 14 个;参与生物体转运、代谢过程和应激反应作用的蛋白各有 7 个.和

奶牛相比,水牛 MFGMPs 具有更多的载体活性和催化活性,参与生物体的转运过程,为生物体内的合成、代谢供应必要的成分.

表 1 奶牛和水牛 MFGMPs 中的差异蛋白

Tab.1 The differential proteins of MFGMPs from bovine and buffalo

上调蛋白			下调蛋白		
蛋白质名称	水牛/奶牛	p 值	蛋白质名称	水牛/奶牛	p 值
磷酸钠溶质载体家族 34 成员 2	8.37	0	黄嘌呤氧化还原酶	0.03	0
γ -谷氨酰转肽酶	8.16	0.002 8	糖蛋白 2	0.10	0
黄嘌呤脱氢酶/氧化酶	5.92	0	糖基化依赖性细胞黏附分子	0.12	0.000 3
嗜乳脂蛋白	4.96	0.000 9	Uncharacterized protein	0.13	0
磷脂促翻转酶	4.14	0.000 5	Uncharacterized protein	0.14	0
Uncharacterized protein	3.95	0.004 3	多聚酶免疫球蛋白受体蛋白	0.17	0
单核细胞分化抗原蛋白 CD14	3.71	0	免疫球蛋白轻链 K 基因蛋白	0.19	0.000 2
钠/葡萄糖协同转运蛋白	3.38	0.001 6	嗜乳脂蛋白	0.20	0
乳凝集素	2.84	0	钙离子结合蛋白	0.20	0.000 4
L 乳酸脱氢酶	2.79	0.000 8	假定的非典型蛋白	0.20	0
突触相关膜蛋白	2.52	0	CD9 抗原	0.21	0.000 1
心肌型脂肪酸结合蛋白	2.35	0	主过敏原 β -乳球蛋白	0.22	0.006 3
突出融合蛋白	2.26	0.001 9	Uncharacterized protein	0.22	0
LOC100522214	2.21	0	免疫球蛋白类 λ -多肽 1	0.25	0
上皮细胞黏蛋白	2.21	0.000 3	组蛋白 H3	0.25	0
Uncharacterized protein	2.16	0.003 8	β -2-微球蛋白	0.28	0.005 7
囊泡相关膜蛋白	2.15	0	乳铁蛋白	0.29	0.001 5
基础免疫球蛋白	2.15	0.003 0	抗菌肽-1	0.33	0.000 4
鸟嘌呤核苷酸结合蛋白	2.07	0.000 1	组蛋白 H2A,2C 型	0.33	0.002 4
脂肪细胞分化相关蛋白	2.04	0.005 6	组蛋白 H4 抗体	0.34	0.000 1
			载脂蛋白 E	0.41	0.000 1
			C3 补体蛋白	0.42	0
			组蛋白 H2B 抗体	0.45	0
			丛生蛋白	0.47	0.002 6
			类 ATP 合成酶蛋白脂质 P2	0.50	0

在下调蛋白中,黄嘌呤氧化还原酶(XOR)、糖蛋白 2(GP-2)、糖基化依赖性细胞黏附分子 1(GlyCAM-1)在奶牛 MFGMPs 中的含量显著地高于水牛乳,其中 XOR 含量是水牛乳的 35 倍;奶牛 MFGMPs 中有 15 种蛋白的含量超过水牛的 4 倍.下调蛋白中主要是结合蛋白;处在膜上的蛋白有 12 个,在胞外基质中的有 11 个;参与代谢过程的蛋白有 11 个具有细胞识别、信号传导、抑制肿瘤细胞的功能特性.

磷酸钠溶质载体蛋白是载体蛋白中专一性转运磷酸钠溶质的一种蛋白.载体蛋白可以高特异性的结合水溶性小分子,渗透并穿过细胞膜的脂质层,将承载物质转移到细胞当中^[19].GGT 是生物体内参与谷胱甘肽代谢的关键酶之一,是催化转移 L- γ -谷氨酰基的特异性酶,与脂代谢紊乱、糖代谢异常、高血压和肥胖等呈正相关^[20].

