

乳線組織에서 特異적으로 發現되는 카제인 遺傳子の 클로닝 (I)

최인호, 배봉진, *이창수

(라미화장품 연구소, *건국대학교 생화학과)

Molecular cloning of casein gene which is expressed in mammary glands

In-ho Choi, Bong-jin Bae, *Chang-soo Lee

(Lamy Research Institute, *Kon-Kuk Universty Dept. Biochemistry)

요 약

우유단백질인 γ -카제인 유전자는 여러 호르몬들에 의해서 임신기간과 비유기기간 동안에 동물의 유선조직에서 발현되는 카제인 유전자 집단의 하나이다. 우유단백질 유전자의 유도를 조절하는 호르몬에 관한 메카니즘 설명으로 생쥐 γ -카제인 유전자가 분석되었고 특성을 밝혔다. γ -카제인 유전자는 박테리오파지 EMBL 3벡터에 삽입된 제논 도서관으로부터 γ -카제인 cDNA를 probe로 사용하여 스크린하여 하나의 클론을 얻었다. γ -카제인 cDNA probe는 부분적으로 염기배열을 밝혔으며 ATG 개시 암호와 5'-noncoding 부위를 포함하고 있다.

클론된 제논 DNA는 제한효소 Sal I에 의해서 EMBL 3벡터로부터 분리 되었다. 3개의 DNA밴드들을 관찰할 수 있었다. 각각의 크기는 28Kb, 14Kb 그리고 9Kb 이다. 따라서 삽입된 DNA의 크기는 대략적으로 23Kb 이다. Southern blot 분석 결과, 클론된 제논 DNA는 cDNA 5' 발단 부위를 합성한 oligonucleotides(40 mer)와는 결합되지 않음을 보여주고, 그러나 γ -카제인 cDNA와는 결합되는 것을 보여준다. Promoter 부위를 포함하는 γ -카제인 제논 DNA는 cDNA 5' 발단 부위의 합성된 probe에 의해

서 생쥐 제능 도서관으로부터 스크린하여 현재 29개의 클론을 얻었다.

1. 서 론

우유단백질의 주요한 구성성분들은 casein들과 α -lactalbumin이 있고, β -lactoglobulin은 반추동물에만 존재하는 반면, whey acidic protein은 비반추동물에만 존재한다. 우유단백질의 80%를 차지하고 있는 casein은 α -casein, β -casein, κ -casein 그리고 γ -casein 등으로 구성되어 있으며, 이들 단백질들은 calcium phosphate micelles이라는 복합체를 이루어 유즙내에서 안정된 상태로 존재하고 있다 (Waugh, 1971). Mouse에 있어서 α -, β - 및 γ -casein들의 분자량은 각각 44,000, 26,000, 그리고 22,000이다(Rosen *et al.*, 1975).

유전자 발현에 대한 분자기작을 밝히기 위하여 casein의 cDNA 클론들이 human, cattle, goat, sheep, guinea pig, rabbit, rat, mouse로 부터 분리되었으며, 이들 클론의 염기배열은 대부분 결정되어 졌다(Gregorio, P. Di. *et al.*, 1991; Derinoy, E. 1988; Ravi S. Menon *et al.*, 1992). 또한 우유단백질들의 genomic clone들도 분리되었다 (Compbell, S. M. 1984; Li-Yuan, Y. L. 1983; Pradman, K. 1984; William, K. J. *et al.*, 1984). 이와 같이 여러 종간의 genomic DNA들이 분리되었던 반면에, 아직도 mouse의 γ -casein genomic DNA는 분리되어 있지 않은 상태이다. 여러 종간의 염기배열 분석으로부터 casein mRNA는 세 개의 부위에서 상동성이 매우 높게 보존되어 있음을 알 수 있다. 이들 세 부위는 5'-noncoding 부위, signal peptide 그리고 casein kinase 인식부위이다(Blackburn *et al.*, 1982; Hobbs and Rosen. 1982). 또한 casein 유전자들은 하나의 같은 염색체상에 위치하고 있음이 보고되었다(Geissler, E. N. *et al* 1988; Gupta, P. *et al* 1982; Matyukov, V. S. and Urnysher, A. P. 1980).

