

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.06.004

牛胰腺 *DNase I* 基因的合成、表达及功能验证^①

覃鸿妮¹, 谢钰珍¹, 薛高旭²,
梅 啸¹, 沈为琴², 蔡一林³

1. 苏州工业园区服务外包职业学院, 江苏 苏州 215123;

2. 金唯智生物科技有限公司, 江苏 苏州 215123; 3. 西南大学 玉米研究所, 重庆 400715

摘要: 从 NCBI 下载牛胰腺 *DNase I* 蛋白序列, 利用密码子优化软件(Codon Optimization)进行序列优化, 设计并合成 24 条首尾重叠的引物合成 786 bp 的 *DNase I* 基因, 构建重组载体 pET30a-*DNase I*, 转入 BL21(DE3), ArcticExpress(DE3), BL21(DE3)pLysS 3 种感受态中诱导表达后, 纯化目的蛋白并验证其活性. 结果表明: BL21(DE3), ArcticExpress(DE3)两种感受态菌落生长异常, 且未纯化到目的蛋白, BL21(DE3)pLysS 感受态菌落生长正常, 但未经诱导和葡萄糖诱导表达的菌液中也未纯化到目的蛋白, IPTG 诱导扩大培养的菌液中纯化到 0.15 mg/mL 的目的蛋白. 经验证, 酶原液能彻底消化 λ -DNA 和不同大小的质粒 DNA, 酶稀释液消化产物电泳检测显示条带拖尾弥散, 表明酶稀释液只能消化部分 λ -DNA.

关键词: *DNase I*; 基因合成; 基因表达; 基因功能验证

中图分类号: Q812

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)06-0024-08

1905 年人类首次在牛胰腺中发现 DNA 酶 I (*DNase I*), 其生理功能远不止消化水解 DNA^[1], 而且与细胞凋亡、细胞坏死、系统性红斑狼疮、胃肠道肿瘤和心肌梗死等的发生密切相关^[2-4]. *DNase I* 是一种酸性糖蛋白, 属二价金属离子(如 Ca^{2+} , Mg^{2+})依赖性核酸酶, 对酸性条件敏感, pH 值为 3.0 时, 酶活性完全丧失, G 肌动蛋白是 *DNase I* 的天然抑制剂, 抗凝剂 EDTA 可抑制酶活性^[5]. 在临床上, *DNase I* 是亲子鉴定及犯罪学鉴定的良好标志物, 血清 *DNase I* 活性增高可作为一种新的高敏感性的急性心肌缺血标志物, 酶表型分析可用于预测疾病的易感性^[1].

在研究性实验室中, *DNase I* 也有着广泛的应用, 如除去蛋白质和核酸样品中的 DNA, RT-PCR 前除去基因组 DNA, 转录反应后 DNA 模板的降解, 除去 RNA 样品中污染的基因组 DNA, 切口平移法进行放射性标记时在双链 DNA 上产生随机切口等^[6-7]. 直接从牛胰腺组织中分离提取 *DNase I* 因操作复杂, 耗时长, 在提取过程中活性容易丧失, 且其为动物源性产品, 不能完全去除 RNase, 不适合大规模制备. 1990 年, Worroll 等通过人工合成法合成该基因并在大肠杆菌中表达, 但由于当时基因合成及表达方法落后, 导致蛋白表达量少且纯化后的蛋白基本没有活性^[8]. 1997 年, Chen 等通过提取 RNA, 进而

① 收稿日期: 2017-01-09

基金项目: 重庆市重大项目(cstc2016shms-ztx80016); 苏州市高职高专院校教改项目(2017SZJG015).

作者简介: 覃鸿妮(1983-), 女, 博士, 讲师, 主要从事分子生物学的研究.

合成 cDNA 和 *DNase I* 基因, 并转入大肠杆菌中表达, 表达量也不高^[9]. 本研究从 NCBI 下载牛胰腺 *DNase I* 蛋白序列, 利用密码子优化软件进行序列优化, 设计并合成 24 条首尾重叠的引物合成 786 bp 的 *DNase I* 基因, 将合成的 *DNase I* 基因连接到表达载体 pET-30a 上, 转入 Top10 感受态中, 菌落 PCR 检测并测序显示载体构建成功后, 将 pET30a-*DNase I* 转入 BL21(DE3), ArcticExpress(DE3), BL21(DE3)pLysS 表达菌株中, 经 IPTG 诱导表达. 收集菌体采用亲和层析纯化 *DNase I* 目的蛋白, 通过切割 λ DNA 和质粒 DNA 验证其活性.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 目的基因

NCBI(National Center for Biotechnology Information)中下载 *DNase I* 蛋白序列(accession: AAB20621).