XOR 是一种在细胞质基质内普遍存在的复合体黄素钼蛋白,可以控制将黄嘌呤转化为尿酸的嘌呤分解代谢的速率,在 DNA 降解、核酸合成和能量需求反应中发挥重要的作用^[21].Linder 等^[22]发现 XOR 与低分化肿瘤和 p53 异常表达有关,与浆液性卵巢癌患者的预后不良有关是分泌选择素 L 的配

体,可以刺激 β 2 黏合素通路与 GlyCAM-1 结合,具有参与细胞识别、信号传导、诱导白细胞黏附等生物学功能,并参与到生物体免疫反应、炎症应激等过程中^[23].GP-2 是通过糖苷键链接羟基或酰胺基形成共价键而成的一种结合蛋白,其中 N-糖苷键蛋白具备多种生物功能,并参与到很多细胞与细胞、细胞与基质之间相互作用的生物过程中^[24].由于细菌、病毒对宿主细胞膜上某种特殊的糖链有专一识别和结合作用,因此糖蛋白中的糖链起到了阻挡和防御微生物入侵细胞的作用^[25].

3 结 论

1) 利用 iTRAQ 技术比较奶牛和水牛 MFGMPs 的成分、含量及功能特性.将奶牛和水牛 MFGMPs 样品分别标记为 113 和 115,采用 Nano-HPLC-MS/MS 系统对样品进行分离、鉴定,通过数据库查询蛋白质信息,并进行分析、比较.

2) 在水牛和奶牛 MFGMPs 中共鉴定鉴定出 424 个蛋白质,其中差异极显著蛋白有 146 个,2 倍上调蛋白和下调蛋白分别有 20 个和 25 个(水牛/奶牛).显著差异蛋白大部分在细胞膜上,具备催化活性和蛋白质结合功能,参与生物体的代谢过程.

3) 水牛 MFGMPs 具有更多的载体活性和催化活性为生物体内的合成、代谢供应必要的成分。奶牛 MFGMPs 主要表现为蛋白质结合特性, 具有细胞识别、信号传导、抑制肿瘤细胞的功能特性。奶牛和水牛 MFGMPs 具备的功能特性大部分有益于生物体的代谢调节和免疫功能, 并可在一定程度上抑制肿瘤细胞的生长繁殖, 具有一定的生物利用价值和药用前景。

