

凡纳滨对虾 DNase 基因的克隆及原核表达

兰旺仁 张子平 邹志华 王国栋 王艺磊 *

(集美大学水产学院 集美大学省高校水产科学技术与食品安全重点实验室 厦门 361021;
美国德克萨斯州立大学化学与生化系 德克萨斯 圣马克斯 78666)

摘要:利用 RT-PCR 和 RACE 技术,从凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 肝胰腺中克隆了 DNase 基因的全长 cDNA 序列。该序列全长 1 614 bp, 包含 1 209 bp 的开放阅读框, 编码一个含 403 个氨基酸的蛋白; 5' 非翻译区为 116 bp, 3' 非翻译区为 289 bp。实时定量 PCR 分析结果表明, DNase 基因在肝胰腺的表达量是其他器官表达量的 16 ~ 162 倍, 表明凡纳滨对虾 DNase 基因属于胰腺型表达。本研究还利用酶切重组构建原核表达载体, 并在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中成功表达出了有活性的重组 DNase 蛋白。

关键词: DNase ; RACE; 原核表达 ; 凡纳滨对虾

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2010) 01-08-10

Cloning and Prokaryotic Expression of DNase from *Litopenaeus vannamei*

LAN Wang-Ren ZHANG Zi-Ping ZOU Zhi-Hua WANG Guo-Dong WANG Yi-Lei *

(The Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety,
Fisheries College, Jin ei University, Xiamen 361021, China;

Department of Chemistry & Biochemistry, Texas State University, TX 78666, USA)

Abstract: The complete cDNA sequence of DNase was isolated from *Litopenaeus vannamei* hepatopancreas by RT-PCR and RACE. The full length cDNA of DNase was 1 614 bp, consisting of a 5' noncoding region of 116 bp, a 3' noncoding region of 289 bp, and an open reading frame of 1 209 bp encoding a polypeptide of 403 amino acids. Real time quantitative PCR analysis revealed that the expression level of DNase gene of *L. vannamei* in hepatopancreas was 16 - 162 folds higher than that in other 5 selected organs and DNase gene of *L. vannamei* belonged to hepatopancreas type. Furthermore, a DNase protein expression system based on *Escherichia coli* was constructed and functional recombinant DNase protein was obtained successfully.

Key words: DNase ; RACE; Prokaryotic expression; *Litopenaeus vannamei*

脱氧核糖核酸酶 (EC 3.1.21.1 deoxyribonuclease, DNase) 是 1905 年在牛 (*Bos taurus*) 胰腺中发现的一种特异性 DNA 水解酶。它在 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等二价金属离子存在的条件下水解双链或单链 DNA 生成 5' 磷酸末端和 3' 羟基末端。

近年来研究发现, DNase 除了参与体内 DNA 的水解代谢外, 还参与细胞的凋亡, 把 DNA 降解产生 DNA ladder^[1], 同时也能与细胞

表面受体 (CiMPR) 结合, 作为转录因子调节与细胞凋亡有关的 *Fas* 基因的表达^[2]。DNase 还参与细胞坏死过程中染色质的降解^[3]。近

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30571430), 集美大学创新团队基金项目 (No. 2008A001);

*通讯作者, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn;

第一作者介绍 兰旺仁, 男, 硕士研究生; 研究方向: 水产生物技术; E-mail: biokwr@126.com。

收稿日期: 2009-04-08, 修回日期: 2009-11-09

年来 DNase 在临床中的应用和研究越来越广泛, DNase 作为急性心肌缺血早期标志物, 比肌钙蛋白、心肌型肌酶激酶同工酶等其他标志物灵敏度好且特异性高^[4]; DNase 与系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 的关系也是研究的重要方向, 有研究认为这一病症与体内 DNase 活性或含量降低, 不能及时清除过多的核蛋白复合物, 使自身抗原滞留诱导产生自身抗体有关^[5]。

人类 (*Homo sapiens*) DNase 和牛胰腺 DNase 早在 20 世纪 80、90 年代就已经研究得比较清楚^[6], 有趣的是, 蓝藻^[7]、细菌^[8]、真菌核酸酶及线粒体核酸酶^[9]也有与牛肝胰腺 DNase 类似的水解双链或单链 DNA 生成 5 磷酸末端和 3 羟基末端的活性, 但氨基酸序列与牛等脊椎动物特有的一类 DNase 没有明显的相似性^[10-13]。为了探讨与人类和牛 DNase 相似蛋白在进化距离较远的物种中, 其结构特性及分子结构的演化, 本实验室在多年研究甲壳动物基因结构和功能的基础上, 选择与人类和牛进化关系较远的节肢动物凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 为研究对象, 克隆其 DNase 基因, 并与已知的 DNase 在 mRNA 和氨基酸水平进行序列比较, 初步分析了 DNase