따라서 여러 종류의 casein은 한 개의 조상 유전자의 복제에 의해서 진화되어 졌다고 생각되어진다. 한편 whey acidic protein 유전자는 casein 유전자와는 다른 염색체상에 존재하고 있다. 그러나 이들 유전자의 발현은 비유개시가 일어나는 동안에 함께 유도되며, 같은 종류의 호르몬들에 의해서 조절을 받는다. 또한 호르몬 반응에 의해서 발현되는 mRNA양은 casein mRNA의 종류에 따라 서로 다르다는 것이 알려졌다 (Hobbs, A. A. *et al* 1982). 유전자의 발현유도 및 발현량의 조절에 중요한 역할을 담당하는 casein promoter의 염기배열은 종이 다른 유전자들 사이에서도 매우 높은 상

동성을 가지고 있다. Rat의 세 종류의 casein과 bovine의 α -casein 유전자들 사이에 염기배열의 상동성은 약 80%를 보였다. 하지만, casein 유전자들 사이에서와 같은 높은 상동성은 casein과 WAP의 유전자들 사이에서는 관찰되지 않았다(Campbell, S. M. *et al*, 1984; Yu-Lee *et al*, 1986).

본 실험은, 아직 보고되어 있지 않은 mouse의 γ -casein genomic DNA를 클로닝하고 구조를 분석하였다. 클론된 유전자는 우유단백질 유전자의 발현조절을 규명함으로써 화장품의 생리활성 원료로 신원료 개발에 이용되어 질 수 있을 것이다. 현재 화장품 공업에서 casein은 화장품의 원료로서 보습, 미백 그리고 유화 작용 등에 이용되고 있다.

2. 재료 및 방법

1) 재료 : Mouse genomic library 및 모든 enzyme들은 Promega, Stratagen 또는 Sigma제품을 이용하였다. 방사성동위원소는 (α -³²P)dCTP(3000Ci/ μ mol)와 (α -³⁵S)dATP(3000Ci/ μ mol)를 Amersham의 제품을 사용하였다. 그밖에 사용된 kit들은 Amersham, TaKaRa 그리고 Promega 제품을 사용하였다.

2) Subcloning : cDNA와 genomic DNA는 각각 pGEM 4와 pBlue Script SK(+) vector에 T4 DNA ligase(TaKaRa ligation kit)를 사용하여 subcloning하였다. 형질전환은 각각 *Escherichia coli* JM109와 XL-1 Blue균주를 사용하였다. Plasmid DNA는 알칼리 방법을 이용하여 분리하였다. 배지(per liter, 10g of Bacto trytone, 5g of Yeast extract, 10g of NaCl with 100 μ g Ap/ml)에서 37 $^{\circ}$ C에서 over night 배양한다. Bacterial cell들을 원심분리하여 Solution I (50mM glucose, 25mM Tris-Cl pH8.0, 10mM MEDTA pH8.0), Solution II (0.2N NaOH, 1% SDS), Solution III (5M potassium acetate 60ml, glycolic acetic acid 11.5ml, H₂O 28.5ml)에 녹이고 얼음 위에서 10분간 반응한다. 이 혼합물을 원심분리(12Krpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분)하여 상층액을 취하여 phenol : chloroform : isoamyl-OH(25:24:1)을 첨가, 혼합하여 재 원심분리(12Krpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분)한다. 상층액에 3M Sodium과 100% Et-OH을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응 후, 원심분리한다. 침전물은 TE(10mM Tris HCl pH8.0/ 1mM EDTA)50 μ l에 녹인다. 그리고 염기배열은 알칼리에 의해서 변성후 사용한다(Chen and Seebreg, 1985).

3) DNA 염기배열 : 염기배열은 T7 DNA Polymerase (SequenaseTM from United

States Biochemical)을 이용한 dideoxy 방법(Sanger et al., 1977)을 사용하였다.