1.1.2 载体与大肠杆菌感受态

表达载体为 pET-30a, 大肠杆菌感受态 Top10, BL21(DE3)(Invitrogen), ArcticExpress(DE3)(Agilent), BL21(DE3)pLysS(Invitrogen).

1.2 试验方法

1.2.1 目的基因的合成

从 NCBI 中获取 *DNase I* 蛋白序列, 利用金唯智生物科技有限公司的密码子优化软件(Codon Optimization)进行密码子优化, 设计并合成多条首尾重叠的引物合成 *DNase I* 基因^[10-13]. 引物拼接 PCR 的两轮反应体系和程序见表 1.

表 1 PCR 体系和 PCR 程序

	PCR 体系		PCR 程序		
	试剂	体积/ μ L	步骤	温度/ $^{\circ}$ C	时间
第一轮 PCR	5 \times pfu Buffer	10	1. 预变性	95	3 min
	引物混液	10	2. 变性	95	15 s
	dNTP	1	3. 退火	58	15 s
	pfu 酶	0.5	4. 延伸	72	15 s
	ddH ₂ O	Up to 50	5. 循环(重复步骤 2-4)	—	25 次
			6. 最后延伸	72	1 min
第二轮 PCR	5 \times pfu Buffer	20	1. 预变性	95	3 min
	第一轮 PCR 产物	2	2. 变性	95	15 s
	第一条和最后一条引物	各 1	3. 退火	58	15 s
	dNTP	1	4. 延伸	72	30 s
	pfu 酶	1	5. 循环(重复步骤 2-4)	—	25 次
	ddH ₂ O	Up to 100	6. 最后延伸	72	3 min

1.2.2 重组载体的构建及转化

将载体 pET-30a 用 NdeI 和 KpnI 双酶切, 使用 NEB 公司的 Gibson Assembly[®] Master Mix 试剂盒(Cat: E2611L)将酶切后的表达载体 pET-30a 与 *DNase I* 基因进行连接构建重组载体 pET30a-*DNase I*, 连接产物转化至 Top10 感受态中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养.

1.2.3 重组子鉴定

挑取 10 个单克隆 37 °C 扩大培养, 利用菌落 PCR 扩增目的基因, 电泳检测到目的条带的克隆随机挑选 4 个进行目的基因测序.

1.2.4 基因表达

将测序正确的重组质粒转化 BL21(DE3), ArcticExpress(DE3), BL21(DE3)pLysS 3 种感受态(培养基中加入 Kana 抗性), 每种感受态涂布两个平板, 37 °C 过夜培养.

1.2.5 DNase I 的纯化

转入 BL21(DE3), ArcticExpress(DE3)感受态的菌落分别用 IPTG 和葡萄糖诱导, 37 °C 扩大培养, 收集菌体, 于 -20 °C 冰冻 1 h 后用 100 mL A 相溶解, 并超声破碎, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清使用带 His 标签的亲和层析柱进行纯化^[14], 纯化使用 GE 公司的 AKTA avant 设备, 纯化的蛋白使用 723 可见光分光光度计测定蛋白浓度.

转入 BL21(DE3)pLysS 感受态的菌落随机挑取 6 个单克隆, 加入液体培养基, 其中 3 管转接到 600 mL LB 培养基中扩大培养并 IPTG 15 °C 过夜诱导, 进行亲和纯化. 其他 3 管中 1 管直接加 IPTG 37 °C 诱导 3 h, 1 管不诱导, 1 管加葡萄糖. 采用 SDS-PAGE 验证 DNase I 的分子量大小^[15].

1.2.6 验证 DNase I 的酶活性

将 DNase I 酶原液和 5, 10, 20 倍酶稀释液分别消化 48.5 kb 的 λ -DNA, 及 1.5 kb, 2 kb, 3 kb, 5 kb 的质粒, 琼脂糖凝胶电泳检测消化结果.