在演化过程中分子结构与功能的关系。本研究还初步获得了在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达且有活性的重组蛋白, 并分析了其活性和功能, 为后续进一步分析凡纳滨对虾 DNase 的空间结构和功能基团, 探讨其在凡纳滨对虾生长发育过程中的作用, 进而将其开发成为一个生物工程研究的工具酶或药物打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料 凡纳滨对虾 (体长 12 ~ 15 cm) 购自厦门市集美农贸市场; DH5a 菌株为实验室自备; pET32a 表达质粒和 BL21 (DE3) 表达菌株为厦门大学生命科学院王重刚教授惠赠。

RNA 提取试剂 RDP 参照文献^[14]由实验室自行配制; M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司; 质粒提取和琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上

海捷瑞生物公司; pMD18-T 载体连接试剂盒购自宝生物 (大连) 公司; SYBR Green Realtime PCR Master Mix 试剂购自 TOYOBO 公司; *Bam*H 内切酶、*Hind* 内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 MB I 公司; DNA Marker 购自天根生化公司; 单链 M13 噬菌体 (M13mp18) 购自上海华美生物公司。

1.2 方法

1.2.1 RACE 引物设计 根据文献^[15]报道的日本囊对虾 (*Marasupeneus japonicus*) DNase 核苷酸序列 (GenBank 序列号: CAB55635), 用 Primer 5.0 软件设计引物, 由上海捷瑞生物公司合成, 同时根据 Clontech 公司的 SMARTTM RACE 试剂盒手册合成 SMART、UMP、NUP、5 CDS、3 CDS 通用引物。特异引物序列如下: 5 RACE outer: 5'-GGT GTC CCT TGG CGA AGT AGA GC-3'; 5 RACE inner: 5'-CGA GTT CTG GGT GTA GCA GGT GGA-3'; 3 RACE outer: 5'-ATT GAT TCG CGT GTG CTT CGA-3'; 3 RACE inner: 5'-AGT CCT CCT CGG GAT TCT TCA GC-3'。

1.2.2 凡纳滨对虾肝胰腺总 RNA 的提取 凡纳滨对虾解剖后立即取出肝胰腺, 按实验室已经建立的方法和步骤^[14, 16-17]提取总 RNA, 利用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计进行总 RNA 的定量和纯度分析。

1.2.3 5 RACE 逆转录: 在 0.2 ml 薄壁 PCR 管中加入 2 μ g RNA、10 μ mol/L 5 CDS 引物 1 μ l、10 μ mol/L SMART 引物 1 μ l, 加无菌水到终体积为 14 μ l, 混匀, 短暂离心, 70 $^{\circ}$ C 3 min, 迅速放入冰中冷却 3 min; 再加入以下试剂: 5 \times Buffer 4 μ l、10 mmol/L dNTPs 1 μ l、200 U/ μ l M-MLV 逆转录酶 1 μ l, 终体积为 20 μ l, 短暂离心, 42 $^{\circ}$ C 90 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 得到的 5 RACE cDNA 第一条链, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

第一轮 5 RACE-PCR 特异性扩增: 以 cDNA 第一条链为模板, URM 和 5 DNase outer 为两端引物, 用梯度 PCR 的方法进行第一次特异性扩增。程序如下: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 ~ 70 $^{\circ}$ C 梯度退火, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环;

72 10 min。

第二轮 5 RACE-PCR 特异性扩增 (Nested-PCR):以第一轮 PCR 产物为模板,NUP和 5 DNase inner为引物,进行第二次特异性扩增。

1.2.4 3 RACE 逆转录:在 0.2 ml薄壁 PCR 管中加入 2 μ g RNA、10 μ mol/L 3 CDS引物 1 μ l,加无菌水到终体积为 14 μ l,其他操作同 5 RACE。

第一轮 3 RACE-PCR 特异性扩增:以 cDNA 第一条链为模板,URM 和 3 DNase outer为两端引物,用梯度 PCR的方法进行第一次特异性扩增,循环程序同 5 RACE。

第二轮 3 RACE-PCR 特异性扩增 (Nested-PCR):以第一轮 PCR 产物为模板,NUP和 3 DNase inner为引物,进行第二次特异性扩增。

1.2.5 RACE产物的克隆及序列分析 用 1% 琼脂糖电泳检测 RACE扩增结果,利用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段。用 pMD18-T载体连接试剂盒将目的片段与 pMD18-T载体进行连接,转化 DH5 大肠杆菌感受态细胞,涂布在含有 100 μ g/ml氨苄青霉素的 LB 培养基上进行筛选,挑取单菌落进行培养,提取质粒,用 PCR方法进行鉴定。阳性克隆序列测定委托北京三博远志公司进行。将扩增 cDNA 所得 5 端序列和 3 端序列用 b12seq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/b12seq/wblast2.cgi>) 进行序列拼接,得到完整的凡纳滨对虾 DNase 基因 cDNA 序列 (GenBank 序列号: FJ548925)。