4) Screening 및 Southern blot analysis : γ -Casein 유전자를 screening하기 위하여 mouse liver의 genomic DNA library을 사용하였다. 이 library의 titer는 2×10^9 pfu/ml 이었다. Plating한 후 nylon membrane(Hybond-N, $0.45 \mu\text{m}$, Amersham)에 membrane에 흡착시킴. 흡착된 DNA는 변성용액(1.5M NaCl/0.5M NaOH)에서 변성시켜 중화용액[1.5M NaCl/0.5M Tris-HCl(pH8.0)]에서 중화, 그리고 $2 \times \text{SSC}$ 용액으로 2분동안 세척시켰다. U.V하에서 DNA를 고정화한다. $2 \times \text{SSC}$ 로 적신 후에 prehybridization과 hybridization ($5 \times \text{SSC}$, $5 \times \text{Denhardt's solution}$, 0.1% SDS, $100 \mu\text{g/ml}$ salmon sperm DNA)용액과 함께 (α - ^{32}P)dCTP($3000\text{Ci}/\mu\text{mol}$)로 표식된 Mouse γ -casein cDNA(1.2 Kb)를 probe로 68°C 에서 12-16시간 hybridization을 실시하였다. Membrane의 세척은 $2 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS로 실온에서 5분간 3회, $1 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS로 68°C 에서 1-1.5시간, $0.2 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS로 68°C 에서 1시간 세척하였다. 세척된 membrane은 -70°C 에서 약 48시간 X-ray film에 감광시켰다. 2차, 3차 screening은 1차 screening과 같은 방법으로 실시하였다. Southern blot도 아가로스 젤로부터 nylon membrane에 DNA를 흡착시켜, 위와같은 방법으로 hybridization하였다.

5) Phage DNA의 분리 : Phage DNA를 추출하는 방법에는 liquid culture 방법을 사용하였다. Bacteriophage(1×10^5 pfu)는 liquid culture하여 phage lysate를 만들어 DNase I 과 RNase A를 각각 $1 \mu\text{g/ml}$ 넣어주어 37°C 에서 1시간 배양하였다. 배양액은 4°C 에서 1시간 30분 원심분리하여 침전물을 0.5mM Tris-HCl(pH8.0)에 녹였다. 동량의 phenol(phenol 25: chloroform 24: isoamyl-OH 1)을 처리한 후, 상층액에 3M sodium acetate 0.1 Vol.과 100% Et-OH 6 Vol. 첨가 혼합하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 4°C 에서 10분간 $12,000 \text{ rpm}$ 으로 원심분리하였다.

6) Oligonucleotides : Southern blot hybridization의 probe로 사용된 oligonucleotide의 염기배열은 5'- ATC ATC ATC TAC CTA TTC CTC TCG TCT TCC ATT TGG GGA G - 3'(40mer)이며, mouse γ -casein cDNA의 5'-말단부분에 위치한다.

3. 결 과

클론된 γ -casein cDNA의 염기배열을 결정하기 위하여 phage 벡터에 삽입되어 있는 γ -casein cDNA(1.2Kb)를 plasmid 벡터인 pGEM4(2.79Kb)에 subcloning을 하였

다. 형질전환을 한 후 bacteria cell로부터 알칼리 방법에 의해서 DNA를 분리하였다 (Fig.1.). 클론된 cDNA의 구조는 Sanger 법에 의해서 염기배열을 일부 결정하여 구조가 5'-noncoding 부위, ATG의 start codon과 signal peptide 부위를 가지고 있음을 알 수 있었다(Fig.2.).

EMBL3 벡터로 제작된 mouse liver의 genomic library는 titer가 2×10^9 pfu/ml 이었다. 이중 2×10^5 pfu의 library로 plating하였다. Plaque hybridization에 사용된 probe는 pGEM4 벡터에 삽입된 mouse γ -casein cDNA를 PCR 반응으로 증폭하여 사용하였다. 증폭된 γ -casein cDNA 단편을 방사성동위원소 (α - 32 P)dCTP로 표식하여 probe로 사용하였다. 제1차 screening에서는 6개의 positive plaque들을 선발하였고, 제2차 screening에서는 단지 한 개의 plate에서만 강한 signal들이 관찰되었다. 제3차 screening에서는 1, 2차에서 사용된 probe로 hybridization을 실시한 결과 plate들의 모든 plaque와 x-ray film상의 signal이 모두 일치하였다(Fig.3.).

