

# 牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因5'端及上游区的克隆

## 鉴定和部分序列分析\*

陈瑞环 汪波 张玉芝\*\* 刘伟 张靖溥 劳为德

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

本文以PCR法克隆得到牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因5'端800bp片段, 并以该片段为探针, 筛选了以EMBL3为载体构建的牛基因组文库, 得到一个阳性克隆。酶切该克隆, 并以牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因5'端800bp片段及该基因cDNA为探针杂交, 鉴定了该插入片的方向, 亚克隆了各相应酶切片段, 制作了较为详细的限制酶图谱, 并分析了该基因转录起始点前后部分序列。与该基因现有的资料比较, 酶切图谱存在部分位点的差异, 序列存在少量突变和缺失, 在5'上游区均发现有内含子及外显子部分, 且缺失均发生于有重复序列的部位。

**关键词** 牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因; 上游调控区; PCR; 克隆鉴定; 酶切图谱; 序列分析

由转基因动物乳汁中获取转基因产物, 表达蛋白量大, 获得表达蛋白的方法简单, 生产成本低。Simons<sup>[1]</sup>首次表明哺乳期小鼠能分泌有活性的组织源性纤溶酶原激活剂进入乳汁, 短短几年来, 一些学者先后利用不同乳汁蛋白基因启动子及调控区指导不同基因在转基因动物乳腺中获得表达并分泌<sup>[2-7]</sup>。所有这些研究令人信服地表明利用乳腺特异表达的转基因动物作为商用生物反应器的可行性。要实现这一表达系统, 首先需要得到乳汁蛋白基因, 尤其是5'端及上游调控区。迄今用于指导异源基因表达的乳汁蛋白基因有: 羊 $\beta$ -乳球蛋白基因( $\beta$ -Lactoglobulin gene, BLG)<sup>[2]</sup>; 鼠乳清酸蛋白基因(Whey acid protein, WAP)<sup>[3,4]</sup>; 兔 $\beta$ -酪蛋白基因( $\beta$ -casein gene)<sup>[5]</sup>; 牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因( $\alpha$ -s1 casein gene)<sup>[6]</sup>。本文报道牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因5'端及上游区的克隆鉴定, 酶切图谱, 转录起始部位前后部分序列分析, 并与该基因现有资料进行了比较。

## 材料与方 法

### (一) 材料

PCR试剂盒为Perkin Elmer Cetus公司产品; 牛基因组文库由中国科学院动物研究所沈孝宙教授惠赠; 随机引物标记试剂盒为Bio-Rad公司产品; T7 Polymerase 序列分析试剂盒为Promega公司产品; <sup>32</sup>P-dCTP、<sup>35</sup>S-dATP为Du Pont公司产品; T4 DNA连接酶为Bio-Labs公司产品; 限制酶为华美生物工程公司产品; *E. coli* LE392、DH5 $\alpha$ 、JM109、pUC19、pUC18和pAT153等为本室自存, 其余试剂均为国产分析纯。

### (二) 方法

1. 牛总DNA的提取: 参照文献[8]方法。
2. PCR反应及其产物的克隆: 参照

本文于1991年6月4日收到。

\* 本课题由七五攻关项目资助

\*\*北京农学院畜牧系

试剂盒说明书及文献〔8〕方法。其中94℃变性1 min, 55℃复性1 min, 72℃延伸2 min, 共30个循环。产物经磷酸化处理 后平头插入pUC18 SmaI位点转化大肠杆菌 JM109。

3. 探针的标记和DNA 序列分析参照试剂盒说明；噬菌斑及Southern吸印、杂交、放射自显影、质粒和噬菌体DNA的提取与纯化、酶切、部分酶切及亚克隆等均参照文献〔8〕方法。

## 结 果

### (一) 利用PCR克隆牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因5'端片段

人工合成两个引物，跨于牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因转录起始点上游660bp及下游158bp<sup>〔9〕</sup>。引物的序列为：引物I：5' CT-GACACGACTTAGAAA-OH 3'，与负链互补；引物II：5' GGGGGGATCCA-ATACTTGCAATCACA-OH 3'，与正