2 结果与分析

2.1 DNase I 基因合成

2.1.1 基因序列的优化

采用密码子优化软件优化的序列如下:

```
ATGCTGAAAATCGCAGCCTTTAACATCCGCACCTTTGGCGAGACCAAAATGAGCAACGCCA  
CCCTGGCCAGCTATATTGTGCGCATCGTTCGCCGCTACGATATTGTGCTGATTCAAGAAGTTTCG  
CGATAGCCATCTGGTGGCAGTTGGCAAGCTGCTGGATTACCTGAATCAGGACGACCCGAACACC  
TACCATTATGTGGTGAGCGAACCGCTGGGCCGCAACAGCTACAAGGAGCGCTATCTGTTCCTGT  
TTCGCCC GAACAAGGTGAGCGTTCTGGATACCTACCAGTACGATGATGGCTGCGAGAGCTGCGG  
CAACGACAGCTTTAGCCGCGAACCGGCAGTGGTTAAGTTCAGCAGCCATAGCACCAAGGTGAAG  
GAGTTTGCCATTGTGGCCCTGCATAGTGCACCGAGCGATGCCGTTGCCGAGATCAATAGCTTAT  
ATGATGTGTACCTGGATGTGCAGCAGAAGTGGCACCTGAACGACGTGATGCTGATGGGTGACT  
TTAATGCCGACTGCAGCTACGTGACCAGTAGCCAGTGGAGCAGCATTCGCCTGCGTACCAGCAG  
CACCTTTCAGTGGCTGATTCCGGACAGCGCAGACACCACCGCAACCAGCACCAATTGCGCATA  
GACCGTATCGTTGTGGCAGGTAGCCTGCTGCAGAGCAGTGTGGTGGCCGGTAGTGCCGCACCGT  
TTGATTTTCAGGCCGCATACGGTCTGAGCAATGAAATGGCCCTGGCCATCAGCGATCACTATCC  
TGTGGAGGTTACCCTGACCTAA.
```

2.1.2 引物的设计

根据基因序列设计了 24 条引物, 序列如表 2, 合成所有引物用于 DNase I 基因的合成.

2.1.3 基因的合成与检测

利用引物拼接 PCR 技术合成优化后的 DNase I 基因序列, 电泳检测可见: 样品 1-4 条带大小均在 750 bp~1 000 bp 之间(图 1), 与理论值 786 bp 相符, 初步判断目的基因合成正确.

表 2 引物序列

引物名字	序 列	长度/bp
DNase I -1	TTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAATGCTGAAAATCGCAGCCTTTAAC	52
DNase I -2	TGCTCATTTTGGTCTCGCCAAAGGTGCGGATGTTAAAGGCTGCGATTTTCAG	52
DNase I -3	GCGAGACCAAAAATGAGCAACGCCACCCTGGCCAGCTATATTGTGCGCATCGTT	53
DNase I -4	CTTCTGAATCAGCACAATATCGTAGCGGCGAACGATGCGCACAATATAGC	51
DNase I -5	CGATATTGTGCTGATTCAAGAAGTTCGCGATAGCCATCTGGTGGCAGTTGGCA	53
DNase I -6	GTGTTGCGGTTCGTCCTGATTTCAGGTAATCCAGCAGCTTGCCAACTGCCACCAG	53
DNase I -7	CAGGACGACCCGAACACCTACCATTATGTGGTGAGCGAACCGCTGGGCCGCAACA	55
DNase I -8	GTTGCGGCGAAACAGGAACAGATAGCGCTCCTTGTAGCTGTTGCGGCCAGC	52
DNase I -9	CCTGTTTCGCCC GAACAAGGTGAGCGTTCTGGATACCTACCAGTACGATGATGGC	55
DNase I -10	GCGGCTAAAGCTGTCGTTGCCGAGCTCTCGCAGCCATCATCGTACTGGTAGGT	54
DNase I -11	AACGACAGCTTTAGCCGCGAACCGGCAGTGGTTAAGTTCAGCAGCCATAGCA	52
DNase I -12	GGGCCACAATGGCAAACCTTCACCTTGGTGCTATGGCTGCTGAACTTAA	51
DNase I -13	TTGCCATTGTGGCCCTGCATAGTGCACCGAGCGATGCCGTGCCGAGATCAATAG	55
DNase I -14	TCTGCTGCACATCCAGGTACACATCATATAAGCTATTGATCTCGGCAACGG	51
DNase I -15	ACCTGGATGTGCAGCAGAAGTGGCACCTGAACGACGTGATGCTGATGGGTGACTT	55
DNase I -16	CTACTGGTCACGTAGCTGCAGTCGGCATTAAAGTCACCCATCAGCATCAC	50
DNase I -17	CTGCAGCTACGTGACCAGTAGCCAGTGGAGCAGCATTTCGCTGCGTACCAGC	52
DNase I -18	GTGTCTGCGCTGTCCGGAATCAGCCACTGAAAGGTGCTGCTGGTACGCAGGCG	53
DNase I -19	CGGACAGCGCAGACACCACCGCAACCAGCACCAATTGCGCATAACGACCGTATCG	54
DNase I -20	GGCACCACACTGCTCTGCAGCAGGCTACCTGCCACAACGATACGGTTCGTATGCGC	55
DNase I -21	CAGAGCAGTGTGGTGCCGGGTAGTGCCGCACCGTTTGATTTTCAGGCCGCATACG	55
DNase I -22	TGATCGCTGATGGCCAGGGCCATTTTCATTGCTCAGACCGTATGCGGCCTGAAAAT	55
DNase I -23	TGGCCATCAGCGATCACTATCCTGTGGAGGTTACCCTGACCCACCATCATCATCA	55
DNase I -24	TATCAGCCATGGCCTTGTGCTCGTTCGTTAATGATGATGATGATGGTGGGTGTCAG	55