선발된 positive plaque로부터 phage lysate를 준비하였다. 준비된 lysate로부터 γ -casein genomic DNA를 분리하여, 1.2% 아가로스 겔에 전기영동분석하였다. 한 개의 DNA 밴드가 검출되었으며, 그 크기는 DNA size marker중에 크기가 제일 큰 23Kb보다 이동도가 느렸다. EMBL3 벡터는 *Sal* I의 삽입부위를 가지고 있으며, *Sal* I의 처리에 의해 삽입된 genomic DNA가 분리되어 질 수 있다. 따라서 재조합된 DNA를 *Sal* I으로 처리하여 보면 모두 3개의 DNA 단편을 관찰할 수 있었다. 이동거리가 제일 늦은 DNA 밴드는 insert DNA가 제거된 것으로 크기가 28Kb인 벡터 DNA(28Kb)이며, DNA size marker 중에서 길이가 제일 긴 23Kb의 DNA 밴드보다 위에 위치함을 알 수 있다. 나머지 두 개의 DNA 단편 길이는 각각 14Kb와 9Kb정도 이었다. 따라서 클론된 γ -casein genomic DNA의 크기는 약 23Kb로 추정되었다(Fig.4.). 한편 벡터에 절단부위를 갖지 않는 *Eco*R I으로 처리하면 4개의 DNA 단편(8.7Kb, 5.8Kb, 1.8Kb, 0.8Kb, 0.5Kb)들이 검출되지만 *Sal* I 보다는 크기가 작다. 이는 삽입 단편의 일부가 벡터에 연결되어 있음을 보여주는 것이다.

γ -Casein 유전자에 제한효소 *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind* III, *Kpn* I, *Pst* I, *Sal* I, *Sma* I, *Sph* I을 각각 처리하여 1.2% 아가로스 겔에서 140 - 150 volt로 약 2시간 전기영동하고, Probe로 γ -casein cDNA를 (α - 32 P)dCTP(3000Ci/ μ mol)로 표식하여 hybridization하였다. 그 결과 probe DNA와 강한 결합을 보인 밴드의 숫자는 *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind* III, *Kpn* I, *Pst* I, *Sal* I, *Sma* I, *Sph* I에서 각각 1개(9.1Kb), 1개(5.8Kb), 2개(3.5Kb, 1.1Kb), 1개(9.0Kb), 2개(8.9Kb, 4.3Kb), 1개(14Kb), 1개(10Kb), 2

개(9.0Kb, 6.5Kb)이었다(Fig.5). γ -Casein 유전자의 promoter의 존재를 확인하기 위하여 cDNA 5'-말단부분의 염기배열을 합성(40mer)하여, 이것을 (γ -³²P)dATP로 표식하여 probe로 Southern hybridization을 실시하였다. 하지만 oligonucleotide probe와 결합하는 밴드들을 확인할 수 없었다. 그러나 pBluescript SK(+)에 삽입된 γ -casein cDNA에서만 밴드를 확인할 수 있었다(Fig.6).

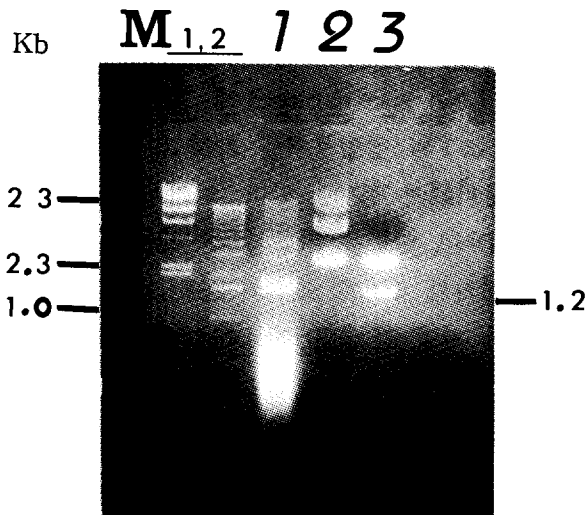


Fig. 1. Gel electrophoresis of plasmid DNA containing the 1.2Kb cDNA insert.