1.2.6 全长 ORF 的验证及氨基酸序列分析 根据 b12seq 拼接的结果,设计全长 DNase ORF 序列的引物,并根据 pET32a 的酶切图谱,在 F 端引物加上 *Bam*H 内切酶酶切位点、在 R 端引物加上 *Hind* 内切酶酶切位点,并根据需要加上保护碱基。引物序列为 DNase F: 5'-TAT CCG A TC CAT GTC GGG GTT TGG CTT C-3', DNase R: 5'-GAG TAA GCT TTT GCG AAT GAG CTT CAC CA-3',下划线部分为酶切位点。用 Oligo dT 引物进行逆转录,然后用

DNase F 和 DNase R 引物进行 PCR,琼脂糖凝胶电泳,胶回收目的片段。将目的片段与 pMD18-T 载体进行连接,转化 DH5 大肠杆菌感受态细胞,涂布在含有 100 μ g/ml氨苄青霉素的 LB 培养基上进行筛选,挑取单菌落进行培养,提取质粒,用 PCR 方法鉴定。阳性克隆序列测定委托北京三博远志公司进行。用 Blastx 方法分析 DNase 氨基酸序列,与已知序列比较分析 DNase 酶活性保守序列,接着用 SignalP 3.0 分析活性位点,用 T-coffee 多重比对法对凡纳滨对虾 DNase、日本囊对虾、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*, 序列号: NP_49078)、致倦库蚊 (*Culex quinquefasciatus*, 序列号: XP_001843958)、赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*, 序列号: XP_9_73587)、埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*, 序列号: EA42072)、沙门氏杆菌 (*Salmonella enterica* sub sp., 序列号: AAL91099)、鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*, 序列号: ABA25046) DNase 进行氨基酸一致性分析,同时用 MEGA 软件采用最小进化法 (minimum evolution, ME) 构建 DNase 基因在凡纳滨对虾、日本囊对虾、黑腹果蝇、致倦库蚊、赤拟谷盗、斑马鱼 (*Danio rerio*, 序列号: NP_998318)、大西洋鲑 (*Salmo salar*, 序列号: AC170073)、红原鸡 (*Gallus gallus*, 序列号: NP_996840)、牛 (序列号: NP_776959)、人类 (序列号: NP_005214) 的系统进化树。

1.2.7 各组织器官 mRNA 水平的表达分析 根据凡纳滨对虾全长 cDNA 序列,设计定量 PCR 引物, Real time primer F: 5'-AGA CCT TGC TGG GAG ATGA-3', Real time primer R: 5'-CCC TTG GCG AAG TAG AGC-3'。分别提取凡纳滨对虾肝胰腺、肌肉、眼、肠、鳃和心共 6 种组织器官的总 RNA,用 DNase 去除样本中的痕量 DNA,并逆转录 RNA 为 cDNA 第一条链,每种组织各取 4 个不同个体的样品。实时荧光定量 PCR 体系以 cDNA 第一条链为模板,以 18S rRNA 为内参标基因, 18S rRNA 的引物序列, 18s-F: 5'-CGT CGC TAC TAC CGA TTG AAT GGT C-3', 18s-R: 5'-TTC ACC TAC GGA AAC

CTT GTT ACG ACT-3'。以凡纳滨对虾 DNase 基因特异的引物进行定量 PCR 反应。每个反应包括: 10 μ l SYBR Green Realtime PCR Master Mix, 10 μ mol/L F、R 引物各 1 μ l, 1 μ l cDNA 模板及 7 μ l 无菌超纯水, 每个样品做 4 个重复样。反应条件 95 15 s, 60 1 min, 40 个循环。

基因表达水平用相对定量 (relative quantitative, RQ) 平均值 \pm 标准差来表示, 并用 SPSS 统计软件对样品进行方差分析 (ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为显著水平, 以 $P < 0.01$ 为极显著水平。

1.2.8 原核表达重组质粒 DNase pET32a 的构建 将经测序证实核苷酸序列正确的 pMD18-DNase 质粒以及 pET32a 质粒用 *Bam*H 和 *Hind* 酶切。回收 DNase 目的片段以及成功酶切的 pET32a 质粒, 用 T4 DNA 连接酶进行连接, 转化 DH5a, 筛选出重组质粒, 经 PCR 和酶切鉴定序列完全正确后, 再提取质粒, 转化入 BL21 大肠杆菌中。