链互补。扩增得到产物片段约800bp克隆进pUC18 SmaI位点，插入片段可用BamHI KpnI双酶切出。插入片段中间存在

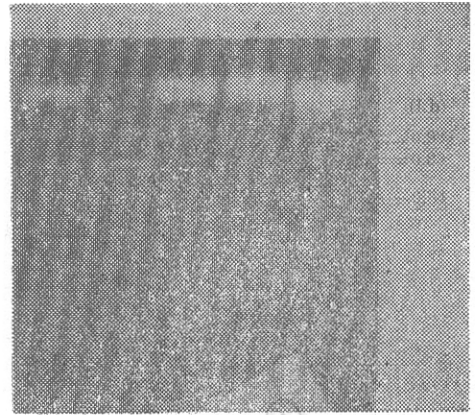


图1 PCR产物及其克隆鉴定

Fig.1 PCR product and its cloning and characterization.

2.0% agarose gel electrophoresis stained with EtBr.

1. pUC18-PCR 800 + BamHI + KpnI
2. PCR 800
3. pUC18-PCR 800 + EcoRI
4. pUC18-PCR 800
5.  $\lambda$ DNA + Hind III + EcoRI

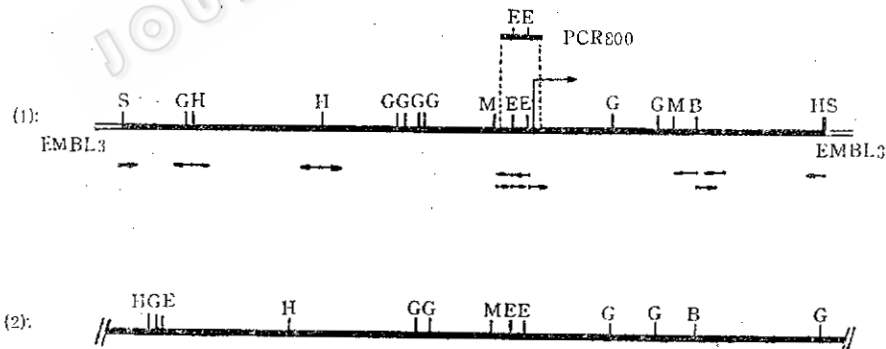


图2 牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因5'端克隆酶切图谱及比较

Fig.2 Restriction endonuclease map of the 5'-flanking region of bovine  $\alpha$ -s1 casein gene

(1)AA1, (2)Meade<sup>t63</sup>

— 1 kb

—牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因及5'上游区Bovine  $\alpha$ -s1 casein gene and its upstream fragment

→转录起始位点Transcription start

→序列测定方向Sequencing stratage

B; BamHI, E; EcoRI, G; Bgl II, H; Hind III, M; SmaI, S; Sall,

1					
2	CTGCAGAAGG	AAATGGCAAC	CCACTCCAAT	ATTATTACTT	GGGAAATCCC -705
3	-----	-----	-----	-----	-----
1					
2	ATGGACAGAG	GAGACTGGCA	GGCTGCAGTC	CATGGGGGTC	ACAAAGAACT -655
3	-----	-----	-----	-----	-----
1					
2	GGACACGACT	TAGAAACTAA	ACAACAACAA	TTTATACCAG	AATGAATGAA -605
3	-----	-----	-----	-----	-----
1					
2	CTAGTTACCA	CAACTAGTAC	ACCCAAAATG	AACAAAAAAT	AGCTTGGTGG -555
3	-----	-----	-----	-----	-----
1					
2	TATAATTTAA	ATGCCACCAA	AAGTTATACA	ATAATGTGAT	TTTCTTTTTG -505
3	-----	-----	-----T-----	-----A-----	-----
1					
2	CAGGAAAAAG	ATTAGACCAC	ATATAATGTA	ACTTATTTCA	CAAGGTAAAT -455
3	-----	-----	-----	-----	-----
1					
2	AATTATAATA	AATAATATGG	ATTAACTGAG	TTTTAAAAGG	TGAAATAAAT -405
3	-----	-----	-----	-----	-----
1					
2	AATGAATTCT	TCTCATGGTC	TTGTATGTTA	ATAAAAATTG	AAAAATTTTG -355
3	-----	-----	-----	-----	-----
1					
2	AAGACCCCAT	TTTGTCCTAA	GAATTTCAAT	TACAGGTATT	GAATTTTTCA -305
3	-----	-----	-----	-----	-----
1					
2	AAGGTTACAA	AGGAAATTTT	ATTGATATAA	TAAATGCATG	TTCTCATAAT -255
3	-----	-----	-----	-----	-----
1					
2	AACCATAAAT	CTAGGGTTTT	GTTGGGGTTT	TTT GTTT	GTTAATTTAG -208
3	-----	-----	-----	---TTT---	-----
1					
2	AACAATGCCA	TTCATTTCC	TGTATAATGA	GTCGCTTCTT	TGTTGTA AAC -158
3	-----	-----	-----	-----	-----
1					
2	TCTCCTTAGA	ATTTCCTGGG	AGAGGAACTG	AACAGAACAT	TGATTTCTTA -108
3	-----	-----	-----	-----	-----
1					
2	TGTGAGAGAA	TTCTTAGAAT	TTAAATAAAC	CTATTGGTTA	AACTGAAACC -58
3	-----	-----	-----	---A---	-----
1					
2	ACAAAATTAG	CATTTTACTA	ATCAGTAGGT	TTAAATAGCT	TGGAAGCAAAA -8
3	-----	-----	-----	---G---	-----