Lanes M1 and M2: DNA size markers of λ /*Hind* III and 1Kb ladder, respectively. Lane 1: pGEM4 vector. Lane 2: Recombinant DNA. Lane 3: digestion of recombinant DNA with *Acc* I and *Kpn* I.

5' ATCATC ATCTACCTAT TCCTCTGTC TTCCATTTGG GGAGCAAGGA ACAAGTAAC
5'-Noncoding region
ATGAAGTTCT TCATCTTTGC CTGCCTGGTG GTTGTGCTC TGGCAAAGCA CGAAATAAAG
<-----signal peptide region -----> 60
GATAAGTCCT CCAGTGAGGA ATCATCTGCC AGCATCTACC CAGGAAAGTC TAAGCTGGAC
120
AATAGCGTGT TCTTCCAAAC AACTAAGGAT TCTGCTAGCA GTTCATCCAG TGAGGAATCT
180
TCCGAGGAAG TCAGTGAAAA AATTGTACAA TCTGAAGAAC AAAAGGTCAA CCTAAACCAG
240
CAGAAAAAAT TCAAGCAATT TTCCCAGGAG TCTTCCTTTT OCCAATGTTG CACACCTCTT
300
CACCAGCAGC AGCAGAGCAG TGTGAACCAG TGGCCOCAG CCGAARGCCAT CCATAACACG
360
CCCACCCAGG AATCCATCAG CACCTCTGTG GAGGAAATCC TGCTGAAGAA GATTATTGAT
420
ATCAAGTACA TCCAATATCA ACAGGTCACC ATCCCCAAC TTCCCCAAGC TCTTCATCCC
480
CAGATACCTG TGAGCTACTG GTACCCAGT AAGGATTACA CCTTCCCAA TGCTCACTAT
540
ACGAGATTCT ACTAAGATTC CTAATAAAC TGCTGCTACC TAGCTATAGG CTTGAGTAGA
600
AAATTGGTTT CTTOGTGGTT TCC
624

Fig. 2. Sequence of mouse γ -casein cDNA.

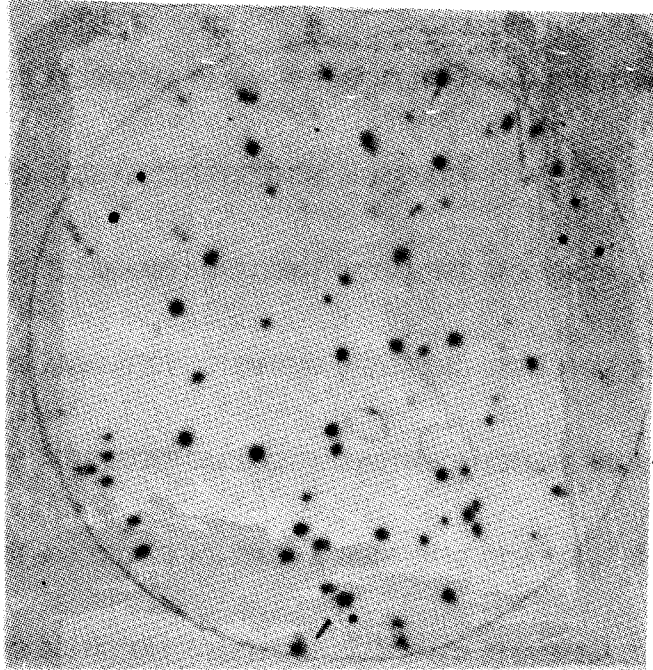


Fig. 3. The second screening of γ -Casein genomic DNA hybridized with cDNA probe.

