

Split 内含肽高效介导转录激活因子的胞内融合

高元吉^①, 赵传科^①, 尹琪^①, 王慧^①, 曾新^①, 王少鹏^①, 于文文^②, 栗世铀^{①*}

① 中国科学院北京基因组研究所新药研发组, 北京 100029;

② 中国科学院植物研究所, 北京 100093;

* 联系人, E-mail: lishiyu@genomics.org.cn

收稿日期: 2008-03-06; 接受日期: 2008-06-16

摘要 Split 内含肽可以通过反式剪接作用介导两个蛋白片段的共价连接. 基于这一原理, 利用来自于 *Synechocystis* sp. strain PCC6803 的天然 split 内含肽 DnaEs 作为蛋白剪接元件, 通过其反式剪接作用介导了四环素阻遏蛋白(TetR)与 1-型单纯疱疹病毒(HSV)的转录活化域(VP16)的共价连接, 形成融合蛋白 TV. 应用 RT-PCR 技术以及荧光显微镜成像技术分别在 mRNA 转录水平与蛋白表达水平上研究了 DnaEs 的剪接活性, 结果证明在细胞内 DnaEs 可以介导融合蛋白 TV 的产生. 同时也对融合蛋白 TV 的转录活性进行了研究, 并将其与通过重组 DNA 表达得到的同种蛋白的转录活性进行了比较, 发现 DnaEs 介导的融合蛋白与基因重组得到的同种蛋白转录活性相似. 此外, 还研究了四环素类似物 Dox 对 TV 转录活性的调控, 结果表明 Dox 可以明显抑制其转录活性. DnaEs 介导转录激活因子融合, 并启动下游报告基因表达的实验方法, 为深入开展 DnaEs 的应用研究提供了重要实验依据.

关键词

DnaEs

蛋白剪接

四环素阻遏蛋白

1-型单纯疱疹病毒

转录活化域

转录激活因子

内含肽是宿主蛋白中插入的蛋白元件, 它可以自我催化在宿主蛋白中产生断裂使内含肽两侧的外显肽连接成成熟的蛋白质^[1]. 内含肽介导的这一自我催化过程称为蛋白质剪接. 典型的内含肽包含 4 个保守的基序, 依次为基序A、基序B、基序F和基序G, 另外在基序B和基序F之间还嵌有归巢核酸内切酶序列^[1,2]. 核酸内切酶序列的功能与内含肽基因在基因组内的移动有关, 所以该序列的删除对蛋白剪接没有任何影响^[3]. Mini内含肽正是这样一类没有核酸内切酶序列的内含肽. Mini 内含肽还可以在基序B与基序F之间人为的断开, 成为split内含肽, 得到两个非活性split内含肽片段, 当这两个片段发生二聚化重折叠后split内含肽才可恢复其蛋白剪接活性.

split内含肽片段间存在一定的内在亲和力, 它可以自发地引导两片段发生二聚化与重折叠, 从而恢

复split内含肽剪接活性. 因此亲和力的大小与其活性密切相关^[4-6], 一般认为具有高亲和力的split内含肽通常具有高剪接活性^[7,8]. 另外split内含肽的活性大小还与片段在细胞内的溶解性有关^[9]. DnaEs是存在于*Synechocystis* sp. strain PCC6803 中的天然split 内含肽, 分别由两个独立的基因 *ndnaE* 与 *cdnaE* 编码. 其产物nDnaE由 123 个氨基酸组成, 而产物cDnaE由 36 个氨基酸组成. 这是第一个也是目前唯一得以鉴定的天然split内含肽. 在细胞内它具有极高的内在亲和力与细胞溶解性, 因而具有高效的剪接活性^[6,10,11].

split内含肽介导的蛋白互补技术(intein mediated protein complementation) 是利用split内含肽的反式剪接功能, 将分别表达的两个蛋白片段融合恢复蛋白活性. 现在已被引入到哺乳动物细胞的各种应用中^[6,12-18]. 最近的报道证实DnaEs介导DNA结合域与转

录激活域的共价融合产生的融合蛋白具有位点特异性的转录激活作用, 并且由于转录放大作用增强了检测中信号的强度^[19].

本文利用 DnaEs 介导四环素阻遏蛋白(TetR)与 1-型单纯疱疹病毒转录活化域(VP16)两个蛋白片段在胞质内的融合, 得到的融合蛋白能特异地识别四环素反应元件(TRE)并激活下游报告基因的表达. 由于采用了四环素(Tc)或其类似物(Dox)可调控的 TetR 作为 DNA 结合结构域, 因此产生的融合蛋白不仅能提高系统检测信号的强度, 而且还可以利用 Dox 对其转录活性进行调控, 为 DnaEs 深入的应用研究提供了实验依据.