1.2.9 凡纳滨对虾 DNase 重组蛋白的表达、初分离 在 1.5 ml 的离心管中, 加入 1 ml 含有 200 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 接入 5 μ l 构建好的含有 DNase 重组质粒的 BL21 大肠杆菌, 30 摇菌过夜。1 100 37 扩大培养 2 h, 加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L, 30 再培养 6 h, 同时做 pET32 空载体的空白对照, 收集菌体进行 12% SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达。

按文献^[18]的变性透析方法对凡纳滨对虾 DNase 重组蛋白包涵体进行初步分离及复性: 将诱导表达菌液分装在 50 ml 离心管中, 4 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 10 ml 0.05 mol/L pH 8.0 Tris-HCl, 悬浮沉淀, 25 W 超声波破碎 1 min, 重复 3 次, 4 10 000 r/min 离心 15 min, 保留上清, 沉淀再用 0.05 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 悬浮, 再进行超声波破碎, 重复以上步骤 3 次。弃上清, 沉淀用含 8 mol/L 尿素的 0.05 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 溶解, 然后逐渐用含有 8 mol/L、6 mol/L、4 mol/L、

2 mol/L 尿素和无尿素的 0.05 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 透析过夜。

1.2.10 凡纳滨对虾 DNase 重组蛋白的功能分析 用 SDS 裂解, 酚/氯仿/异戊醇抽提方法提取大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 基因组 DNA (双链)。取 1 μ l 初步分离透析的凡纳滨对虾 DNase 重组蛋白产物和阴性对照产物, 在 37 和 60 温度条件下, 在有 Mg^{2+} 和无 Mg^{2+} 条件下, 分别水解 10 μ g 大黄鱼基因组 DNA 和 10 μ g 单链 M13mp18, 3 h, 琼脂糖凝胶电泳检测重组 DNase 蛋白的活性。

2 结果

2.1 5 RACE 和 3 RACE 结果 5 RACE 和 3 RACE 的第一轮 PCR 产物及第二轮 PCR 产物, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 第一轮 PCR 产物没有明显特异条带出现, 第二轮 PCR 5 RACE 在大约 700 bp 处有特异的条带, 3 RACE 在大约 900 bp 处有条带 (图 1)。克隆测序, 5 RACE 的产物片段长度为 709 bp, 3 RACE 的产物片段长度为 950 bp。

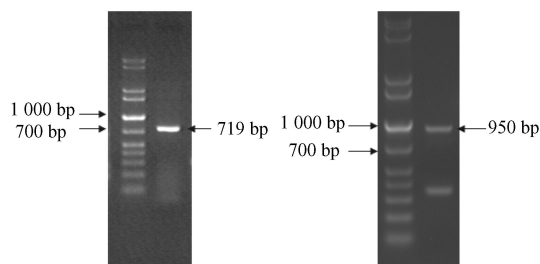


图 1 凡纳滨对虾 DNase 5 RACE 和 3 RACE 扩增片段的电泳图

Fig 1 The results of 5' and 3' RACE amplification of DNase cDNA

左: 5 RACE 结果; 右: 3 RACE 结果。

Left: The result of 5'-RACE;

Right: The result of 3 RACE

2.2 RACE 序列分析拼接结果 将 5 RACE 测序序列和 3 RACE 测序序列用 b12seq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/b12seq/wblast2.cgi>) 进行序列拼接, 得到凡纳滨对虾 DNase 基因的全长 cDNA 序列, 共 1 614 bp, 包括 116 bp 的

用最小进化 (ME)法构建出的系统进化树显示, DNase 基因凡纳滨对虾和日本囊对虾、黑腹果蝇、致倦库蚊、赤拟谷盗等进化距离较近, 与人类、牛、斑马鱼、大西洋鲑及红原鸡进化距离较远 (图 4)。