		+1 transcription start		
1	-----T-----			
2	AGTCTGCCAT CACCTTGATC ATCAACCCAG CTTGCCGCTT CTTCCCAGTC	43		
3	-----T-----			
		intron1		
1	-----			
2	TTGGGTTCAA GGTATTATGT ATACATATAA CAAAATTCTT ATGATTTTCC	93		
3	-----			
1	-----			
2	TCTGTCTGAT CTTTCATTCT TCACTAATAC GCAGTTGTAA CTTTCTATG	143		
3	-----			
1	-----			
2	TGATTGCAAG TATTGCTACT TTCCTATGAT ATACTGTTAG CTAAAAATA	193		
3	-----			
2	TATTTGCAAT GTTGATACTA TCTATCTCAG AGCTATAGGT GAAAAATTAA	243		
3	-----			
2	ATACTTTTAT AAAGACCAAA TTGATCA---- unsequenced ----			
3	-----intron1-exon2-intron2-----			
2	AAATAAATAA ATATGAATCA ACTGACAAGA AAGTGATTCA AATAAGATAA	2747		
3	-----			
2	TAGTTTTGGA TATTTGGACA CTCAAACTAT CAAATATAGA TGAAAAAGTT	2797		
3	-----			
2	TCTGAAATGC TGAGATATTC TATTGTAAA ETC TTATTTTCT			
3	-----TTAAACT C-----	2847		
2	AAATGTAAA TAATGATTGA AGGATCACTA ATAATCCAGC TTCTTAACCA	2897		
3	-----			
2	ATAGAGTTCT GTCGTGCTA AACCTAAGC ATCAAAACAT GGAAATATCT	2947		
3	-----			
2	GACAGTAAGT TACAAAAAAA GGATCCAAGT TCTTCAGAAA TGTGTCATTG	2997		
3	-----			
2	GAGTAGTCCA TATCTTTTCC TTTTATCAGT GAAACAGATA TAGATCCCCC	3047		
3	-----			
2	AGCAAACAGA TTCITTAATC CTTTCCAAA GAAAACATCA TTTTTAATG	3097		
3	-----			
2	CTAACATTTA ACAACATAA ATCTTGTTCC CACAGTTAAA ATGCAGATTG	3147		
3	-----			
2	ACTTAAATTT TTATATAATT TAATTTATGA TAAAAAATAA AATCCAGACA	3197		
3	-----N-----			
2	AACAGTATTT CAGATTATTT TTTGTCITTT TATATACTTT TCTCCACCAT	3247		
3	-----			
2	ATTCTAAAAA CAGAAGATAA TTTACTTTTC TTGATTTTTC TCAATAAATT	3297		
3	-----			
2	TTTTTTCCC GGAGGGGAA CTTGGTGTC AATTTAGCTG TAAAAATACA	3347		
3	-----TC CC-----			
2	AACTTCTTAA ATAGCACTAT TAAATGTATA GTATTACATG TGCCTTGTTGA	3397		
3	-----			
2	TATTATTATT ATTGTATTTT GAGTGCTTTT GGTTTTACAA TTCTTGCATT	3447		
3	-----			
		exon2		
2	TTTTTTTTAA CAGAAACATC CTAT			
3	-----			3471

