

# 鸭卵清蛋白 5'端调控区的克隆和序列分析

蔡 马

(仲恺农业技术学院 农学系, 广东 广州 510225)

**摘要:**通过 PCR 技术从产蛋鸭输卵管基因组中扩增出 1.2 kb 的鸭清蛋白 5'端调控区, 将其亚克隆入 phD18-T 载体的多克隆位点(命名为 *pOV*), 经酶切和测序鉴定可作为启动外源基因表达的调控序列. 为构建其启动外源基因的质粒表达载体作准备.

**关键词:**鸭清蛋白; 调控区; 亚克隆

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)03-0098-03

## Cloning and sequence analyses of the 5' regulation regions of duck ovalbumine gene

CAI Ma

(Dept. of Agronomy, Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** 5' terminal regulatory region of ovalbumin gene, a 1.2 kb DNA segment, was amplified by PCR from oviduct genome of a laying duck. It was cloned into the multiple cloning site of phD18-T vector (now named *pOV*), and used as regulatory sequence for promoting exogenous gene expression after enzyme cutting and sequencing identification. It was therefore preparation for constructing an expression plasmid vector to express exogenous genes.

**Key words:** duck ovalbumin; regulation region; subclone

在牛的乳腺生物反应器研究中, 研究者用  $\beta$ -酪蛋白基因的启动区来启动外源基因在乳腺的特异表达. 而在鸡的输卵管生物反应器研究中, 选用鸡蛋中含量最多的卵清蛋白的调控区来调控外源基因在输卵管组织的表达<sup>[1]</sup>. 早在 1982 年 Heilig 等<sup>[2]</sup>克隆并研究了鸡卵清蛋白 5'端调控区, 它除了具真核基因启动子所共有的特点外, 还具有一些特殊的特点, 如具有上游启动子成分、TATA 框样序列、短回文序列以及激素依赖性调控元件等. 日本的 Ochiai 等<sup>[3]</sup> 1998 年证明了卵清蛋白 5'端调控区调控人促红细胞生成素在鸡输卵管组织的特异表达. 克隆卵清蛋白 5'端调控区是研究禽类输卵管生物反应器的关键, 本研究克隆了鸭清蛋白 5'端调控区, 以期构建其启动外源基因的质粒表达载体奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大肠杆菌菌株 CH-5 为实验室分离; 克隆载体

phD18-T 为大连宝生物公司产品; 限制性内切酶、T<sub>4</sub>DNA 连接酶、*Taq* 酶、Marker(EL-2000、DL-15000)为日本 TaxaRa 公司产品; 紫外分析仪为岛津公司产品; PCR 仪为 PTC-150 MJ Research INC USA; 电泳仪为北京六一 DYY-I2 型.

根据有关文献<sup>[2]</sup>设计了 1 对引物:

T1 5'-TGCCACTGACTAAACTTCAGCT-3';

T2 5'-CTTGACTGCTAAAGGCAATAC-3'. 送 Sangon 公司合成.

### 1.2 方法

1.2.1 鸭输卵管组织 DNA 的提取<sup>[4]</sup> 取产蛋鸭的输卵管膨大部的组织块约 100 mg, 剪碎置入 1.5 mL 的 Eppendorf 管. 加入提取 Buffer 400  $\mu$ L, 蛋白酶 K15  $\mu$ L, 充分混匀. 55  $^{\circ}$ C 水浴锅中消化至澄清. 向 Eppendorf 管中加入 5 mol/L NaCl 120  $\mu$ L, 氯仿 524  $\mu$ L, 混匀, 静置 5 min, 10 000 r/min 离心 10 min. 取上清, 加入 2 倍体积冷乙醇沉淀 DNA. 用体积分数为 70% 的

乙醇冲洗,晾干. 加入 TE 充分溶解. 电泳观察结果.

1.2.2 清蛋白 5'端调控区的扩增<sup>[2]</sup> 反应体系:模板 DNA 20~100 ng, 引物各 50 mmol/L, Taq 酶 1 U, dNTP 200 mmol/L, 10× Buffer 2.5 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL.