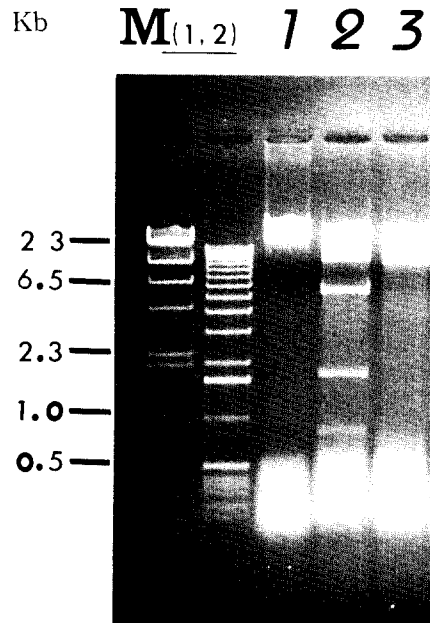


Fig. 4. Gel electrophoresis of mouse γ -casein genomic DNA digested with *EcoR* I, *Sal* I. Lanes M1 and M2: DNA size markers of λ /*Hind* III and 1Kb ladder, respectively. Lane 1: Recombinant DNA with γ -casein genomic DNA. Lane 2: *EcoR* I digestion of recombinant DNA. Lane 3: *Sal* I digestion of recombinant DNA.

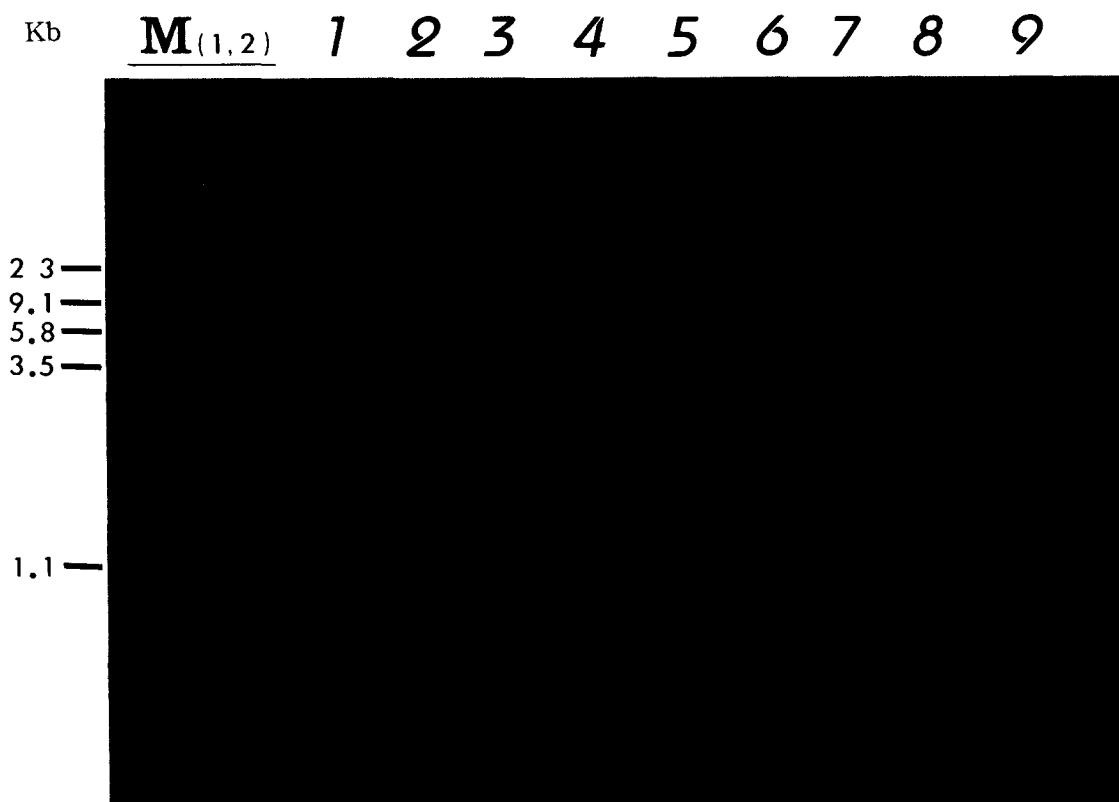


Fig. 5. Southern blot of γ -casein genomic DNA hybridized with cDNA probe.