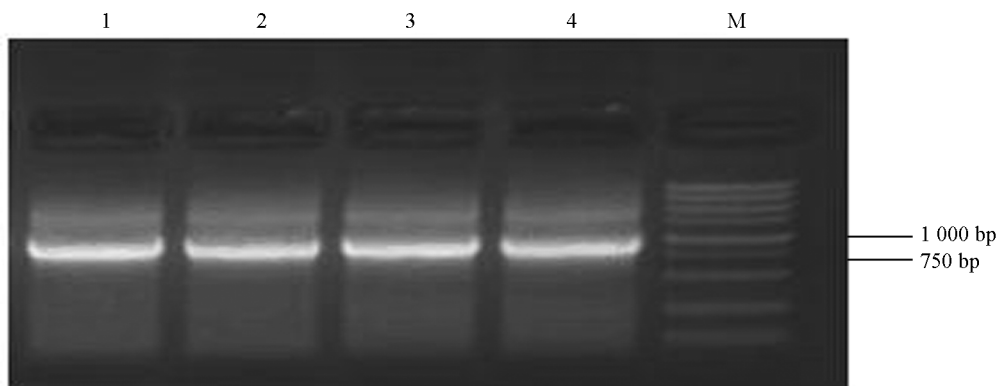


图 1 基因合成 PCR 产物电泳图

2.2 重组载体的构建及检测

重组载体转入 Top10 感受态, 37 °C 过夜培养后, 由菌落 PCR 电泳图可见, 挑取的 10 个单克隆 1—9 号均在 750~1 000 bp 的位置处出现特异的亮带, 为阳性克隆(图 2). 在这 9 个阳性克隆中随机选取的 4 个克隆测序, 结果与目的基因序列一致.

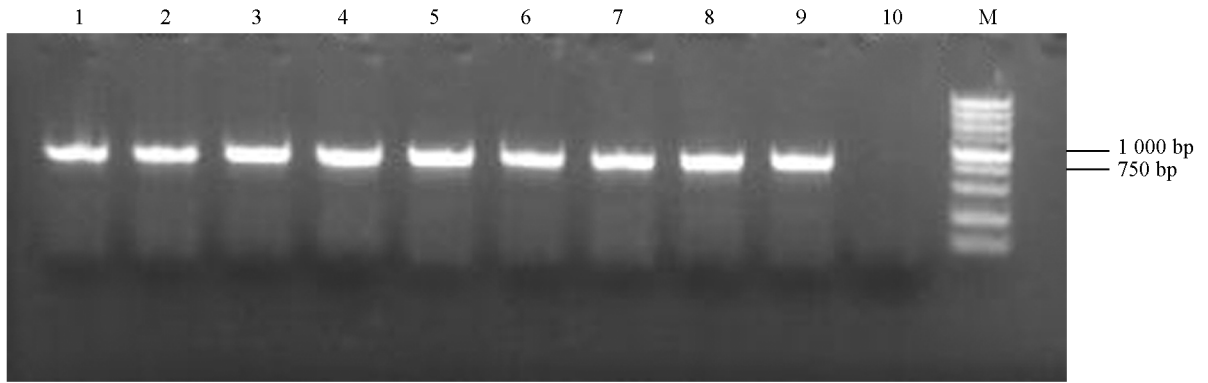


图 2 重组载体菌落 PCR 产物电泳图

2.3 基因表达

2.3.1 菌落生长情况

- 1) BL21(DE3)感受态: 两个平板只有 1 个菌落光滑圆润, 其他菌落形态异常, 质地不均匀.
- 2) ArcticExpress(DE3)感受态: 两个平板菌落形态异常, 质地不均匀.
- 3) BL21(DE3)pLysS 感受态: 两个平板菌落质地均匀圆润, 生长一致.