参考文献

- [1] WIKING L, STAGSTED J, LENNART B, et al. Milk fat globule size is affected by fat production in dairy cows [J]. *International Dairy Journal*, 2004, 14(10): 909–913. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.03.005.
- [2] MESILATI-STAHY R, ARGOV-ARGAMAN N. The relationship between size and lipid composition of the bovine milk fat globule is modulated by lactation stage[J]. *Food Chemistry*, 2014, 145(4): 562–570. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.08.077.
- [3] SPITSBERG V L. Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical [J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(7): 2289–2294. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72906-4.
- [4] PARDO C A, VARGAS D L, ZIMMERMAN A W. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism [J]. *International Review of Psychiatry*, 2009, 17(6): 485–495. DOI: 10.1080/02646830500381930.
- [5] HARRISON R. Milk xanthine oxidase: properties and physiological roles [J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(6): 546–554. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.08.016.
- [6] MARTIN H M, HANCOCK J T, SALISBURY V, et al. Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent [J]. *Infection & Immunity*, 2004, 72(9): 4933–4939. DOI: 10.1128/IAI.72.9.4933-4939.2004.
- [7] MATHER I H. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane [J]. *Journal of Dairy Science*, 2000, 83(2): 203–247. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74870-3.
- [8] MERTINS P, UDESHI N D, CLAUSER K R, et al. iTRAQ labeling is superior to mTRAQ for quantitative global proteomics and phosphoproteomics [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(6): 1377–1391. DOI: 10.1074/mcp.M111.014423.
- [9] SHI Jiahua, FENG Huixing, LEE J, et al. Comparative proteomics profile of lipid-cumulating oleaginous yeast: an iTRAQ-coupled 2-D LC-MS/MS analysis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e85532. DOI: 10.1371/journal.pone.0085532.
- [10] WU W W, WANG G H, BAEK S J, et al. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel-or LC-MALDI TOF/TOF [J]. *J Proteome Res*, 2006, 5(3): 651–658. DOI: 10.1021/pr050405o.
- [11] MERTINS P, UDESHI N D, CLAUSER K R, et al. iTRAQ labeling is superior to mTRAQ for quantitative global proteomics and phosphoproteomics [J]. *Molecular & Cellular Proteomics Mcp*, 2012, 11(6): 1377–1391. DOI: 10.1074/mcp.M111.014423.
- [12] PISANU S, GHISAURA S, PAGNOZZI D, et al. Characterization of sheep milk fat globule proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis/mass spectrometry and generation of a reference map[J]. *International Dairy Journal*, 2012, 24(2): 78–86. DOI: 10.1016/j.idairyj.2011.05.009.
- [13] WISNIEWSKI J, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 359–362. DOI: 10.1038/nmeth.1322.
- [14] MA Lu. Identification of the characteristic component in milk from Holstein cow, buffalo, yak, Jersey cattle, goat, camel and horse[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014.
- [15] CONSORTIUM G O. Creating the gene ontology resource: design and implementation [J]. *Genome Research*, 2001, 11(8): 1425–1433. DOI: 10.1101/gr.180801.
- [16] QIAN Min, LI Guanrong, LU Cheng. Research progress on ribonucleases[J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2004, 30(2): 185–190. DOI: 10.3969/j.issn.0257-4799.2004.02.014.
- [17] LIU Jun, XUE Caifang. Advances in the research of therapeutic ribonucleases [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2002, 14(3): 139–140. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0374.2002.03.003.
- [18] KIM J S, SOUCEK J, MATOUSEK J, et al. Structural basis for the biological activities of bovine seminal ribonuclease [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(18): 10525–10530. DOI: 10.1074/jbc.270.18.10525.
- [19] PALMIERI F. Mitochondrial metabolite carrier protein family [J]. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 2013, 149–158. DOI: 10.1016/B978-0-12-378630-2.00149-3.
- [20] SAELY C H, VONBANK A, REIN P, et al. Alanine aminotransferase and gamma-glutamyl transferase are associated with the metabolic syndrome but not with angiographically determined coronary atherosclerosis [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2008, 397(1/2): 82–86. DOI: 10.1016/j.cca.2008.07.024.
- [21] AGARWAL A, BANERJEE A, BANERJEE U C. Xanthine oxidoreductase: a journey from purine metabolism to cardiovascular excitation-contraction coupling [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2011, 31(3): 264–80. DOI: 10.3109/07388551.2010.527823.
- [22] LINDER N, B TZOW R, LASSUS H, et al. Decreased xanthine oxidoreductase (XOR) is associated with a worse prognosis in patients with serous ovarian carcinoma [J]. *Gynecologic Oncology*, 2012, 124(2): 311–318. DOI: 10.1016/j.ygyno.2011.10.026.
- [23] LI Jing, WANG Hongmei, WANG Changfa, et al. Analysis of Genetic Polymorphisms in glycosylation-dependent cell-adhesion molecule 1 gene (glycam1) of cattle [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2009, 17(3): 439–444. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2009.03.014.
- [24] GUO Hui, DENG Wenxing, ZHANG Ying. Research progression of glycoprotein [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009(3): 16–19.
- [25] GOFFARD A, CALLENS N, BARTOSCH B, et al. Role of N-Linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins [J]. *Journal of Virology*, 2006, 79(13): 237–246. DOI: 10.1128/JVI.79.13.8400-8409.2005.