图3 牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因5'端部分序列分析的比较  
 Fig.3 Alignment of partial sequence of bovine  $\alpha$ -s1 casein gene  
 1. PCR 800, 2.  $\lambda$ AA1, 3. Report by Koczan<sup>[10]</sup>

两个EcoRI位点,相距约300bp,与预期一致<sup>[9]</sup>。PCR产物的克隆经序列分析亦证明了其正确性(见图1—3),并发现有个别碱基的变异。

## (二) 牛基因组文库的筛选、阳性克隆的鉴定、插入片段方向的确定

以EMBL3为克隆载体, MobI部分酶切制备的牛基因组DNA插入片段构建的基因组文库,用PCR克隆的牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因5'端800bp片段为探针进行筛选,共筛选了 $2 \times 10^6$  pfu,得到一个阳性噬斑,再经两轮复筛得到一个阳性克隆 $\lambda$ AA1。 $\lambda$ AA1 DNA经SalI酶切,得到3条带,以EMBL3为载体构建的文库,在载体左、右臂与插入片段接头处各有一SalI位点,因此插入片段中无SalI位点,插入片段为13.7kb。 $\lambda$ AA1 DNA经SalI和EcoRI双酶切,除了得到载体左右臂21kb, 9kb外,另有3条插入片段带分别为5.9kb, 7.5kb 0.3kb,说明该插入片段仅有两个EcoRI位点。经Southern吸印,以PCR800bp片段为探针杂交,双酶解得到的3条插入片段带均出现杂交信号,说明该3条片段均含有牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因5'端克隆PCR800bp片段的部分序列,亦即 $\lambda$ AA1插入片段含有牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因的5'端,见图4。

将 $\lambda$ AA1 DNA经EcoRI、EcoRI+SalI酶切,分别以PCR800bp片段和牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因cDNA p<sup>184</sup>-1172bp片段为探针杂交。以PCR800bp为探针杂交, EcoRI单酶切出现300bp、~20kb、~20kb 3条杂交带, EcoR+SalI双酶切出现300bp、5.9kb、7.5kb 3条。以p<sup>184</sup>-1172bp片段为探针杂交, EcoRI单酶切仅出现1条~20kb的杂交带, EcoRI+SalI双酶切仅出现1条5.9kb的杂交带。说明 $\lambda$ AA1插入片段含有牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因转录起始点附近300bp EcoRI片段,上游7.5kb

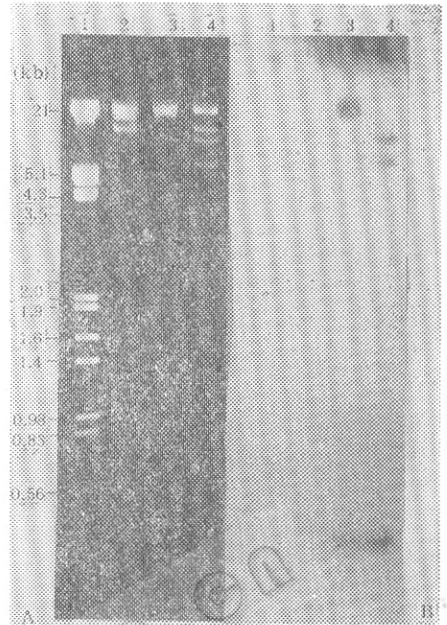


图4 阳性克隆 $\lambda$ AA1 DNA的限制酶酶切图和以<sup>32</sup>P-PCR 800片段为探针的杂交分析

Fig.4 Restriction endonuclease analysis and Southern blot of the positive clone  $\lambda$ AA1

A. 0.8% agarose gel electrophoresis stained with EtBr

B<sub>1</sub> Southern blotting, hybridized with <sup>32</sup>P-labeled PCR800

1.  $\lambda$ DNA + Hind III + EcoRI
2.  $\lambda$ AA1 + SalI
3.  $\lambda$ AA1 + EcoRI
4.  $\lambda$ AA1 + SalI + EcoRI