2.3.2 纯化蛋白浓度检测

1) BL21(DE3)感受态: 挑取菌落形态正常的 1 个菌落和异常的 2 个菌落进行菌落 PCR 检测(图 3), 1 号泳道为正常菌落, 未检测到目的条带, 2, 3 号泳道为异常菌落, 反而可以检测到特异目的条带. 将有目的条带的菌落经 IPTG 诱导 37 °C 扩大培养, 未纯化到目的蛋白.

2) ArcticExpress(DE3)感受态: 挑取菌落形态异常的两个菌落进行培养, 菌落无法生长.

3) BL21(DE3)pLysS 感受态: IPTG 诱导扩大培养的 3 个菌落经亲和纯化, 总共纯化到 7 mL 目的产物. 直接加 IPTG 37 °C 诱导 3 h, 不诱导和加葡萄糖诱导的 3 个菌落均未纯化到目的蛋白.

2.3.3 考马斯亮蓝法测蛋白质的质量浓度

配置 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL 的 BSA 溶液, 使用 723 可见光分光光度计测得吸光度 OD_{595} , 分别为 0.14, 0.293, 0.424, 0.569, 0.702, 作出标准曲线(图 4), 纯化的 DNase I 吸光度为 0.22, 带入公式计算浓度为 0.15 mg/mL.

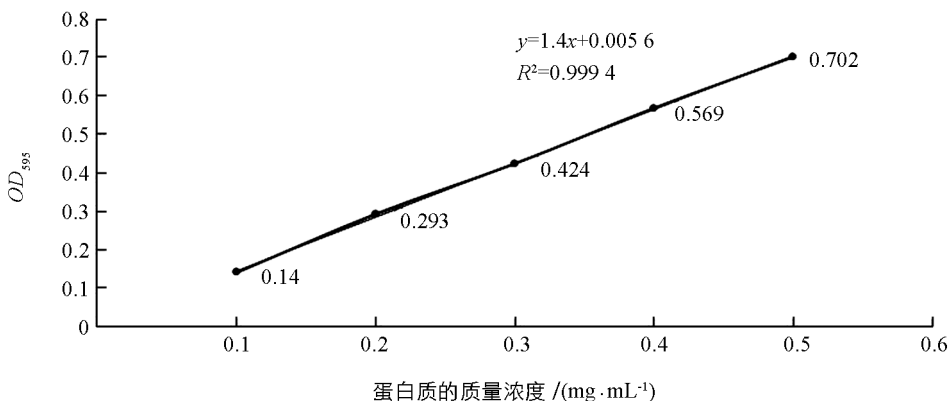


图 4 蛋白质检测标准曲线

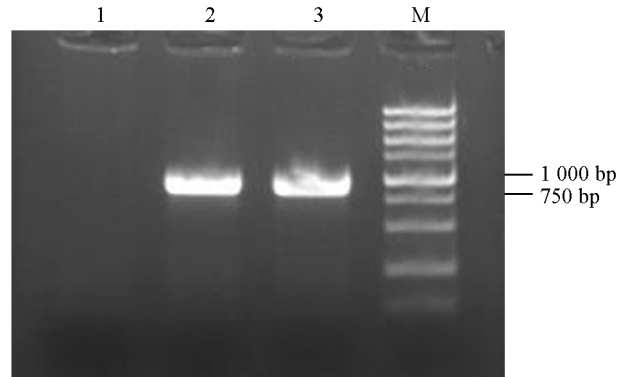


图 3 BL21(DE3)感受态菌落 PCR 产物电泳图

2.3.4 纯化蛋白的分子量检测

1—3 分别为 BL21(DE3) pLysS 感受态直接加 IPTG 37 °C 诱导 3 h, 不诱导和加葡萄糖诱导的蛋白纯化后的条带, 4 为 IPTG 诱导扩大培养的 3 个菌落经 AKTA 纯化后的总产物条带(图 5), 可见 4 号条带对应分子量约为 30 kD, 与目的蛋白 31 kD 大小一致^[16], 其他 1—3 号未得到目的蛋白。