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pKEB1 与 pMEB4 由 New England Biolabs (NEB) 的 Ming-Qun Xu 博士所赠. pEGFP-N1 和 pTRE2hyg 购自 ClonTech. TREx-293 细胞系以及 pcDNA3.1(+)购自 Invitrogen. 质粒 pGL3-Basic 来自

Promega. 1-型单纯疱疹病毒(HSV)基因组来自于本实验室收藏. pfu DNA 聚合酶购自天根生化科技有限公司, 中国. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)购自 Gibco, Invitrogen, Carlsbad CA. 胎牛血清(FBS)购自 Hyclone, 美国. 青霉素、链霉素来自 Sigma, 美国. TRIzol 试剂以及 Moloney Murine Leukemia Virus 逆转录酶 (M-MLV RT)是 Invitrogen, CA 的产品.

1.2 基因融合以及载体的构建

实验选用 *Escherichia Coli* DH5 α 作为质粒构建的宿主菌. 用含有巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)强启动子的 pcDNA3.1(+) 作为蛋白在哺乳动物细胞中的表达载体. 质粒的构建如图 1 所示. nDnaE 和 cDnaE 分别扩增自质粒 pMEB4 和 pKEB1^[20]. TetR 从 TREx-293 细胞系基因组中扩增得到. VP16 扩增自本实验室的 1-型单纯疱疹病毒基因组. 所有扩增引物序列见表 1. TetR 与 nDnaE 的融合方法如下, 20 μ L PCR 反应体系中加入: 模板 TetR 与 nDnaE 各 50 μ g, dNTP

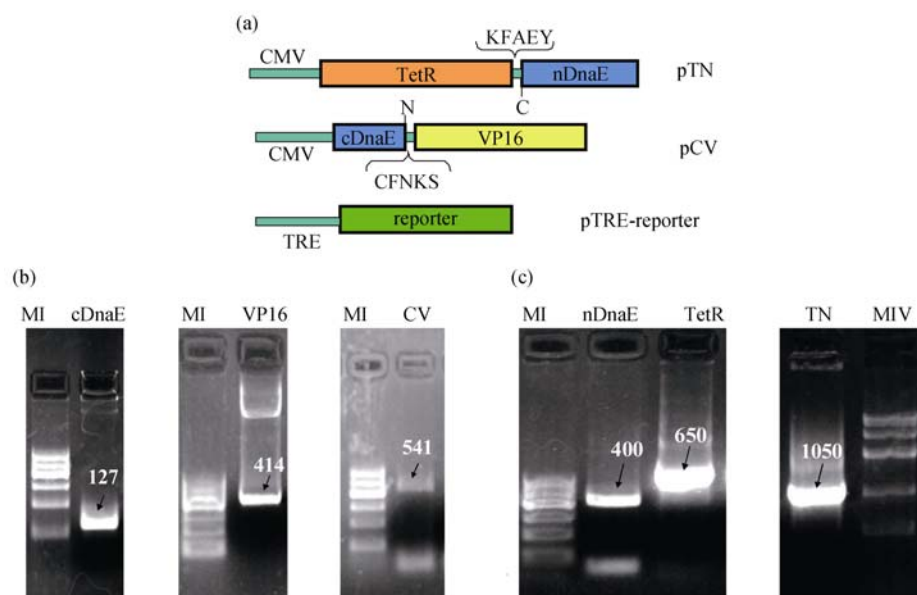


图 1 表达质粒构建结果

(a) 质粒构建示意图. 序列 KFAEY 和 CFNKS 是与内含肽 N、C 端紧密相连的外显肽部分, 作为剪接位点它们可确保 DnaEs 的高效剪接; (b) overlap PCR 方法融合 cDnaE 与 VP16 基因的结果. cDnaE 基因片段(36 个氨基酸)108 bp N 端带有 kozak 序列及 *Hind*III 酶切位点共 127 bp, VP16(127 个氨基酸)以及 N 端剪接位点 CFNKS, 另加 C 端的 *Xho*I 剪接位点共 414 bp, 它们分别扩增自质粒 pKEB1 与 HSV 基因组; (c) overlap PCR 方法融合 TetR 与 nDnaE 基因的结果, TetR (207 个氨基酸)621 bp 外加 N 端 kozak 序列及 *Nhe*I 酶切位点共 650 bp. KFAEY-nDnaE(共 128 个氨基酸)384 bp 外加 C 端 *Hind*III 酶切位点共 400 bp. TetR 扩增自 TREx-293 细胞基因组. nDnaE 扩增自质粒 pMEB4. MI: DNA marker, 自上而下依次为 600, 500, 400, 300, 200 和 100 bp; MIV: DNA marker, 自上而下依次为: 7000, 5500, 3500, 2000, 1000 和 500 bp