EcoRI/SalI片段,下游5.9kb EcoRI/SalI片段(见图5)。

## (三) 牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因克隆 $\lambda$ AA1各相应酶切片段的亚克隆及酶切图谱的制作

$\lambda$ AA1 DNA经BamHI酶切得到两条~20kb片段,经SalI和BamHI双酶切得到2.6kb、11kb两条插入片段及9kb、21kb两条载体片段,如图6。说明 $\lambda$ AA1插入片段仅有一个BamHI位点,且距载体EMBL3克隆位点SalI 2.6kb。亚克隆 $\lambda$ AA1 BamHI/SalI酶切2.6kb、11kb片段分别至pUC19、pAT153 BamHI/SalI位点,形成亚克隆pBS2.6、pSB11。

pSB11 DNA经BamHI/EcoRI,

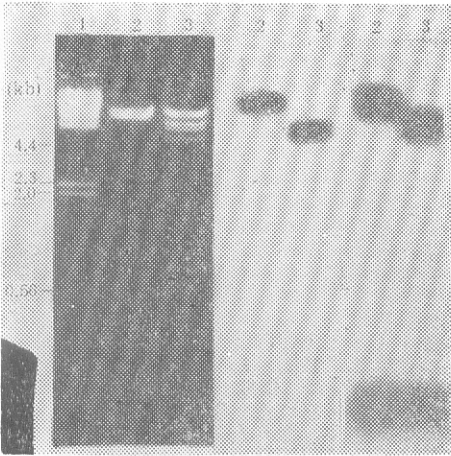


图5  $\lambda$ AA1插入片段方向的分析

Fig.5 Orientation analysis of the insert fragment of  $\lambda$ AA1

Left. 1.0% agarose gel electrophoresis stained with EtBr

Middle. Southern blot hybridized with  $^{32}$ P-labeled bovine  $\alpha$ -s1 casein gene cDNA (p184)

Right. Southern blot hybridized with  $^{32}$ P-labeled PCR800

1.  $\lambda$ DNA + HindIII
2.  $\lambda$ AA1 + RcoRI
3.  $\lambda$ AA1 + SalI + EcoRI

Sal I /EcoR I、BamH I /Sal I /EcoR I 酶切分别含有 3.3kb、7.5kb、3.3kb 和 7.5kb 的插入片段, 见图 7 中 3—5。说明 BamH I 位点在  $\lambda$ AA1 插入片段 EcoR I /Sal I 酶解 5.9kb 片段中, 距 EcoR I 3.3kb。亚克隆 pSB11 Sal I /EcoR I、EcoR I /BamH I 酶切 7.5kb、3.3kb 片段至 pUC19 EcoR I /Sal I、EcoR I /BamH I 位点, 形成亚克隆 pSE7.5、pEB3.3。pSB11 DNA 经 Hind III、Hind III /Sal I 酶切分别含有 2.5kb、2.5kb 和 1.4kb 插入片段(见图 7 中 9、6), 说明 pSB11 插入片段中含有两个 Hind III 位点相距 2.5kb, 其中一个 Hind III 位点距 Sal I 1.4kb。该亚克隆 2.5kb、1.4kb 片段至 pUC19 Hind III 位点, Hind III /Sal I 位点, 形成亚克隆 pHH2.5、pSH1.4。pSB11 DNA 经 Sma I、Sma I /BamH I 酶切均出现约 3.5kb

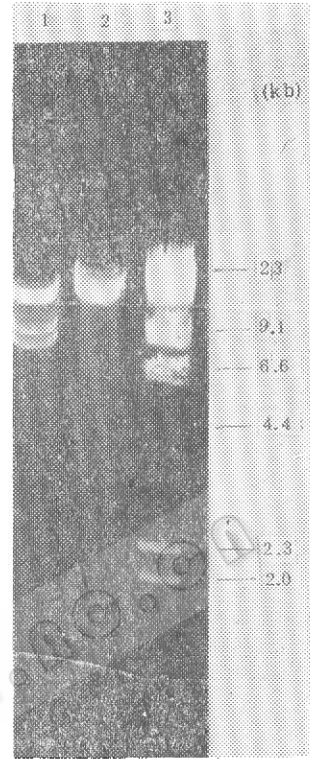


图6  $\lambda$ AA1 限制酶酶切分析

Fig.4 Restriction endonuclease analysis of  $\lambda$ AA1 0.8% agarose gel electrophoresis stained with EtBr

1.  $\lambda$ AA1 + SalI + BamHI
2.  $\lambda$ AA1 + BamHI
3.  $\lambda$ DNA + HindIII