<i>L. vannamei</i>	225	QLYFAKGHLAPDADFVTEAEQD	ATYYYINAVPQWQVFNNGNWKY	268
<i>M. japonicus</i>	225	QYYFAKGHLAPDADFVTEAEQD	ATYYYINAVPQWQAFNNGNWKY	268
<i>D. melanogaster</i>	242	NIFLARQHMGAADVFVFAPEQR	ATFLPINAAPQWQTFNAGNWAR	285
<i>C. quinquefascia</i>	164	SFFAKGHLTPDCDAVLDTWAD	ATYFYINAAPEWQVINVGWLR	206
<i>T. castaneum</i>	218	NSFLSRGHLSPDADFLYAATQY	TSYYYINAAAPQWQTINAGNWKY	261
<i>A. aegypti</i>	245	DMFLARQHLAAKADFVFAHQE	ATFWFINVAPQWQKFNAGNWAR	288
<i>S. enterica</i>	128	LLKVDRGHQAPLAGLGGVSDWF	SLNYLSNITPQKSALNOGAWAA	171
<i>A. variabilis</i>	117	GSCYDRGHIAPSADRTKTEDNAA	TFLMTNMMEQTPDNNRNTWGN	161
<i>L. vannamei</i>	269	LEPATRDLAEAHGTD	LTIIYTGWAVLTLDDINANPVEIYLGTE	312
<i>M. japonicus</i>	269	LEPATRDLAESHSTD	LTIIYTGWGVLTLLDINGNPVEIYLGTE	312
<i>D. melanogaster</i>	286	VEDGVRAWVAKENKH	VECWITGVWGVTTLPNKNGEQRLYLSHDN	329
<i>C. quinquefascia</i>	207	VENAARKVAARLNDT	VRVPTGVYDVLQLPDANGRPVSITLA	247
<i>T. castaneum</i>	262	TELLVRKLADNLGET	LTVITGTGYGLTLPDVNDNEVDVLY	302
<i>A. aegypti</i>	289	IETGVKDFVARNDLN	VTVYTGTGYGILELADANGDMQFIYLDIDF	332
<i>S. enterica</i>	172	LENRGRELAKQADVSVVHVVTGFLFE	RHIATLP	204
<i>A. variabilis</i>	162	LEDYCRELVSQGKE	LYIVAGFNGSLGKF	189

图 3 凡纳滨对虾 DNase I 推导氨基酸与其他物种的 DNase I 的多重比对

Fig. 3 Multiple alignment of DNase I amino acid sequence between *L. vannamei* and other species

物种名称和 GenBank 序列号见“材料与方法”。

Species name and GenBank accession number see “material and method”.

一致性高低通过颜色显示。

Consistency scores are shown by color as: BAD AVG GOOD

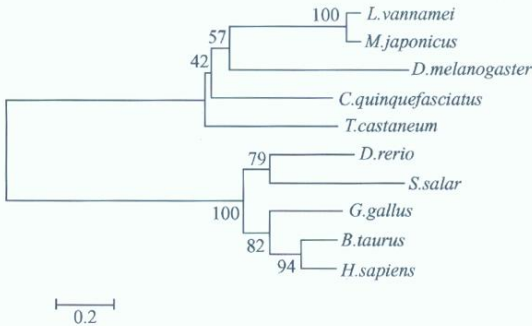


图 4 凡纳滨对虾 DNase 氨基酸与其他物种的 DNase 的系统进化树

Fig 4 Phylogenetic tree of DNase amino acid sequence between *L. vannamei* and other species

分枝点处的数值为 1 000 次 Bootstrap 置信值;标尺表示相对遗传距离;

物种名称和 GenBank 序列号见“材料与方法”。

The values of bootstrap confidence level(BCL) of nodes are indicated above the branch(1 000 replications), scale bar indicates relative genetic distance. Species name and GenBank accession number see “material and method”.

2.3 实时定量 PCR 结果 用 SPSS 统计软件对凡纳滨对虾各组织 DNase 相对于 18S rRNA 的相对表达量 RQ 值进行单因素方差分析显示, DNase 在不同的组织器官中的表达水平存在差异, 在肝胰腺中的表达水平最高, 其次为肌肉, 肝胰腺表达水平是其他组织表达水平的 16~162 倍, 与其他 5 种器官有极其显著

的差异 ($P < 0.01$), 另外 5 种器官相互之间不存在明显差异 (图 5)。

2.4 蛋白表达分析结果 在加入 IPTG 诱导表达后, 每隔 1.5 h 取样, 进行 PAGE 胶电泳, 在大约 44 ku 处出现与预期大小一致的蛋白条带, 而诱导前和空载体则无条带, 目的蛋白表达量占总蛋白的 20% 左右, 电泳结果见图 6。

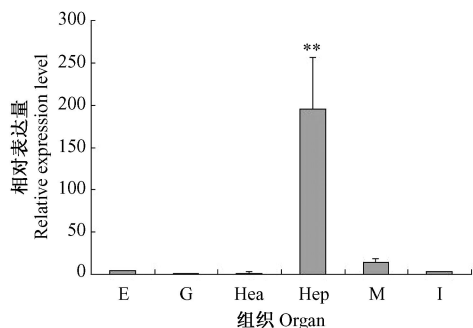


图 5 DNase 基因在不同组织的表达水平分析

Fig 5 The expression level analysis of

DNase in different organs

E 眼; G 鳃; Hea 心; Hep. 肝胰腺;

M: 肌肉; I 肠; **表示与其他组织的

差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

E Eye; G Gill; Hea Heart; Hep. Hepatopancreas;

M: Muscle; I Intestine; Significant difference

from other organs were indicated as ** $P < 0.01$.

