

# 牛 $\alpha$ S1-酪蛋白基因5'-调节区的分子克隆

杨卫民 沈孝宙 孙雪茵\* 彭红

(中国科学院动物研究所生殖生物学开放实验室, 北京)

劳为德 陈受宜

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

用牛 $\alpha$ S1-酪蛋白cDNA作探针, 从牛基因组文库中筛选出一段 $\alpha$ S1-酪蛋白基因序列。由限制内切酶图谱和Southern印迹分析可以确定其中含有完整的 $\alpha$ S1-酪蛋白基因的5'调节区。

**关键词** 牛 $\alpha$ S1-酪蛋白基因; 5'调节区; 分子克隆

酪蛋白是一类磷蛋白, 在乳汁总蛋白中含量高达60—70%。其中 $\alpha$ S-酪蛋白占主要部分<sup>[1]</sup>。随着哺乳动物基因工程研究的发展, 人们已开始致力于将外源基因与乳汁蛋白基因的启动子融合, 再导入动物的受精卵中, 以这种转基因(transgenic)动物作为生物反应器, 从乳汁中获得外源基因产物。与利用细菌发酵或细胞培养生产基因工程蛋白相比, 动物生物反应器具有许多优点, 如效率高、成本低、后处理简单、产品更为安全可靠等。因此, 以酪蛋白基因启动子调控的动物个体表达系统已受到人们重视<sup>[2-5]</sup>。

牛酪蛋白有 $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$ ,  $\kappa$  4种类型<sup>[6]</sup>, 其cDNA已克隆<sup>[7,8]</sup>。牛 $\alpha$ S1-酪蛋白基因推测有15kb长, 含大量内含子, 其结构甚为复杂。Yu-Lee等人克隆了其5'端的部分结构基因及一段启动区, 并作了序列测定<sup>[9]</sup>。为了获得酪蛋白基因5'端调节区上游更长的DNA片段, 深入研究酪蛋白基因调节区的作用, 以便使外源基因能在酪蛋白启动子的控制下, 在基因转移动物的乳腺中获得组织特异性表达。我

们以牛 $\alpha$ S1 cDNA为探针, 从牛基因组文库中筛选出牛 $\alpha$ S1-酪蛋白基因5'-调节区序列, 测定了其限制内切酶图谱, 并对启动区的位置和方向作了分析。

## 材料与 方法

### (一) 材料

限制内切酶购自美国Promega公司, 西德Boehringer Mannheim公司及友谊医学科技开发公司。<sup>32</sup>P-dCTP及<sup>35</sup>S-ATP购自英国Amersham公司。牛 $\alpha$ S1 cDNA长度为1194bp, 克隆在pBR322载体Pst I位点上。

### (二) 方法

1. 基因组文库的构建: 牛基因组文库的构建已在我们最近发表的文章中叙述

本文于1989年1月18日收到。

本研究承蒙中国科学院动物研究所张致一教授和中国科学院上海细胞生物研究所施履吉教授关心与支持。美国洛克菲勒基金会提供部分研究设备。澳大利亚Mackinlay博士慷慨提供探针。贾雅丽女士协助技术工作。特致谢忱。

\*广州暨南大学理工学院生殖免疫中心代培硕士研究生。

过<sup>[10]</sup>,兹补充如下:牛肝高分子量DNA提纯后即用内切酶Mbo I部分水解,再通过5—20%氯化钠密度梯度离心<sup>[11]</sup>,分部收集15—20kb的DNA片段。载体噬菌体EMBL3按Maniatis等人所述方法制备<sup>[12]</sup>,然后用BamH I和EcoR I酶解,经用Sepharose 4B柱层析除去小片段,收集EMBL3臂,再用乙醇沉淀,溶于10mmol/L Tris-HCl (pH7.8)-1mmol/L EDTA(简称TE)。包装蛋白按文献[12]所述方法分别从BHB 2688和BHB2690两种菌株中提取。最后将15—20kb随机DNA片段与EMBL3臂连接,经体外包装构建牛基因组文库。

## 2. 探针制备

**RNA探针:**将牛 $\alpha$ S1 cDNA克隆在带有SP6及T7启动子的质粒pGEM3上,用RNA探针标记盒(Promega产)以线性的重组质粒为模板,<sup>35</sup>S-ATP为底物,经SP6 RNA聚合酶催化合成<sup>35</sup>S标记的探针<sup>[13]</sup>。

**DNA探针:**按Maniatis等人所述方法<sup>[12]</sup>,用 $\alpha$ S1 cDNA片段进行缺口转译标记。

**3. 质粒DNA的大量制备:**用SDS-碱裂解细胞,乙酸钾沉淀染色体DNA及细胞碎片。上清用异丙醇沉淀,离心收集质粒DNA,再溶于TE。用核糖核酸酶A(最终浓度为2 $\mu$ g/ml)在37 $^{\circ}$ C处理20min,然后加入0.4倍体积的20%聚乙二醇6000—3mol/L氯化钠溶液,在0 $^{\circ}$ C静置1h,离心收集沉淀,经酚抽提,乙醇沉淀,得纯化的质粒DNA。