插入片段(见图 7 中 12、13), 说明 pSB11 插入片段含有两个 Sma I 位点, 相距 3.5kb, 其中一个靠近 BamH I 位点。pSB11 DNA 经 Bgl II /Sal I、Bgl II /BamH I 酶切分别较 Bgl II 单酶切多出 1.3kb、0.8kb 插入片段(见图 7 中 16、18、19), 说明距 Sal I 位点 1.3kb, 距 BamH I 位点 0.8kb 各有一个 Bgl II 位点。

亚克隆 pEB3.3 经 Bgl II、Bgl II /EcoR I 酶切(如图 8 中 2、3), 表明 pEB3.3 含有两个 Bgl II 位点, 两位点相距 0.9kb, 其中一个距 EcoR I 位点约 1.5kb。pSE7.5 经 EcoR I /Bgl II、Bgl II 酶切(如图 8 中 5、6)表明 pSE7.5 含有 5 个 Bgl II 位点,

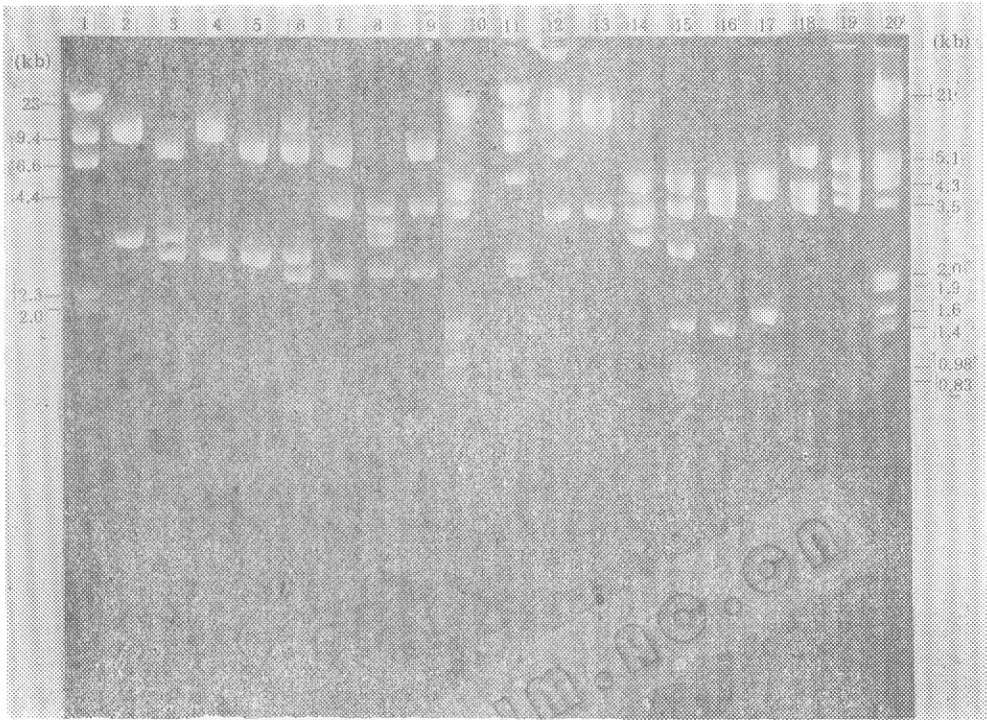


图 7  $\lambda$ AA1插入片段亚克隆pSB11(载体AT153)限制酶分析

Fig.7 Restriction endonuclease analysis of the subclone pSB11 (vector pAT153) of the inserted fragment of  $\lambda$ AA1. 0.8% agarose gel electrophoresis stained with EtBr.

- |                                    |   |
|------------------------------------|---|
| 1. , 11. $\lambda$ DNA + Hind III  | 2. pSB11 + Sal I + BamH I                 |
| 3. pSB11 + Sal I + EcoR I          | 4. pSB11 + BamH I + EcoR I                |
| 5. pSB11 + Sal I + BamH I + EcoR I | 6. pSB11 + Hind III + Sal I               |
| 7. pSB11 + BamH I + Hind III       | 8. pSB11 + Hind III + EcoR I              |
| 9. pSB11 + Hind III                | 10. 20. $\lambda$ DNA + EcoR I + Hind III |
| 12. pSB11 + Sma I                  | 13. pSB11 + BamH I + Sma I                |
| 14. pSB11 + Hind III + Sma I       | 15. pSB11 + Bgl II + Hind III             |
| 16. pSB11 + Bgl II + Sal I         | 17. pSB11 + Bgl II + EcoR I               |
| 18. pSB11 + Bgl II                 | 19. pSB11 + Bgl II + BamH I               |