反应程序:95 °C 变性 3 min;95 °C 变性 50 s,60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 共计 30 个循环;72 °C 延伸 10 min. 4 °C 保存.

1.2.3 电泳鉴定<sup>[5]</sup> PCR 产物用 0.008 g/mL 琼脂糖电泳, TAB Buffer, 恒压 10 V/cm, 电泳 2~3 h, 用溴化乙锭(10 mg/mL)染色, 紫外分析仪照相记录.

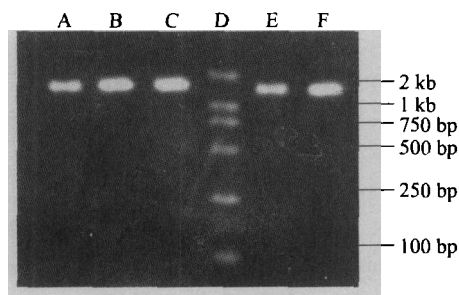
1.2.4 卵清蛋白 5'端调控区(OV)克隆到 pH18-T 载体 按 pH18-T 载体说明书操作, 连接过夜. 将克隆的卵清蛋白 5'端调控区亚克隆入 pH18-T 载体, 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞, 少量提取质粒 DNA, 用限制性内切酶 KpnI 和 HindIII 进行双酶切鉴定.

1.2.5 卵清蛋白 5'端调控区的测序 将所得纯化质粒用全自动测序仪测定.

## 2 结果与分析

### 2.1 卵清蛋白 5'端调控区的克隆

卵清蛋白 5'端调控区扩增产物经 0.008 g/mL 的琼脂糖电泳, 可见其位于 Marker 2 000 的 2 kb 条带近前端, 大小约为 1.2 kb, 与预期的结果相符(图 1).



A、B、C、E、F 为所扩增的卵清蛋白 5'端调控区, D 为 Marker 2 000  
Lane A, B, C, E, F: amplified 5' control region of ovalbumin  
Lane D: Marker 2 000

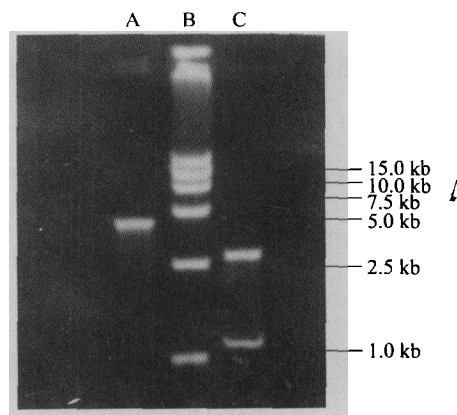
图 1 卵清蛋白 5'端调控区扩增图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of PCR amplification of ovalbumin 5' terminal regulatory region

### 2.2 卵清蛋白 5'端调控区的酶切

将扩增产物克隆入 pH18-T 载体后, 先用 PCR 进行初步鉴定, 证明质粒含有卵清蛋白 5'端调控区. 再进一步用酶切鉴定, 选用 XbaI 进行单酶切鉴定, pOV 阳性质粒经酶切得到 1 条 3.8 kb 的条带, 位于 Marker 15 000 的 5 kb 条带和 2.5 kb 条带之间, 靠近 5.0 kb 条带; 选用 Kpn I 和 HindIII 限制性内切酶进

行双酶切鉴定, pOV 阳性质粒经酶切后得到约 2.7 kb 和 1.2 kb 的 2 条带, 2.7 kb 条带大小和载体相同, 1.2 kb 条带大小与所扩增的卵清蛋白 5'端调控区大小相符(图 2), 这些结果表明卵清蛋白 5'端调控区已经连入 pH18-T 载体, 命名为 pOV.