2.4 基因功能验证

2.4.1 消化质粒 DNA

如图 6, 1—12 号为不同片段大小的质粒(质粒大小依次为 1.5 kb, 2 kb, 3 kb, 3 kb, 2 kb, 5 kb), 其中奇数号泳道为不加 DNase I 处理的质粒对照, 偶数号泳道为 DNase I 消化后的质粒, 酶使用量是 1 μ L, 质粒 DNA 使用量是 5 μ g. 电泳结果表明 DNase I 能够将质粒消化完全。

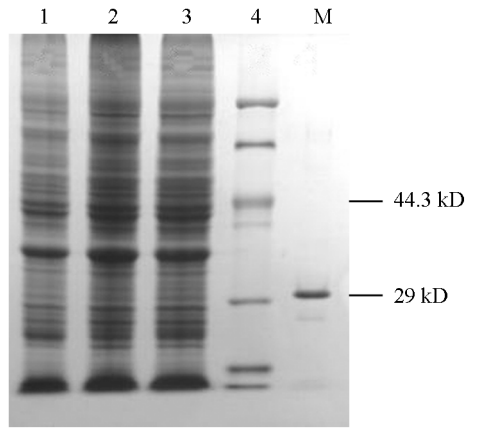


图 5 DNase I SDS-PAGE 检测图

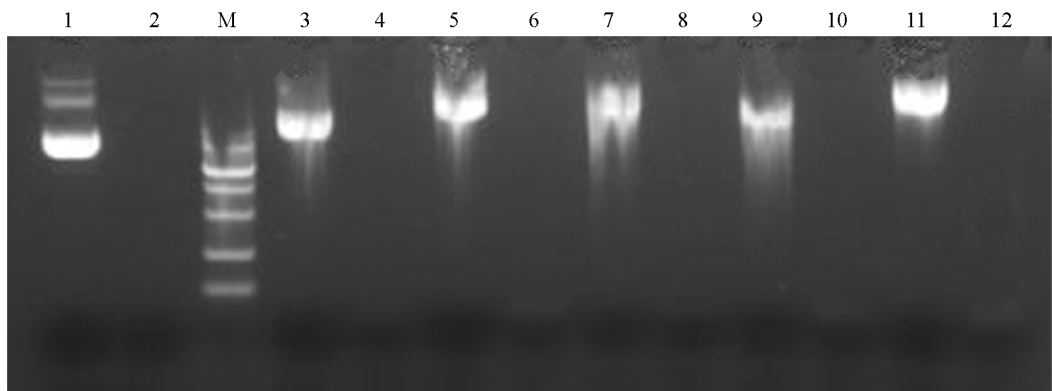


图 6 DNase I 消化质粒电泳检测图

2.4.2 消化 λ -DNA

如图 7, 1 为不加 DNase I 的对照, 2—5 分别为 DNase I 酶原液和 5, 10, 20 倍酶稀释液, 酶使用量是 1 μ L, λ -DNA 使用量是 1 μ g. 电泳检测显示: 稀释后的酶液对 λ -DNA 消化不完全, 消化后呈弥散状, 稀释倍数越高, 消化越不完全. 酶原液可完全消化 λ -DNA。

3 结论与讨论

3.1 结论

利用引物拼接 PCR 技术合成牛 DNase I 基因, 构建重组载体 pET30a-DNase I, 转入 BL21(DE3), ArcticExpress (DE3), BL21(DE3) pLysS 3 种感受态中诱导表达, 其中 BL21(DE3), ArcticExpress(DE3) 两种感受态菌落生长异常且未纯化到目的蛋白, BL21(DE3) pLysS 感受态菌落生长正常, 但未经诱导和葡萄糖诱导表达的菌液中也未纯化到目的蛋白, IPTG 诱导扩大培养的菌液中纯化到 0.15 mg/mL 的目的蛋白, 经验证, 酶原液能彻底消化 λ -DNA 和不同大小的质粒 DNA, 酶稀释液消化产物电泳检测显示条带拖尾弥散, 表明酶稀释液只能消化部分 λ -DNA。