表 1 实验中所用到的引物序列

引物	序列
nDnaE.5	5'-TCCAAGTTTGC GGAATATTGCCTCAGTT-3'
nDnaE.3	5'-CCCAAGCTTATTTAATTGTCCCAGCG-3'
cDnaE.5	5'-CCCAAGCTTACCATGGTTAAAGTTATCGGTCTCGTCG-3'
cDnaE.3	5'-ACGCGGATTGTGTTAAACAATTGGCGGCGATCGCC-3'
TetRforward	5'-CTAGCTAGCACCATGTCTAGATTAGATAAAAAGTAAAG-3'
TetReverse	5'-CAATATTCGCAAACCTTGGACCCACTTTC-3'
Vp16forward	5'-GTTTAAACAAATCCGCGTACAGCCGC-3'
Vp16reverse	5'-CCGCTCGAGCTACCCACCGTACTCGTC-3'
ACTIN.5	5'-GCTCCGCGCATGTGCAA-3'
ACTIN.3	5'-AGGATCTTCATGAGGTAGT-3'
EGFP.5	5'-TCATGGCCGACAAGCAGAAGAACG-3'
EGFP.3	5'-CGGCGGCGGTCACGAAGTC-3'

混合物(0.2 mmol/L)1 μ L, 2.5 U pfu 聚合酶(天根生化科技有限公司) 0.5 μ L, 10 $\times$ pfu 缓冲液 2 μ L. 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 49 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 反应 10 个循环, 然后加入 5 pmol/L 引物 TetRforward 与 nDnaE.3 混合物 1 μ L, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 反应 35 个循环. cDnaE 与 VP16 片段的融合方法类似, 20 μ L PCR 反应体系中加入: 模板 cDnaE 与 vp16 各 50 μ g, dNTP 混合物(0.2 mmol/L)1 μ L, 2.5 U pfu 聚合酶(天根生化科技有限公司) 0.5 μ L, 10 $\times$ pfu 缓冲液 2 μ L. 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 49 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 反应 10 个循环, 然后加入 5 pmol/L 引物 cDnaE.5 与 Vp16reverse 的混合物 1 μ L, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 反应 35 个循环. 利用 PCR 产物回收试剂盒(天根生化科技有限公司)回收融合产物, 然后通过酶切连接将得到的 TN, CV 片段分别插入到质粒 pcDNA3.1hygro (+) 中(图 1). 实验中构建的所有质粒都经测序验证.

1.3 RNA 的提取及逆转录

以含有 10% FBS 的 DMEM 为培养基, 将人胚胎肾细胞(HEK293 细胞)以每孔 6×10^5 细胞培养到六孔板内. 过夜待细胞铺满度为 90%后, 应用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)转染试剂进行转染实验, 转染质粒为 pTN(表达 TetR-nDnaE 融合片段), pCV(表达 cDnaE-VP16 融合片段), pTRE-E(报告基因 EGFP 的表达质粒). A 孔中转入 pCV, pTN 与 pTRE 各 1 μ g, 在 B 孔中转入 pCV 与 pTRE 各 1 μ g, C 孔中转入 pTN 与 pTRE 各 1

μ g. 24 h 后, TRIzol 试剂(Invitrogen)裂解细胞, 按说明书标准操作从细胞中提取总 RNA, 经 RNase Free 的 DNase 消化可能存在的痕量 DNA 后, 取 A, B, C 号孔提取的总 RNA 各 2 μ g 用 Oligo (dT)₁₅ 引物及 M-MLV 逆转录酶进行一链合成得到其 cDNA, 然后各取 1 μ L cDNA 为模板进行 PCR 反应.

1.4 细胞培养与转染

HEK293 细胞培养基为 DMEM, 含有 10% FBS, 100 U/mL 青霉素以及 100 μ g/mL 链霉素. 培养条件为 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 浓度. 转染试剂为 Lipofectamine 2000 (Invitrogen). 转染所用的质粒为天根质粒提取试剂盒制备.