**4. 原位杂交与Southern印迹分析:**按照Promega RNA探针标记盒说明书推荐方法及文献[12]所述方法进行。

**5. 大肠杆菌转化:**按改良的Hanahan方法<sup>[14]</sup>进行。

**6. 次级克隆:**以pUC18为载体, JM107为受体菌,用Xgal-IPTG选择重组体。

## 结果与讨论

我们所构建的牛基因组文库,容量为 $1.2 \times 10^6$ 噬菌斑单位(pfu),其中本底小于5%。对任何基因的选出概率大于0.99。用<sup>35</sup>S标记的RNA探针进行杂交,获得6个阳性信号。经两次复筛,最后获得两个纯的阳性噬斑,分别称为 $\lambda$ N1和 $\lambda$ N3,这两种重组噬菌体经扩增培养后,提取其噬菌体DNA,再用BamH I、Sal I、EcoR I和Hind III酶切,在琼脂糖凝胶电泳上分离并鉴定这些酶解片段。发现 $\lambda$ N1(插入片段为12.9kb)比 $\lambda$ N3长2kb,且复盖了后者所有的片段。故实验仅用 $\lambda$ N1进行。利用双酶水解(BamH I + Sal I和Hind III + Sal I),可以从电泳图谱上确定BamH I和Hind III的位置(图版I-A)。由于BamH I为单一位点,并将插入片段分成4.0及8.4kb两个片段,故将此两段分别克隆在pUC18质粒上,命名为pN4及pN8。用EcoR I酶解pN8质粒,可产生5个DNA片段,其长度分别为0.3、1.0、1.5、2.3及6.0kb(后者含有2.7kb的pUC18质粒)。当pN8质粒经Sa I酶解后,再用EcoR I酶进行部分水解,确定了EcoR I酶的相对位置(图版I-B);当用Rsa I酶水解质粒pN8,可分离出740bp的片段,其中含有两个EcoR I位点,距上下游两边的Rsa I位点各为0.14和0.27kb(图未给出)。此外,用Bcl I和BamH I处理质粒pN8,产生3.0和8.1kb两个片段,如用Bcl I和BamH I处理质粒pN8,则产生一个约5.5kb的宽带(见图版I-C)。显然其中应存在两条长度十分相近的片段,因

pN8全长为 11.1kb,这就确定了 Bcl I 的位置。上述实验所确定的几种限制内切酶位置与文献所报道的牛  $\alpha$ S1-酪蛋白基因转录起始区附近的酶位点完全相符(见图 1)。由此可推知在重组体  $\lambda$ N1 中牛  $\alpha$ S1-酪蛋白基因启动区的位置与该基因的转录方向。进而我们用 EcoR I, EcoR I + Sal I 及 BamH I + Sal I 酶分别水解  $\lambda$ N1, 用琼脂糖凝胶电泳分离酶解片段,再转移到硝酸纤维素滤膜上,最后与  $^{32}$ P 标记的牛  $\alpha$ S1-酪蛋白 cDNA 探针杂交。从其放射自

显影谱可以发现 BamH I 下游整个 8.9kb 片段有很强的杂交信号,但该位点上游也存在杂交信号,只是杂交程度较弱(图版 I-D)。这说明两个事实,即牛  $\alpha$ S1-酪蛋白结构基因确如人们所推测的那样非常之大<sup>[8]</sup>;其次,在牛  $\alpha$ S1-酪蛋白基因启动区上游可能存在另一个与其有部分同源序列的酪蛋白基因家族的成员,否则一个基因的上游侧翼区不可能出现与该基因的 cDNA 杂交的现象。

尽管牛  $\alpha$ S1-酪蛋白基因结构非常复

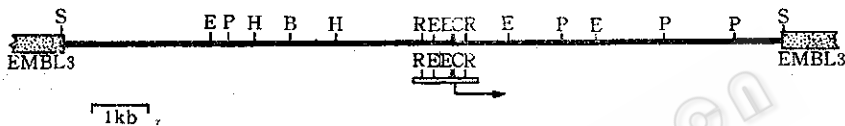


图 1 牛  $\alpha$ S1-酪蛋白基因 5'-调节区附近的限制酶酶切图谱

Fig.1 Restriction map of bovine  $\alpha$ S1-casein gene around the 5'-regulatory region. The map is compared with the fragment of bovine  $\alpha$ S1-casein gene (open bar) reported by Yu-Lee<sup>[9]</sup>. The arrow indicates the initial site and direction of transcription. The abbreviations used for restriction sites are: B, Bam HI; C, Bcl I; E, Eco RI; H, Hind III; P, Pst I; R, Rsa I; and S, Sal I