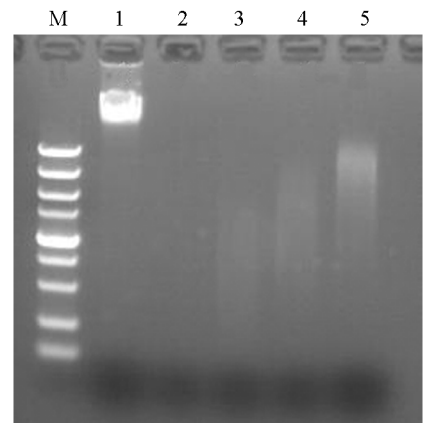


图 7 DNase I 消化 λ -DNA 电泳检测图

3.2 讨论

BL21(DE3)菌株是实验室应用最为广泛的表达菌株^[17-19], 很多外源基因都能够在该菌株中大量表达, 但是由于该菌株有较高的本底表达, 所以适合用来表达对宿主没有毒性的外源基因; ArcticExpress(DE3)菌株由于表达在低温(4~12 °C)具有较高活性的 Cpn10 和 Cpn60 分子伴侣, 这些分子伴侣能够在低温诱导的条件下最大限度地帮助未折叠或部分折叠的外源蛋白进行正确的折叠, 降低包涵体的表达量, 提高可溶性蛋白的含量, 因此非常适合低温诱导可溶性表达外源基因^[20]; BL21(DE3)PLysS 菌株因为表达 T7 溶菌酶极大地降低了外源基因的本底表达, 因此非常适合用于表达对宿主有毒性的外源基因^[21-22].

本研究中的 DNase I 由于对宿主有很大的毒性^[7], 因此在 BL21(DE3)以及 ArcticExpress(DE3)菌株中表达失败, 但是在 BL21(DE3)PLysS 菌株中成功表达, 纯化的 DNase I 具有很好的酶活性, 能彻底消化 λ -DNA 和不同大小的质粒 DNA, 为实验室制备 DNase I 提供了可行的方法。

2 400 mL 的 LB 培养基最终纯化得到 1 mg(0.15 mg/mL)的 DNase I, 考虑到 DNase I 对宿主有很大的毒性, 这样的表达量不算太低. 相对于 BL21(DE3)PLysS 菌株, Invitrogen 公司的 BL21(DE3)PLysE 菌株由于能够表达更高的 T7 溶菌酶^[23], 能够更大程度地抑制外源基因的本底表达, 因此使用该菌株有可能进一步提高 DNase I 表达量。

参考文献:

- [1] 倪玉华, 张建军, 孙宝贵. DNA 酶 I 的研究进展 [J]. 国际病理科学与临床, 2006, 26(6): 531-535.
- [2] MANNHERZ H G, PEITSCH M C, ZANOTTI S, et al. A New Function for an Old Enzyme: The Role of DNase I in Apoptosis [M]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1995, 198: 161-174.
- [3] OLIVERI M, DAGA A, LUNARDI C, et al. DNase I Behaves as a Transcription Factor Which Modulates Fas Expression in Human Cells [J]. *European Journal of Immunology*, 2004, 34(1): 273-279.
- [4] NAPIREI M, WULF S, MANNHERZ H G. Chromatin Breakdown During Necrosis by Serum Dnase1 and the Plasminogen System [J]. *Arthritis & Rheumatology*, 2004, 50(6): 1873-1883.
- [5] BARANOVSKII A G, BUNEVA V N, NEVINSKY G A. Human Deoxyribonucleases [J]. *Biochemistry Mosc*, 2004, 69(6): 587-601.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [7] 张 杏. 牛胰腺脱氧核糖核酸酶 I 在毕赤酵母中的表达及其酶学性质的研究 [D]. 武汉: 湖北大学, 2012.
- [8] WORRALL A F, CONNOLLY B A. The Chemical Synthesis of a Gene Coding for Bovine Pancreatic DNase I and Its Cloning and Expression in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 265(35): 21889-21895.
- [9] CHEN C Y, LU S C, LIAO T H. Cloning, Sequencing and Expression of a cDNA Encoding Bovine Pancreatic Deoxyribonuclease I in *Escherichia coli*: Purification and Characterization of the Recombinant Enzyme [J]. *Gene*, 1998, 206(2): 181-184.
- [10] 赵 鹏, 王 霞, 李炳志, 等. 合成生物学中的 DNA 组装技术 [J]. *生命科学*, 2013, 25(10): 983-991.
- [11] XIONG AS1, YAO Q H, PENG R H, et al. PCR-Base Accurate Synthesis of Long DNA Sequences [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(2): 791-797.
- [12] HECKMAN K L, PEASE L R. Gene Splicing and Mutagenesis by PCR-Driven Overlap Extension [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 924-932.
- [13] 柴 冉, 孙 强, 邱立友. 降落-重叠 PCR 法四重融合构建平菇同源重组片段 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28(4): 375-379.
- [14] 丁红雷, 潘 竞, 张卫军, 等. 幽门螺杆菌 cagT 蛋白的表达、纯化及免疫原性研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2010, 32(4): 46-50.
- [15] 黄兰香, 李建新, 周 林, 等. 鸡胚液中蛋白质动态电泳分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2005, 27(6): 885-887.
- [16] SALNIKOW J, LIAO T H, MOORE S, et al. Bovine Pancreatic Deoxyribonuclease A. Isolation, Composition, and Amino Acid Sequences of the Tryptic and Chymotryptic Peptides [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1973, 248(4):