粗分离透析产物,在 37 和 60 温度条件下,在有 Mg^{2+} 和无 Mg^{2+} 情况下分别作用于 10 μg 基因组 DNA 和 10 μg 单链 DNA,3 h 后检测重组 DNase 的活性。从结果可以看出(图 7),在有 Mg^{2+} 条件下,重组 DNase 在 60 能完全对 DNA 进行酶切,在 37 也能比较完全对 DNA 进行酶切;在无 Mg^{2+} 的情况下,重组 DNase 在 60 下有部分水解酶的活性,而在 37 情况下,酶活性很差。结果显示,该重组 DNase 表达产物,在复性过程中,蛋白质进行了正确的折叠,具有水解双链或单链 DNA 的功能和活性,水解活性依赖 Mg^{2+} 的存在,且 60 条件下,比 37 条件下酶活性高。

3 讨论

凡纳滨对虾属无脊椎动物,还没有完全进化出可区分的肝和胰,器官分化有别于进化程度较高的脊椎动物。虽然虾的 DNase 与牛的 DNase 有类似的酶特异性活性^[22],但从图 4 中可以看出,二者在进化距离上较远。在最近的研究中,通过氨基酸序列比较将 DNase 分为两类。第一类为牛胰腺 DNase 相似蛋白,氨基酸序列高度保守,只存在于脊椎动物

中^[23];另外一类广泛分布于蓝藻^[7]、细菌^[19]、埃及斑蚊^[21]等生物体中,除了大约 80 个氨基酸残基活性部位相对保守外,其余氨基酸序列各不相同。凡纳滨对虾的 DNase 属于第二类。

前人应用 RT-PCR 检测不同组织 DNase mRNA 的表达,发现不同组织酶活性的差异与 DNase 表达的差异呈正相关, DNase mRNA 表达高的酶活性也高^[24],根据 DNase 酶组织表达差异将其分为三大类:胰腺型、腮腺型和胰腮腺混合型。本研究获得的凡纳滨对虾 DNase mRNA 在肝胰腺中表达水平最高,而且与其他组织表达水平有极显著差异,属于胰腺型。这为后续从凡纳滨对虾组织中大量提取 DNase 酶提供依据和方向。

pET 系统是由 Novagen 公司构建的高效原核表达系统,目的基因被克隆到 pET 质粒上,受噬菌体 T7 强转录及 T7 RNA 聚合酶诱导,高效表达 T7 启动子下游的外源基因,表达量可达菌体蛋白的 50%^[25]。本研究中重组 DNase 基因在 IPTG 诱导 1.5 h 后就有大量重组蛋白的表达,到 4.5 h 左右,就基本达到饱和的表达量,表达量占总蛋白的 20% 左右。本研究同时对 DNase 基因表达的蛋白进行了可溶性与不可溶性分析,蛋白主要以不溶性融合蛋白包涵体的形式存在,同时我们发现在超声波作用后的保留上清中,也有少量有功能的重组 DNase 蛋白存在。因此在后续研究工作中,调节 IPTG 诱导浓度及其他影响表达的因素,预期能进一步提高重组蛋白的表达量及可溶性蛋白的含量。

重组牛胰腺 DNase 蛋白近年来已经在临床上作为祛痰药使用,在水解囊性纤维化患者呼吸道的大分子 DNA、降低分泌物黏稠性^[26-27]上获得了应用。目前本实验表达的重组 DNase 蛋白也有很好的水解 DNA 的功能。与目前在基因组文库克隆^[28]和 SNP^[29]分析中频繁使用的双链特异性核酸酶 (duplex-specific nuclease, DSN) 的氨基酸序列进行比较发现,凡

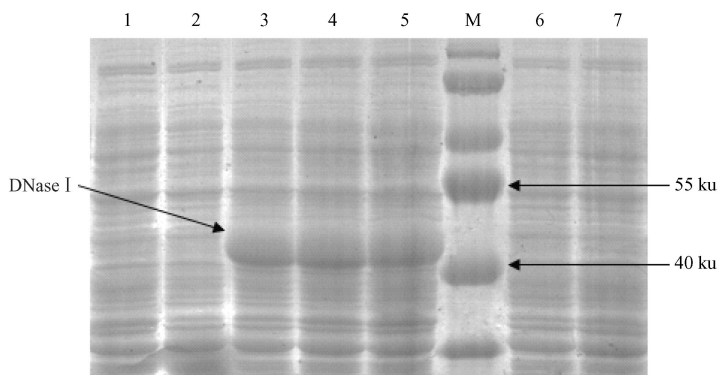


图 6 不同诱导时间对重组 DNase 的影响

Fig 6 The expression of recombinant DNase at different inducing time

1 为 DNase pET32a 未加 IPTG 诱导 1.5 h 后原核表达结果; 2~5 分别为 DNase pET32a 加 IPTG 诱导 0 h、1.5 h、3 h 和 4.5 h 后 DNase 原核表达结果; 6 为 pET32a 空白对照 0 h 结果; 7 为 pET32a 空白对照加 IPTG 诱导 1.5 h 后原核表达结果。M 为蛋白分子量标准。