A 为 pOV 经 XbaI 酶切, B 为 Marker 15 000, C 为 pOV 经 KpnI and HindIII 双酶切  
Lane A: pOV digested by XbaI, Lane B: Marker 15 000, Lane C: pOV ambi-digested by KpnI and HindIII

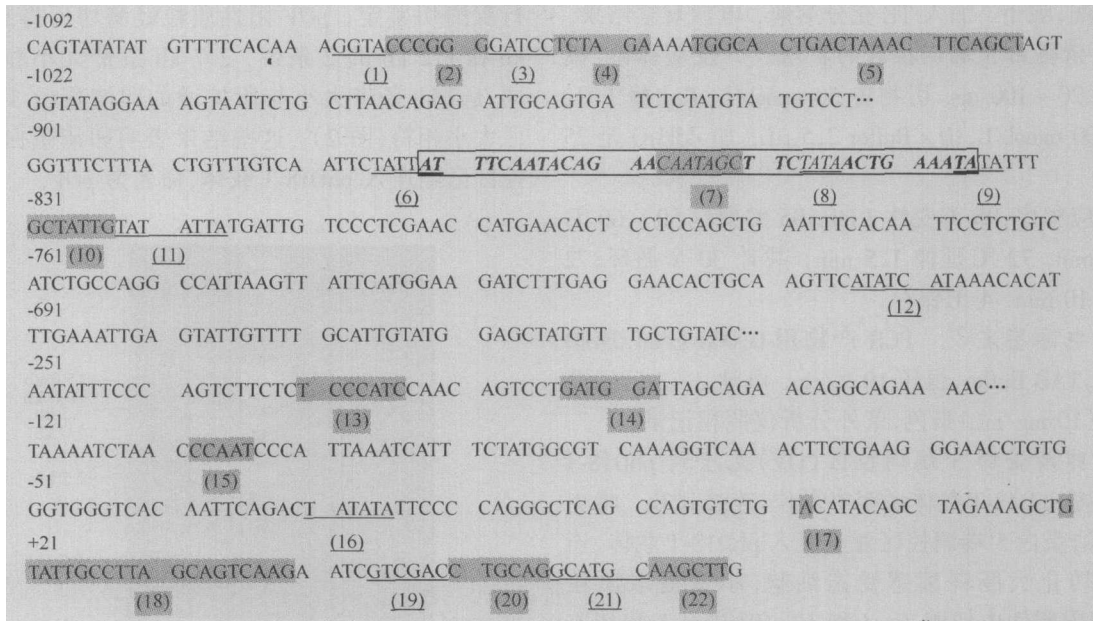
图 2 pOV 重组质粒 KpnI 和 HindIII 酶切图谱  
Fig. 2 Electrophoretogram of pOV digested by KpnI and HindIII

### 2.3 卵清蛋白 5'端调控区的序列测定

为进一步鉴定卵清蛋白 5'端调控区是否具有调控作用, 对其进行测序. 测定限制性内切酶 Kpn I 和 HindIII 之间 1.2 kb 的序列, 从测序结果(图 3)看出上游序列连接 XbaI、BamHI、XmaI(SmaI)、KpnI 几个酶切位点, 下游序列连接 SalI、PstI、SphI、HindIII 几个酶切位点.

## 3 讨论

作为启动子的某段序列包括核心启动子和上游启动子元件. 核心启动子又包括转录起始位点(帽子位点)和-25 区的 TATA 框, 其单独起作用决定转录的起始和产生基础水平的转录. 许多基因的上游启动子元件为 CCAAT 框, 存在于基因转录起始位点的上游, 可通过与转录因子的结合提高基因的表达水平. 受激素诱导基因的转录起始位点上游存在激素诱导识别序列, 可通过与激素受体和激素的结合诱导基因转录. 本试验扩增的卵清蛋白 5'端调控区测序结果与国外已发表序列(SHUMAN R, SHOFFNER R N. Potential genetic modifications in the chicken [A]. Proceedings of the 2nd world congress on genetic applied to livestock production [C]. Madrid: The organizing committee, 1982. 157-163.) 比较, 发现有 13 个碱基发生变化, 碱基序列发生变化的原因可能是个体品系的