细胞共转染实验方法: HEK293 细胞以每孔 3×10^4 个细胞培养到 96 孔板内. 过夜待细胞铺满度为 80%左右, 用 Lipofectamine 2000 试剂按标准操作进行转染实验, pTN, pCV 与 pTRE-E 3 质粒的共转染是以总每孔中转染相应的质粒共 2 μ g(pTV 与 pTRE 共转染实验中两质粒之比为 1:1; pCV, pTN 及 pTRE-E 共转染实验中 3 种质粒比为 2:2:1), 然后于 24 h 后在不连续的随机视野下拍摄. 所有转染实验均重复 3 次以上.

1.5 荧光分析与图像采集

细胞转染结束 24 或 48 h 后, 用 Olympus IX70 荧光显微镜(Olympus, 东京, 日本)观察转染结果. 并用

Olympus c5060-ADU 照相机采集图像, 所有的图像均在不连续的随机视野下拍摄。

2 结果

2.1 pCV, pTN 与 pTRE-E 载体的构建

以前的研究^[21]已证实内含肽的每个剪接位点都存在严格的化学、电位以及空间特异性, 基因突变与化学分析进一步揭示了内含肽剪接位点的保守氨基酸残基为起始端的Cys或Ser, 末端的Asn以及cDnaE起始端的Ser, Thr或Cys^[22]。这些保守氨基酸残基包含了蛋白剪接的充足信息, 即使内含肽被插入到外源宿主蛋白框架中, 它也能顺利地进行剪接^[23,24]。为了确保实验中DnaEs的高效剪接, 本实验选用了临近nDnaE N端的KFAEY 5个氨基酸做为N端的剪接位点, 同时选用临近cDnaE C端的CFNKS序列作为了另一剪接位点分别连接到nDnaE与cDnaE的两侧(图 1(a))。将表达KFAEY的剪接位点序列设计到引物nDnaE.5中(表 1)。表达CFNKS剪接位点的序列设计到引物Vp16forward中(表 1)。通过PCR反应分别将得到KFAEY-nDnaE以及CFNKS-VP16, 然后通过overlap PCR 融合得到 TetR-KFAEY-nDnaE, cDnaE-CFNKS-VP16(图 1(b),(c))。经测序证实, 所有的序列与预期的一致。

2.2 融合蛋白 TV 活性的鉴定

实验中最为关键的一步就是确保DnaEs介导产生的融合蛋白(TV)具有转录活性。以前报告由TetR与VP16组成的融合蛋白表现出有效的转录活性^[25]。考虑到由DnaEs介导的融合蛋白在TetR与VP16之间有10个氨基酸残基(KFAEY/CFNKS)插入, 为了验证这10个氨基酸的插入是否影响到TV的正确折叠以及其转录活性, 本实验通过基因克隆得到与融合蛋白TV相同的嵌合蛋白TV基因, 然后将该基因插入载体pcDNA3.1(+)得到质粒pTV, 由该质粒表达的嵌合蛋白TV与通过DnaEs介导产生的融合蛋白TV具有完全相同的蛋白质一级结构。最后将pTV与报告基因质粒pTRE-E共转染细胞。结果显示在共转染有pTV和pTRE-E的细胞中, 可以观察到EGFP的高效表达(图 2)。说明虽然融合蛋白TV在TetR与VP16之间插入了10个氨基酸, 但它并不影响融合蛋白在细胞内的折

叠, 仍可以有效地发挥转录作用。

2.3 应用 RT-PCR 技术检测 DnaEs 的剪接活性

在鉴定融合蛋白TV的活性之后, 本实验进一步确认在细胞内DnaEs是否能够顺利剪接得到融合蛋白TV。将pCV, pTN以及pTRE-E共转染HEK293细胞。孵育24 h后提取总RNA进行RT-PCR实验。TRE是一个对四环素特异性极高的反应元件, 在细胞内pTRE-E只特异地应答TV起始下游基因的表达^[25]。因此, 如果细胞内DnaEs没有剪接出融合蛋白TV, 或者得到的融合蛋白TV没能进行正确的折叠, 则细胞内不会有下游报告基因EGFP的表达, 也就是说报告基因EGFP的表达能够证明DnaEs的剪接活性, 并且其表达水平的高低在一定程度上可以反映DnaEs剪接活性的高低。本实验结果显示CV, TN共表达的细胞中EGFP的mRNA含量明显高于只表达CV或只表达TN的细胞(图 3)。这充分证明CV, TN的共表达使细胞内DnaEs片段间发生重组, 介导产生了具有转录活性的融合蛋白TV。