杂,不易了解其全貌,但我们所获得的克隆,已经复盖了酪蛋白基因家族中另一个基因的部分区域,由此可以认为我们所克隆的牛  $\alpha$ S1-酪蛋白基因应有较完整上游调节区,超过 2—3kb。而迄今所克隆的牛  $\alpha$ S1-酪蛋白基因 5' 调节区尚不及 1kb<sup>[9]</sup>。由于酪蛋白基因表达的调节受众多因素(特别是多种激素化学信息)的控制,故完整的调节区对该基因复杂的调控

机制的研究提供了新的手段,而且也是从乳汁表达外源基因产物这类基因工程系统所必不可缺的基因元件。

目前我们正在对牛  $\alpha$ S1-酪蛋白基因调节区进行结构分析,并已将该调节区与几种靶基因连接,导入了实验动物受精卵,以便研究酪蛋白基因调节区在基因转移动物中的表达功能。

## 参 考 文 献

- [1] Waugh, D.F.; Milk Proteins, ed. by McKenzie, H.A., Vol. I, Academic Press, New York, p.3, 1971.
- [2] Simons, G.P. et al.; *Nature*, 328:530, 1987.
- [3] Gordon, K. et al.; *Bio/Technology*, 5:1183, 1987.
- [4] Pittius, C.W. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5874, 1988.
- [5] Simons, G.P. et al.; *Bio/Technology*, 6:179, 1988.
- [6] Chiba, H. et al.; *Coll. Arg. Kyoto Univ.*, 110:1, 1977.
- [7] Mercier, J.C. et al.; *Arg. Biol. Chem.*, 47:441, 1983.
- [8] Mercier, J.C. et al.; *Arg. Biol. Chem.*, 48:1663, 1984.
- [9] Yu-lee, L.-Y. et al.; *Nucl. Ac. Res.* 14:1883, 1986.
- [10] 沈孝寅等; 科学通报, 33:1267, 1988.
- [11] Zehnbauer, B.A. and Blattner, F.R.; *Genetic Engineering*, vol. 4, ed. by Setlow, J.K. Plenum, Press,

New York and London, p.249, 1983.

[12] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.

[13] Melton, D. A. et al.: *Nucl. Acid Res.*, 12:7035, 1984.

[14] Hanahan, D.: *J. Mol. Biol.*, 166:557, 1983.

## MOLECULAR CLONING OF 5'-REGULATORY REGION OF BOVINE $\alpha$ S1-CASEIN GENE

Yang Weimin Shen Xiaozhou Sun Xueyin Peng Hong

(Laboratories of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing)

Lao Weide Chen Shouyi

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

A DNA fragment of bovine  $\alpha$ S1-casein gene was obtained from bovine genomic library using bovine  $\alpha$ S1-casein cDNA as a probe. Restriction endonucleases map and Southern blot analysis have showed it contains intact 5'-regulatory region of bovine  $\alpha$ S1-casein gene.

### Key words

Bovine  $\alpha$ S1-casein gene; 5'-regulatory region; molecular cloning

### 图版说明

#### Explanation of plate

#### A. 重组噬菌体 $\lambda$ N1的限制内切酶位点分析

Restriction endonuclease analysis of recombinant phage  $\lambda$ N1. Lanes 1 to 3 are BamHI, BamHI+Sal I and BamHI+Sal I +Hind III digests, respectively. Lane 4, MW markers ( $\lambda$ DNA/Hind III + pWR13/Sau96 I)

#### B. $\alpha$ S1-酪蛋白基因5'-调节区附近的限制酶位点分析

Restriction endonuclease analysis of DNA fragment around 5'-regulatory region of  $\alpha$ S1-casein gene. Lane 1, plasmid pN8 was digested partially with EcoRI after Sal I cleavage. Lane 3, plasmid pN4 was digested with EcoRI. Lane 5, plasmid pN8 was digested with EcoRI. Lanes 2 and 4, MW markers

#### C. 质粒pN8上Bcl I 位点的确定

Ascertainment of Bcl I site on plasmid pN8. The DNA was prepared from pN8-transformed GM242, a *E. coli* strain deficient in adenine methylase (*dam*<sup>-</sup>). DNA was digested by Bcl I + BamHI (Lane 1) or Bcl I + Sal I (Lane 2). In the latter case, an 11.1 kb-fragment represents the product by one cut during the digestion with dual enzymes

#### D. 重组噬菌体 $\lambda$ N1插入片段的DNA印迹分析

Southern blot of the insert of recombinant phage  $\lambda$ N1. Lanes 1 to 3 show agarose gel electrophoresis of restriction endonuclease digested DNA, stained with EtBr. Phage  $\lambda$ N1 was digested with EcoRI (Lane 1), EcoRI + Sal I (Lane 2) and BamHI + Sal I (Lane 3). The DNA fragments on the gel were transferred onto a nitrocellulose sheet by Southern blotting, hybridized with the <sup>32</sup>P-labeled  $\alpha$ S1-casein cDNA. Lanes 4 to 6 correspond to lanes 1 to 3, respectively.