1 indicates DNase pET32a induced by no IPTG for 1.5 hours; 2, 3, 4 and 5 indicate DNase pET32a induced by IPTG for 0, 1.5, 3, 4.5 hours; 6 indicates pET32a control; 7 indicates pET32a control induced by IPTG for 1.5 hours M indicates protein marker

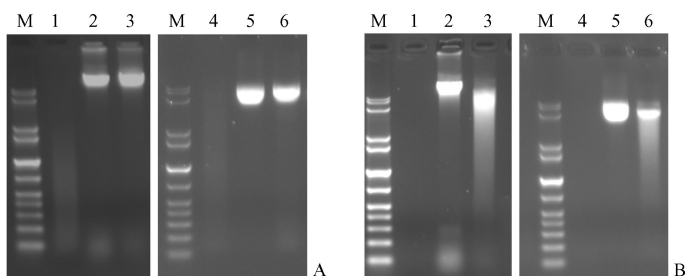


图 7 37 (A)和 60 (B)条件下 DNase 水解 DNA 的结果

Fig 7 DNA hydrolyzed by DNase at 37 (A) and 60 (B)

1. 有 Mg^{2+} 条件下水解基因组 DNA 结果; 2. 基因组 DNA 阴性对照; 3. 无 Mg^{2+} 条件下水解基因组 DNA 结果;
4. 有 Mg^{2+} 条件下水解单链 DNA 结果; 5. 单链 DNA 阴性对照; 6. 无 Mg^{2+} 条件下水解单链 DNA 结果;

M. 天根生化 1 kb plus DNA 分子量标准。

1. Genomic DNA with Mg^{2+} ; 2. Genomic DNA control; 3. Genomic DNA without Mg^{2+} ; 4. Single strand DNA with Mg^{2+} ;
5. Single strand DNA control; 6. Single strand DNA without Mg^{2+} ; M. Tiangen B iotech 1 kb plus DNA marker

纳滨对虾 DNase 与 DSN 氨基酸序列一致性为 66% (251/379), 而且酶切活性最适的温度均为 50~60, 可以看出两者之间有一定的相似性。所以我们从大肠杆菌表达有活性的凡纳滨对虾重组 DNase 蛋白有重要的现实意义。据调查, 凡纳滨对虾重组 DNase 蛋白是目前虾类重组 DNase 表达中惟一个有活性的表达产物, 这为进一步研究 DNase 蛋白结构、功能的进化提供了非常重要的保证。根据重组

DNase 蛋白的 N 末端带有的 6 ×His 标签, 通过 Ni-NTA 柱纯化获得了纯化的 DNase 重组蛋白, 比较去除 6 ×His 标签前后重组蛋白的活性, 比较凡纳滨对虾重组 DNase 蛋白与其他已经发现的 DNase 蛋白, 分析其空间结构、功能基团及与 DNA 的作用模式和相关激活或者抑制因子等, 进而将其开发成为一个生物工程研究的工具酶或者药物, 是今后研究的重点。