2.4 应用荧光显微镜检定 DnaEs 的剪接产物

为了进一步确定DnaEs片段能够在胞内发生正确折叠以及有效剪接, 本实验应用荧光显微镜对EGFP的表达情况进行了直观分析。结果如图 4 所示, 在只转染pTRE-E的阴性对照细胞中没有观察到荧光

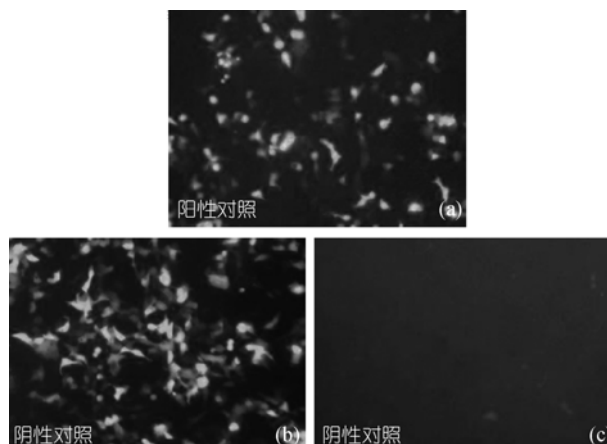


图 2 pTV 与 pTRE 共转染实验

对照组: 阴性对照为转染 2 μ g pEGFP-N1 质粒的 HEK29 细胞, 阳性对照为单独转染 2 μ g pTRE-E 质粒的 HEK29 细胞

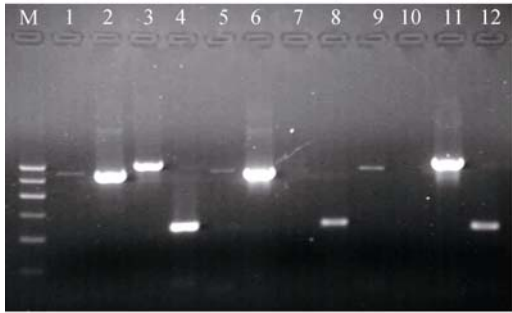


图3 RT-PCR 技术检测 DnaEs 剪接活性

泳道 1~4: 细胞共转染 Pcv, pTN 与 pTRE 各 1 μ g; 泳道 5~8: 细胞转染 pCV 与 pTRE-E 各 1 μ g; 泳道 9~12: 细胞共转染 pTN 与 pTRE 各 1 μ g. 泳道 1, 5, 9: 阳性对照, 人 γ -肌动蛋白(527 bp); 泳道 2, 6, 10: CV 的表达情况, 所用引物 cDnaE.5 与 Vp16reverse 扩增 CV 全长 (541 bp); 泳道 3, 7, 11: TN 的表达情况, 引物 TetRForward 与 TetRReverse, 只扩增其中的 650 bp; 泳道 4, 8, 12: EGFP 的表达情况, 引物为 EGFP.5 与 EGFP.3, 只扩增 EGFP 其中的 458~685 bp 区的片段, 大约 227 bp. M: DNA marker 自下而上依次为 100, 200, 300, 400, 500, 600 bp