(1) *Kpn*I 酶切位点; (2) *Xma*I 和 *Sma*I 酶切位点; (3) *Bam*HI 酶切位点; (4) *Xba*I 酶切位点; (5) 上游引物; (6)(8)(9)(11)(12) TATA 框样序列; (7) 和 (10), (13) 和 (14) 短的回文序列; (15) 上游启动子成分; (16) TATA 框; (17) 转录起始位点; (18) 下游引物; (19) *Sal*I, *Acc*I 和 *Hinc*II 酶切位点; (20) *Pst*I 酶切位点; (21) *Sph*I 酶切位点; (22) *Hind*III 酶切位点; □ 内斜体区部分为激素依赖性调控元件  
(1) *Kpn*I restriction enzyme cutting site; (2) *Xma*I and *Sma*I restriction enzyme cutting site; (3) *Bam*HI restriction enzyme cutting site; (4) *Xba*I restriction enzyme cutting site; (5) upstream primer; (6)(8)(9)(11)(12) TATA box sequence; (7) and (10), (13) and (14) short palindromic sequence; (15) upstream promoter; (16) TATA box; (17) transcription initiation site; (18) downstream primer; (19) *Sal*I, *Acc*I and *Hinc*II restriction enzyme cutting site; (20) *Pst*I restriction enzyme cutting site; (21) *Sph*I restriction enzyme cutting site; (22) *Hind*III restriction enzyme cutting site; □ hormone-dependent modulation factor in italic

图3 卵清蛋白5'端调控区测序分析

Fig. 3 Nucleotide sequence of ovalbumin 5'-terminal regulatory region

差异或者 *Taq* 酶效应所致,也可能由于测序误差。虽然多个碱基发生突变,但转录起始位点、-25区的 TATA 框、上游启动子成分 CCAAT 框、-870 ~ -700 区的 TATA 框样序列以及 -860 ~ -824 区和 -228 ~ -209 区的短回文序列<sup>[6]</sup>都没有发生变化。卵清蛋白基因受激素的调控,-870 ~ -780 区的激素依赖性调控元件<sup>[7,8]</sup>也没有变化,所以作为调控序列并不影响其应用,因此所克隆的卵清蛋白5'端调控区可用来启动外源基因的表达,为下一步构建卵清蛋白5'端调控区调控 hEPO 基因的质粒作准备。从测序结果也可以看出 *Xba*I、*Bam*HI、*Xma*I(*Sma*I)、*Kpn*I 几个酶切位点和上游序列相接,*Sal*I、*Pst*I、*Sph*I、*Hind*III 几个酶切位点和下游序列相接,结合质粒图谱知卵清蛋白5'端调控区方向与 pH18-T 载体中的 *LacZ*、*Amp* 及启动子方向一致,知其方向便于下一步设计构建其调控外源基因的表达载体。

#### 参考文献:

[1] 宇丽,赵君. 鸡卵清蛋白基因5'调控序列表达载体的构建及其在鸡原代输卵管上皮细胞及鸡成纤维细胞的表达[J]. 中国兽医学报, 2001, 21(1):21-24.

- [2] HEILIG R, MURASKOWSKY R, MANDEL J L. The ovalbumin gene family. The 5' end region of the X and Y genes[J]. *J Mol Biol*, 1982, 156(1):1-19.
- [3] OCHIAI H, PARK H M, NAKAMURA A, et al. Synthesis of human erythropoietin *in vivo* in the oviduct of laying hens by localized *in vivo* gene transfer using electroporation[J]. *Poultry Science*, 1998, 77 (2): 299-302.
- [4] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular cloning: A laboratory manual*[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 7.6-7.15.
- [5] 卢圣东. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:高等教育出版社, 1993. 520-531.
- [6] 宇丽,赵君,岳军明,等. 鸡卵清蛋白基因上游调控序列的克隆及序列分析[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(6):539-541.
- [7] SANDERS M M, MCKNIGHT G S. Positive and negative regulatory elements control the steroid-responsive ovalbumin promoter[J]. *Biochemistry*, 1988, 27(17):6 550-6 557.
- [8] HAECKER S A, MURAMATSU T, SENSENBAUGH K R, et al. Repression of the ovalbumin gene involves multiple negative elements including a ubiquitous transcriptional silencer[J]. *Mol Endocrinol*, 1995, 9(9):1 113-1 126.

【责任编辑 柴焯】