其中一个距EcoR I 位点1.7kb,经EcoR I 完全酶切加Bgl II 部分酶切, Sal I 完全酶切加Bgl II 部分酶切(如图8中11—16)表明靠近 pSE7.5 插入片段EcoR I 上游1.7kb至2.3kb处共有4个Bgl II 位点,分别相距约100bp、250bp、150bp。pSE7.5 经Hind III、Hind III/Bgl II 和Hind III 部分切,结果也证实了上述结果,见图8中7—9。pSE7.5经Sma I、Sma I/EcoR I、Sma I/BamH I 酶切(如图8中18—20),表明 pSE7.5 含有一个Sma I 位点,距

EcoR I 位点350bp。pEB3.3 经Sma I、Sma I/EcoR I 和Sma I/BamH I 酶切(如图8中21—23),表明 pEB3.3 含有一个Sma I 位点,距BamH I 位点400bp。

这样,我们就定出了 $\lambda$ AA1 插入片段中BamH I、Bgl II、Hind III、EcoR I、Sma I 和Sal I 的酶切图谱,见图2中(1)与已发表的资料<sup>[6]</sup>相比,有部分酶切位点的差异(见图2)。

#### (四) DNA序列分析

对各相应亚克隆片段、用双脱氧终止

法分析了部分序列(见图3,有部分序列未显示),并与PCR 800bp的DNA序列、已发表的牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因相应序列(Kocz-an, 1991)<sup>[10]</sup>进行了比较(见图3),结果表明三者均有部分差异。在该基因转录起始点上游、内含子、外显子部分均存在少量的点突变和(或)缺失,发生缺失的部位均位于有重复序列处。

## 讨 论

酪蛋白基因的表达具有组织、阶段、

年龄性别等特异性,同时受到类固醇、肽类等多种激素的调节。该基因的基本组成元件包括:5'非编码区外显子、信号肽外显子、3'端具有磷酸化位点外显子、疏水结构域外显子。以上结构保证了酪蛋白的功能需要。其中5'非编码区、信号肽和蛋白激酶识别位点的序列非常保守。3'端最初数十个碱基对部分也相当保守,可能与初始转录物的剪接机制有关<sup>[11]</sup>。