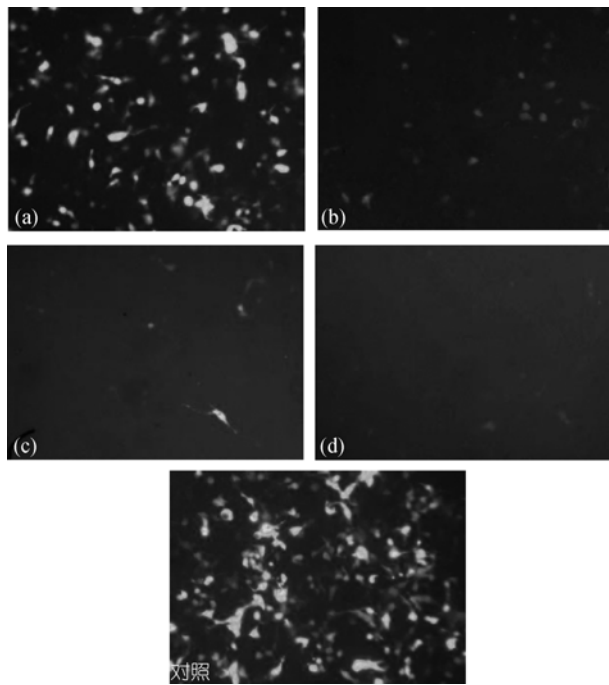


图4 HEK293 细胞内内含肽介导 TetR 与 VP16 的融合

(a) pTN, pCV 与 pTRE-E 3 种质粒共转染; (b) pCV 与 pTRE-E 质粒共转染; (c) pTN 与 pTRE-E 质粒共转染; (d) 单独转染 pTRE-E 质粒; 对照: 共转染 pTV 与 pTRE-E 质粒细胞. 所有实验均重复 3 次以上

蛋白的表达(图 4(d)); 而只转染 pTN 与 pTRE-E 的细

胞中只有极少量的荧光蛋白表达(图 4(c)); 同样在只转染 pCV 与 pTRE-E 的细胞中也是只有极少量荧光蛋白的表达(图 4(b)); 而在 pCV, pTN 与 pTRE-E 3 个质粒共转染的细胞中荧光蛋白的表达量极高(图 4(a)). 比较图 4(a)与图 4(b)~(d), 可以看到存在 DnaEs 剪接的细胞(图 4(a))与没有剪接的细胞(图 4(b)~(d))中 EGFP 的表达量差别明显, 并且随着时间的延长, 这种差别也会愈加明显. 这就进一步证明了细胞内单独的 CV 或单独的 TN, 并不能有效地激活 EGFP 的表达, 只有 CV 和 TN 共表达的细胞中 DnaEs 才可以介导 TV 的融合. 此外与前面 DNA 重组技术得到的 TetR-VP16(图 2)的结果相比, 还可以得出由 DnaEs 介导产生的融合蛋白 TV 与通过 DNA 重组得到的嵌合蛋白 TV 具有相似的转录活性.

共表达 CV 与 TN 蛋白片段的细胞中能够启动 EGFP 表达的另一可能原因是: 受 DnaEs 剪接效率的影响 CV 与 TN 可能形成二聚体, 由于分子量比较小这种异源二聚体也可能通过自由扩散进入细胞核^[19]启动报告基因的表达, 从而增强了实验的信号强度, 为了分析 CV 与 TN 二聚体对实验结果的影响, 构建表达 MC4R-cDnaE-VP16(MCV) 融合蛋白的质粒 pMCV, 其中 MC4R 为细胞膜蛋白人黑质素 4 受体. 因此在表达该蛋白的细胞中, CV 蛋白片段通过 MC4R 定位到细胞膜上, CV 与 TN 形成的二聚体因此不能转运至细胞核, 此时报告基因将由蛋白剪接产生的 TV 启动表达. 从而排除了 CV 与 TN 二聚体对实验结果的影响. 结果如图 5 所示, 共转染 pTN, pMCV 以及 pTRE-E 3 个质粒的细胞与对照没有明显区别, 说明 DnaEs 介导产生了可以游离进入细胞核的融合蛋白 TV, 启动下游报告基因的表达.

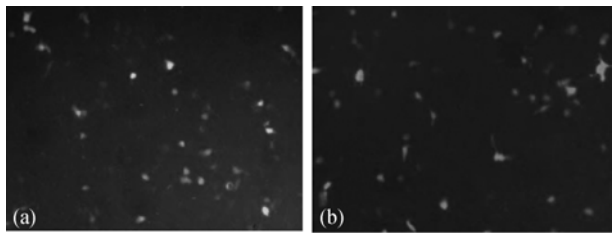


图5 pTN, pMCV 以及 pTRE-E 共转染实验

(a) pTN, pCV 以及 pTRE-E 共转染 HEK 293 细胞结果; (b) pTN, pMCV 以及 pTRE-E 共转染 HEK 293 细胞结果

2.5 融合蛋白 TV 的转录活性受 Dox 调控

为了验证 Dox 调控 TV 转录活性的能力, 将共转染 pCV, pTN 与 pTRE-E 3 质粒的细胞分为两组, 其中一组的细胞的培养基中没有加入任何 Dox(图 6(a)和(b)), 而另一组培养基中加入了 2.5 $\mu\text{g/mL}$ Dox(图 6(c)和(d)), 如图 6 所示 24, 48 h 后用 Dox 处理的细胞中 EGFP 表达量明显低于未处理的细胞. 因此 Dox 可以对融合蛋白 TV 的转录活性产生明显的抑制作用. 本实验表明利用不同浓度的 Dox 可以调控融合蛋白的转录活性.