Lanes M1 and M2: DNA size markers of λ /*Hind* III and 1Kb ladder, respectively. Lane 1: Recombinant DNA with γ -casein genomic DNA. Lane 2, *Bam*HI; 3, *Eco*RI; 4, *Hind* III; 5, *Kpn*I; 6, *Pst*I; 7, *Sal*I; 8, *Sma*I; 9, *Sph*I

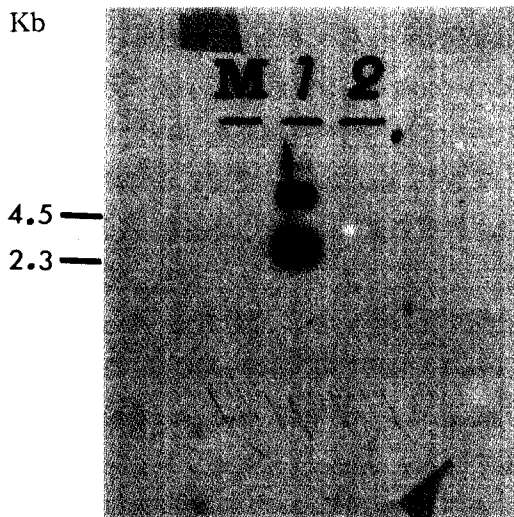


Fig. 6. Southern blot of γ -casein genomic DNA hybridized with oligonucleotide probe. Lane M: DNA size marker(λ /*Hind* III). Lane 1: Recombinant DNA with γ -casein cDNA. Lane 2: Recombinant DNA with γ -casein genomic DNA (*EcoR* I digestion).

4. 고 찰

본 연구는 우유단백질인 casein 유전자의 발현 조절을 연구하기 위해 현재 보고되어 있지 않은 mouse γ -casein 유전자를 클로닝하여 그 특성을 우선 분석하기로 하였다. Screening을 위해 사용된 mouse genomic library는 간의 genomic DNA를 *EcoRI*으로 처리한 후 EMBL3 벡터에 연결되어 작성되어진 것이다. Screening에 사용한 probe는 mouse γ -casein cDNA(1.2Kb)를 이용하여 3차에 걸쳐서 plaque hybridization을 실시하였다. 본 실험에 사용된 cDNA probe는 5'-noncoding 부위와 ATG의 start codon을 포함하고 있다. 그 결과 하나의 positive plaque를 얻었다. Plaque에서 추출된 DNA는 γ -casein cDNA와 특이적으로 결합하는 것을 Southern blot 분석법으로 재확인하였다. 즉 cDNA probe는 삽입된 genomic 단편과는 결합반응을 하지만 벡터와는 반응을 하지 않았다. 또한 클론된 재조합 유전자를 *Sal I*으로 절단한 결과, *Sal I*서는 14Kb와 9Kb의 단편이 검출되었다. *Sal I*에 의해서 EMBL3 벡터에 삽입된 단편의 크기가 23Kb임을 확인하였다. 또한 클론된 유전자를 제한효소 *EcoRI*으로 절단하여 검출되는 5개의 단편(8.7Kb, 5.8Kb, 1.8Kb, 0.8Kb, 0.5Kb)들을 pBluescript SK(+) 벡터에 subcloning하였다. 여러가지 제한효소 즉 *BamHI*, *EcoRI*, *Hind III*, *Kpn I*, *Pst I*, *Sal I*, *Sma I*, *Sph I*에 의해 처리된 각 클론을 mouse γ -casein cDNA probe로 Southern blot 분석을 한 결과 probe와 결합하는 단편과 결합하지 않는 단편들이 있음을 확인하였다. 이는 genomic 유전자가 단백질을 coding하는 부분인 exon과 그렇지 않은 intron의 구조로 이루어져 있음을 반영한 결과라 하겠다.

클론된 genomic DNA에 전사조절에 관여하는 조절부위 즉 promoter가 존재하는지를 분석하였다. 클론된 genomic 유전자와 γ -casein cDNA의 5'-말단부분의 염기배열(40mer)를 합성하여, 합성된 oligonucleotide를 probe로 다시 Southern blot 분석을 실시한 결과 결합이 일어나지 않았다. 그러나 합성된 oligonucleotide probe는 벡터에 삽입된 γ -casein cDNA와 결합하는 것을 확인하였다. 이 결과로써 screening하여 찾은 mouse γ -casein genomic DNA가 mouse γ -casein cDNA의 5'-말단부분과 결합된 것이 아니고 그 아래 부분과 결합된 것임을 추측할 수 있었다. 따라서 promoter부위를 포함하는 genomic DNA를 계속적인 screening을 통해서 찾고 있는 중이다. 현재에는 합성된 oligonucleotide를 probe로 plaque hybridization하여 1차 screening에서는 약 70여개의 positive plaque를 얻었으며, 2차 screening에서는 cDNA를 probe로 사

용하여, 1차에서 얻은 positive plaque 70여개를 hybridization하였다. 그 중에서 29개의 single positive plaque를 얻었다.