1480—1488.

- [17] 孙晶晶, 刘亚娟, 秦 琴, 等. 蜡梅 α -半乳糖苷酶基因的克隆和表达分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(1): 25—32.
- [18] 杨 震, 杨 可, 侯曼美, 等. 人组织型纤溶酶原激活剂原核表达载体的构建及在大肠杆菌中的初步表达 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2012, 34(4): 77—83.
- [19] 董战旗, 张 军, 胡 楠, 等. 家蚕核型多角体病毒 IE1 的多克隆抗体制备及鉴定 [J]. 西南大学学报自然科学版, 2014, 36(10): 76—81.
- [20] ZHOU B Y, ZHOU L, LIU M C, et al. Expression and Purification of a Fusion Gene TSO45W-4B-TSOL18 of *Taenia Solium* in *Escherichia coli* Arctic Express (DE3) and Preparation of Rabbit antiserum [J]. Chinese Journal of Endemiology, 2013, 32(6): 619—624.
- [21] GAO C E, HONG M, LIU W Q, et al. Construction of a Prokaryotic Expression Vector for Breast Cancer Transductive Peptide and Expression in *E. coli* BL21(DE3) pLysS [J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2010, 5(3): 177—180.
- [22] HAO D C, ZHU P H, YANG S L, et al. Medium Optimization for the Production of Human Cytochrome P450C9 by *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS Using Plackett Burman Design and Gray Relational Analysis [J]. Drug Metabolism Reviews, 2006, 38(57): 101—102.
- [23] KOSTYUKOVA A S, HITCHCOCK-DEGREGORI S E. Effect of the Structure of the N Terminus of Tropomyosin on Tropomodulin Function [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(7): 5066—5071.

Synthesis, Expression and Function Identification of Bovine Pancreatic Gene *DNase I*

QIN Hong-ni¹, XIE Yu-zhen¹, XUE Gao-xu²,
MEI Xiao¹, SHEN Wei-qin², CAI Yi-lin³

1. Suzhou Industrial Park Institute of Services Outsourcing, Suzhou Jiangsu 215123, China;

2. Genewiz Biological Technology CO., LTD, Suzhou Jiangsu 215123, China;

3. Maize Reserch Institute, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Deoxyribonulease I (DNase I) sequence from bovine pancreas, 786 bp in size, acquired from NCBI and optimized by Codon Optimization, was synthesized, using SOE PCR (gene splicing by overlap extension PCR) with 24 overlapped primers. The recombinant expression vector pET30a-DNase I was successfully constituted, and was transformed into the competent cells of *E. coli*, BL21 (DE3), ArcticExpress(DE3) and BL21(DE3) pLysS. Then, DNase I was purified and its activity was detected. The results showed that the colonies in BL21(DE3) and ArcticExpress(DE3) did not grow properly and no target protein was gained. The colony in BL21(DE3) pLysS induced by glucose or without induction grew normally, but no purified target protein was obtained. In amplification culture of BL21(DE3) pLysS induced by IPTG, 0.15 mg/mL DNase I was purified. DNase I activity detection indicated that the raw liquid of the enzyme could completely dissolve λ -DNA and plasmid DNA of various sizes, while its diluted liquid partially dissolved λ -DNA only.

Key words: *DNase I*; gene synthesis; gene expression; gene function identification