参 考 文 献

- [1] Mannherz H G, Peitsch M C, Zanotti S, et al A new function for an old enzyme: the role of DNase in apoptosis Curr Top Microbiol Immunol, 1995, 198: 161 - 174.
- [2] Oliveri M, Daga A, Lunardi C, et al DNase behaves as a transcription factor which modulates Fas expression in human cells Eur J Immunol, 2004, 34 (1): 273 - 279.
- [3] Napirei M, Wulf S, Mannherz H G Chromatin breakdown during necrosis by serum DNase I and the plasminogen system. Arthritis Rheum, 2004, 50 (6): 1873 - 1883.
- [4] Kawai Y, Yoshida M, Arakawa K, et al Diagnostic use of serum deoxyribonuclease I activity as a novel early-phase marker in acute myocardial infarction Circulation, 2004, 109 (20): 2398 - 2400.
- [5] Sallai K, Nagy E, Derfalvy B, et al Antinucleosome antibodies and decreased deoxyribonuclease activity in sera of patients with systemic lupus erythematosus Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12 (1): 56 - 59.
- [6] Moore S Pancreatic DNase The Enzymes, 1981, 14 (3): 281 - 296.
- [7] Muro-Pastor A M, Flores E, Herrero A, et al Identification, genetic analysis and characterization of a sugar-non-specific nuclease from the *Cyanobacterium Anabaena* sp. PCC 7120. Mol Microbiol, 1992, 6 (20): 3021 - 3030.
- [8] Nestle M, Roberts W K An extracellular nuclease from *Serratia marcescens* I Purification and some properties of the enzyme J Biol Chem, 1969, 244 (19): 5213 - 5218.
- [9] Fraser M J, Low R L Fungal and mitochondrial nucleases in nucleases New York: Cold Spring Harbor, 1993, 171 - 207.
- [10] Paudel H K, Liao T H Comparison of the three primary structures of deoxyribonuclease isolated from bovine, ovine, and porcine pancreas Derivation of the amino acid sequence of ovine DNase and revision of the previously published amino acid sequence of bovine DNase J Biol Chem, 1986, 261 (34): 16012 - 16017.
- [11] Shak S, Capon D J, Helmiss R, et al Recombinant human DNase reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. PNAS, 1990, 87 (23): 9188 - 9192.
- [12] Peitsch M C, Polzar B, Stephan H, et al Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). EMBO J, 1993, 12 (1): 371 - 377.
- [13] Hsiao Y M, Ho H C, Wang W Y, et al Purification and characterization of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) deoxyribonuclease I primary structure and cDNA sequence Eur J Biochem, 1997, 249 (3): 786 - 791.
- [14] 王艺磊, 张子平. 日本对虾精巢和卵巢全长 cDNA 文库的构建. 动物学杂志, 2003, 38 (2): 9 - 13.
- [15] Wang W Y, Liaw S H, Liao T H Cloning and characterization of a novel nuclease from shrimp hepatopancreas, and prediction of its active site Biochem J, 2000, 346 (3): 799 - 804.
- [16] Zhang Z, Wu R S, Mok H O, et al Isolation, characterization and expression analysis of a hypoxia-responsive glucose transporter gene from the grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* Eur J Biochem, 2003, 270 (14): 3010 - 3017.
- [17] Zhang Z P, Wang Y L, Jiang Y H, et al Ribosomal protein L24 is differentially expressed in ovary and testis of the marine shrimp *Marsupenaeus japonicus* Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2007, 147 (3): 466 - 474.
- [18] Anisimova V E, Rebrikov D V, Shagin D A, et al Isolation, characterization and molecular cloning of duplex-specific nuclease from the hepatopancreas of the Kamchatka crab BMC Biochem, 2008, 9: 14.
- [19] Friedhoff P, Kolmes B, Gimadutdinov O, et al Analysis of the mechanism of the *Serratia* nuclease using site-directed mutagenesis Nucleic Acids Res, 1996, 24 (14): 2632 - 2639.
- [20] Krause K L, Miller M D Using electrostatics to define the active site of *Serratia* endonuclease Methods Mol Biol, 2001, 160: 249 - 261.
- [21] Nene V, Wortman J R, Lawson D, et al Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector Science, 2007, 316 (5832): 1718 - 1723.
- [22] Chou M Y, Liao T H Shrimp hepatopancreatic deoxyribonuclease purification and characterization as well as comparison with bovine pancreatic deoxyribonuclease Biochim Biophys Acta, 1990, 1036 (2): 95 - 100.
- [23] Liao T H Deoxyribonuclease I and its clinical applications J Formos Med Assoc, 1997, 96 (7): 481 - 487.
- [24] Takeshita H, Mogi K, Yasuda T, et al Mammalian deoxyribonucleases I are classified into three types: pancreas, parotid, and pancreas-parotid (mixed), based on differences in their tissue concentrations Biochem Biophys Res Commun, 2000, 269 (2): 481 - 484.
- [25] Studier F W, Rosenberg A H, Dunn J J, et al Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes Methods Enzymol, 1990, 185: 60 - 89.

- [26] Nasr S Z, Strouse P J, Soskolne E, et al Efficacy of recombinant human deoxyribonuclease I in the hospital management of respiratory syncytial virus bronchiolitis Chest, 2001, 120 (1): 203 - 208.
- [27] Ratjen F, Paul K, van Koningsbruggen S, et al DNA concentrations in BAL fluid of cystic fibrosis patients with early lung disease: influence of treatment with dornase alpha Pediatr Pulmonol, 2005, 39 (1): 1 - 4.
- [28] Zhulidov P A, Bogdanova E A, Shcheglov A S, et al A method for the preparation of normalized cDNA libraries enriched with full-length sequences Biorg Khim, 2005, 31 (2): 186 - 194.
- [29] Shagin D A, Rebrikov D V, Kozhemyako V B, et al A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas Genome Res, 2002, 12 (12): 1935 - 1942.