앞으로 얻어질 γ -casein 유전자의 promoter 부위는 milk protein의 합성과 분비 전사조절기구의 규명을 촉진하는데 활용되어질 수 있을 것이다. 따라서 casein을 이용한 분자 level에서 화장품의 신원료 개발 등 여러 분야에 적용되어질 수 있다.

Abstract

The gene for γ -casein, a milk protein, is a member of a family of casein gene which is expressed in mammary glands of the animal during the late gestation and lactation periods under the influence of various hormones. In order to elucidate the mechanisms by which hormones regulate the coordinate induction of milk protein genes, the mouse γ -casein gene was isolated and characterized. The γ -casein gene was screened from a mouse genomic library constructed in bacteriophage EMBL3 with the γ -casein cDNA used as probe and one clone was obtained. The γ -casein cDNA as probe was partially sequenced and contained ATG start codon and 5'-noncoding region.

The cloned genomic DNA was digested with *Sal*I restriction enzyme, by which the insert DNA can be isolated from EMBL3 vector. Three DNA bands were observed and the size of DNAs was approximately 28Kb, 14Kb and 9Kb, respectively. Accordingly the size of the insert DNA was calculated with approximately 23Kb. The result of Southern blot analysis, however, showed that the cloned genomic DNA was not hybridized with the synthetic oligonucleotides (40 mer) of cDNA 5'-end region, but it was hybridized with the γ -casein cDNA. This means that the cloned γ -casein gene may not contain its promoter region. The γ -casein genomic DNA containing the promoter region has been screening from mouse genomic library with oligonucleotides of cDNA 5'-end region as probe, and twenty-nine clones was obtained.

참 고 문 헌

1. Blackburn, D. E., Hobbs, A. A and Rosen, J. M. 1982. *Nucleic Acids Res.* 10, 2295-2307.
2. Campbell, S. M. and Rosen, J. M. 1984. Comparison of the WAP genes of the rat and mouse. *Nucleic Acids Res.* 10, 8685-8697.
3. Geissler, E. N., Cheng, S. V., Gusella, J. F. and Housman, D. E. 1988. Genetic analysis of the dominant white-spotting(W) region on mouse chromosome 5: identification of clones DNA makers near W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9635.
4. Gupta, P., Rosen, J. M., D'Eustachio, P., and Ruddle, F. H. 1982. *J. Cell Biol.* 93, 199-204
5. Hobbs, A. A. and Rosen, J. M. 1982. Sequence of rat α - and γ -casein mRNAs: evolutionary comparison of the calcium-dependent rat casein multigene family. *Nucleic Acids Res.* 24, 8079-8098.
6. Hobbs, A. A., Richards, D. A., Kessler, D. I. and Rosen, J. M. 1982. *J. Biol. Chem.* 257, 3598-3605
7. Matyukov, V. S. and Urnysher, A. P. 1980. *Gentika* 16, 884-886.
8. Ercier, J. C. and Vilotte, J. L. 1993. Structure and function of milk protein genes. *J. Dairy Sci.* 76, 3079-3098.
9. Pradman, K. Q. & Surinder, K. S. 1984. Similarity of the nucleotide sequences of rat α -lactalbumin and chicken lysozyme genes. *Nature* 308, 377-380.
10. Rosen, J. M., Woo, S. L. C. and Constock, J. P. 1975. *Biochemistry* 4, 2895-2903.
11. Waugh, D. F. 1971. Milk proteins.(Mckenzie HA, Ed.) 3, 3-85, Academic Press, New York.
12. Yu-Lee, L. Y., Richter-Mann, L., Couch, C. H., Stewart, A. F., Mackinlay, A.
13. G. and Rosen, J. M. 1986. Evolution of the casein multigene: conserved sequences in the 5'-flanking and exon regions. *Nucleic Acids Res.* 14, 1883-1902.