牛 $\alpha$ -s1酪蛋白是牛乳汁蛋白中主要的蛋白。其基因在哺乳期乳腺中活跃表达,转录物经历复杂的剪接,转录受到多种激

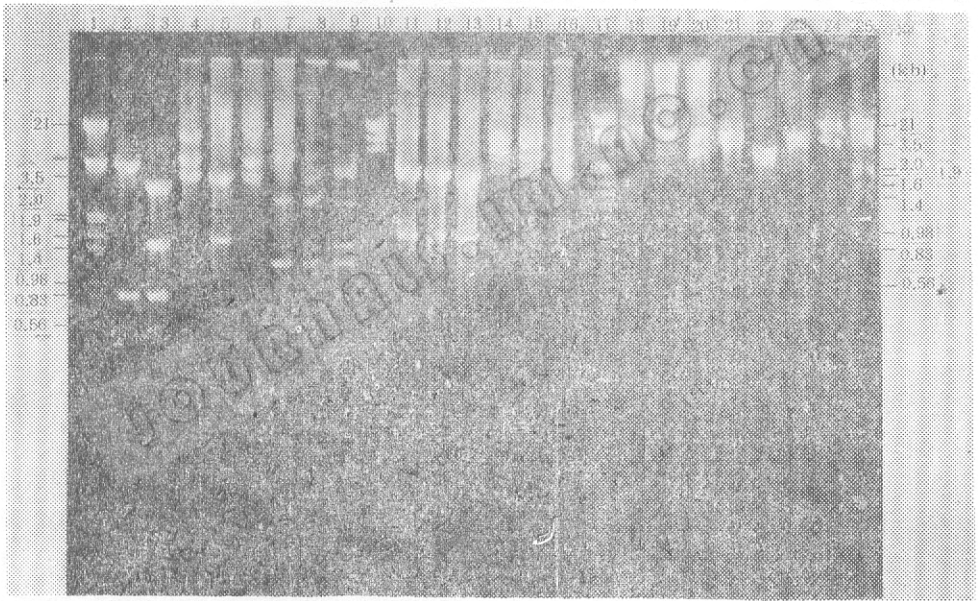


图8  $\lambda$ AA1插入片段亚克隆pEB3.3、pSE7.5(载体pUC19)、pSB11(载体pAT153)限制酶酶解分析

Fig.8 Restriction endonuclease analysis of the subclones pEB3.3 (vector pUC19), pSE7.5 (vector pUC19), pSB11 (vector pAT153) of the [inserted fragments of  $\lambda$ AA1, 1.2% (Lane1-16), 1.5% (Lane17-25) agarose gel electrophoresis stained with EtBr.

- |   |   |
|---|---|
| 1. ,17.,25. $\lambda$ DNA + EcoR I + Hind III | 2. pEB3.3 + Bgl I                       |
| 3. pEB3.3 + Bgl I + EcoR I                    | 4. pSE7.5 + Bgl I                       |
| 5. pSE7.5 + Bgl I + EcoR I                    | 6. pSE7.5 + Bgl I                       |
| 7. pSE7.5 + Hind III                          | 8. pSE7.5 + Hind III partial            |
| 9. pSE7.5 + Hind III + Bgl I                  | 10. $\lambda$ DNA + Hind III            |
| 11. —13. pSE7.5 + EcoR I + Bgl I partial      | 14. —16. pSE7.5 + Sal I + Bgl I partial |
| 18. pSE7.5 + Sma I                            | 19. pSE7.5 + Sma I + EcoR I             |
| 20. pSE7.5 + Sma I + BamH I                   | 21. pEB3.3 + Sma I                      |
| 22. pEB3.3 + Sma I + EcoR I                   | 23. pEB3.3 + Sma I + BamH I             |
| 24. pSB11 + Sma I                             |   |



素的调控。有关序列的分析表明,在5'上游存在顺式作用元件,为催乳素、可的松类作用所必需<sup>[11]</sup>。我们最近发现在兔乳腺中存在数个与牛 $\alpha$ -s1酪蛋白基因结合的蛋白<sup>[13]</sup>,因而可能起到反式调控作用。

### 参 考 文 献

- [1] Simons, J. P. et al.: *Nature*, 328:530—532, 1987.  
 [2] Wright, G. et al.: *Bio/Technology*, 9:830—834, 1991.  
 [3] Ebert, K. M. et al.: *Bio/Technology*, 9:835—838, 1991.  
 [4] Andres, A. C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84:1299—1303, 1987.  
 [5] Buhler, T. A. et al.: *Bio/Technology*, 8:140—143, 1990.  
 [6] Meade, H. et al.: *Bio/Technology*, 8:443—446, 1990.  
 [7] Krimpenfort, P. et al.: *Bio/Technology*, 9:844—847, 1991.  
 [8] Sambrook, J. et al.: *Molecular Cloning*, Second edition, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.  
 [9] Yu-Lee, L. Y. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 14:1883—1902, 1986.  
 [10] Koczan, D. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 19:5591—5596, 1991.  
 [11] Bonsing, J. et al.: *Aust. J. Biol. Sci.*, 41:527—537, 1988.  
 [12] 陈瑞环, 劳为德: *生物化学与生物物理进展*, 18:378, 1991.

## Cloning, Characterization and Partial Sequence of Bovine $\alpha$ -s1 Casein Gene

Chen Ruihuan Wang Bo Zhang Yuzhi Liu Wei  
Zhang Jingpu Lao Weide

(Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing)

We have isolated a clone from a bovine genomic library in EMBL3 using the probe with 5' portion including -660 to 158 bp of the bovine  $\alpha$ -s1 casein gene obtained by PCR. Hybridization assays with probes of both the full length cDNA and 5' flanking fragment of  $\alpha$ -s1 casein gene, restriction enzyme mapping and partial sequence analysis indicated that the fragment cloned spans 5.7kb of the first part of the gene and 8kb of its upstream flanking region, and has some divergence in restriction enzyme map compared with the published, and has a few mutations, deletions—among the gene cloned, the PCR-generated fragment and the published sequence in either exon, or intron or flanking region, and all the deletions occurs at the sites of repeat sequences.

### Key words

Bovine  $\alpha$ -s1 casein gene; 5' flanking region; cloning and characterization; DNA sequence