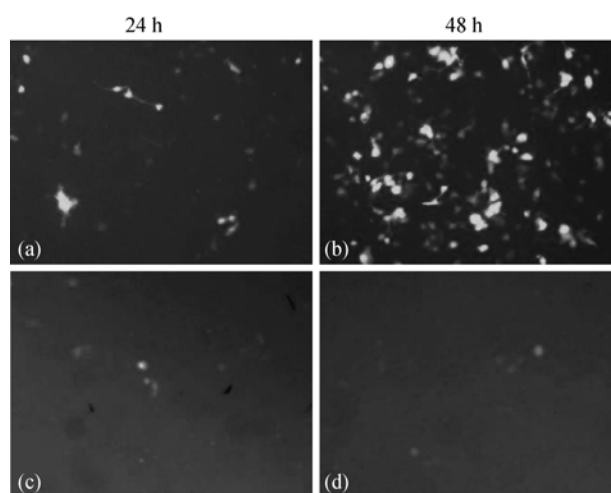


图 6 Dox 严格调控融合蛋白 TV 的转录活性

(a),(b) 细胞共转染 pTN, pCV 与 pTRE-E 3 种质粒, 未经 Dox 处理 24 及 48 h 后的荧光蛋白情况; (c),(d) 细胞共转染 pTN, pCV 与 pTRE-E 3 种质粒同时用 2.5 $\mu\text{g/mL}$ Dox 处理后 24 及 48 h 后的荧光蛋白情况. 所有实验均重复 3 次以上

3 结果与讨论

四环素阻遏蛋白是位于 *E. coli* 转座子 Tn10 四环素阻遏操纵子中的 DNA 结合蛋白, 在正常情况下 TetR 与四环素操纵子序列(tetO)结合阻止转录起始. 当加入四环素或其类似物强力霉素Dox后, 与TetR结合改变其构象使TetR蛋白从TetO位点释放出来从而解除阻遏^[26]. VP16 则是来自于 1-型单纯疱疹病毒转录激活蛋白 C-末端的转录激活结构域(127 个氨基酸残基)^[27]. TetR 或 VP16 单独存在的情况下并不具有起始转录的功能, 但它们的融合蛋白 TetR-VP16(tTA)可以与特异的 DNA

结合域tetO结合并激活转录, 当加入四环素或其类似物强力霉素Dox后, 由于TetR从tetO分离下来, 其转录功能受到抑制, 因此不同浓度的Dox可以严格地调控 tTA 的转录活性^[25]. 本实验中, 由于DnaEs的剪接作用在TetR与VP16 之间形成了 10 氨基酸多肽的插入(图 1(a)), 结果证明这 10 个氨基酸的插入在确保高效剪接的同时并没有对融合形成的TV活性产生显著影响. 提示在DNA结合结构域与转录激活结构域(VP16)的连接区可以进行适当的修饰. 酵母双杂交系统和哺乳动物双杂交系统也是基于DNA结合结构域与转录激活结构域重建发挥转录激活作用来检测蛋白-蛋白相互作用的, 但所不同的是两种双杂交系统中DNA结合结构域与转录激活结构域的重建是通过蛋白-蛋白相互作用实现的, 而DnaEs介导的TetR与VP16 的融合是一种共价转接, 因此其优点更为突出.

细胞中 CV 与 TN 共表达时, 由于 DnaEs 片段间的亲和力引导重组产生剪接功能将 TetR 和 VP16 两个片段通过共价键连接到一起, 形成融合蛋白 TV(图 7). 因此 DnaEs 片段间的亲和力是 split 内含肽高效剪接的关键, 据报道细胞内 DnaEs 两片段之间具有很强的内

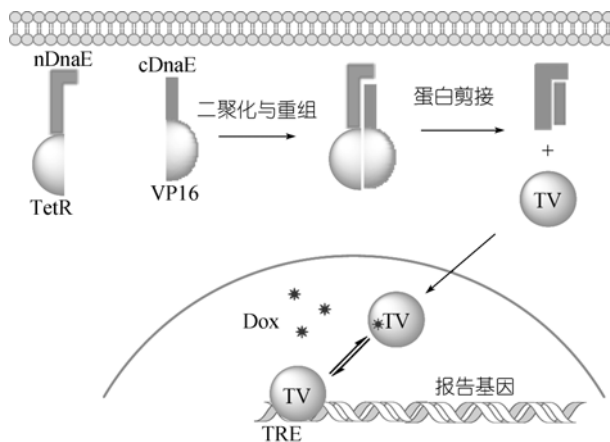


图 7 split 内含肽高效介导具有可调控转录活性蛋白融合示意图

TetR (1~207 氨基酸)是DNA结合蛋白, 它可以与基因组中的特异位点(TRE)结合, 该结合可用四环素类似物Dox进行调控, VP16 是HSV转录活化域的C端的 127 个氨基酸片段^[21]. TV 是TetR与VP16 的融合蛋白, 它可以特异地与TRE结合并激活转录, 并且其转录活性受Tc或Dox调控. 当细胞内共表达TN和CV时, 由于DnaEs的高亲和力及高效剪接而形成融合的TV, 从而激活报告基因的表达

在亲和力, 表现为高效剪接活性^[6,10,11,28]。但另有报道则认为DnaEs两片段间的内在亲和力并不能引起DnaEs的充分重组产生足够强的检测信号, 并且他们证实利用相互作用的蛋白进一步引导DnaEs片段二聚化与重组可以使产生的信号明显增强, 基于蛋白-蛋白相互作用前后DnaEs产生信号的明显不同, 他们在细胞内成功的检测了多种蛋白-蛋白间的相互作用^[16-19]。对于DnaEs片段间内在亲和力大小不同的这两种观点, 本实验认为DnaEs片段间存在一定的内在亲和力, 在简单细胞内如原核细胞内它可以较容易地引导片段重组产生剪接活性, 通过剪接后酶活性的恢复使信号放大, 表现为DnaEs片段间的强作用力; 但从另一方面看, 当同样的内在亲和力在结构复杂的细胞如真核细胞中时由于受到多种阻力的影响, 它介导DnaEs的重组也必然会受到一定程度上的影响, 表现出较低的剪接活性。因此对于具体不同的应用中DnaEs片段间可能会表现出亲和力大小不一致的情况。

本实验中split内含肽高效介导转录激活因子融合, 并激活下游报告基因的高效表达。其原因在于(1) DnaEs片段的高表达。由于在pTN, pCV的构建中, 本实验采用了强启动子CMV(图 1)确保了TN与CV的高表达, 在细胞质内形成高浓度的TN, CV共存有利于DnaEs片段间的重组与剪接, 产生大量TV; (2) 融合蛋白TV的信号放大作用。TV的转录激活作用使基因表达产物具有积累效应, 从而使可检测的信号大大增强; (3) 强大的TRE反应元件。它是由 7 个 42 bp 重复序列组成, 每个重复序列都包含一个tetO, 这 7 个

重复序列位于强启动子pminiCMV的上游^[25], 采用高拷贝的tetO和强启动子明显增强了TV与其结合的能力。由于这 3 方面的原因使split内含肽介导具有转录活性蛋白的融合产生极强的信号。

Kanno等人^[19]曾报道利用DnaEs介导DNA结合蛋白mLexA与VP16 融合产生的蛋白具有转录活性。在此基础上, 本研究采用了与TRE结合具有可调控的TetR作为DNA结合蛋白, 通过DnaEs介导将其与VP16 共价连接, 产生的融合蛋白TV不仅能特异地在TRE位点激活转录, 而且还可以利用Dox对转录产生的信号进行调控。与已报道的利用小分子物质直接调控内含肽剪接活性的rapamycin调控系统^[7,29]以及甲状腺素调控系统^[30]相比, 虽然方式不同, 但都可以对DnaEs引起的信号进行调控。

本文证明了细胞内 DnaEs 可以有效地介导 TetR 和 VP16 片段的融合, 产生的融合蛋白 TV 可以特异地与 TRE 反应元件结合并激活报告基因的转录, 在细胞内可以检测到较高的报告基因表达。同时由于TetR的诱导功能使TV的转录活性严格地受四环素类似物 Dox 的调控, 高浓度 Dox 可以完全抑制报告基因的表达, 调控范围大。提示可以应用 Dox 调控报告基因的表达。虽然由于实验条件所限, 本研究没有对DnaEs介导具有可调控转录活性蛋白的胞内融合进行定量分析。但结果在一定程度上证明了该方法具有信号强、可调控等特点, 显示出 DnaEs 介导可调控转录活性蛋白融合的良好应用前景, 为DnaEs更深入的应用研究打下基础。

致谢 感谢新英格兰实验室的 Ming-Qun Xu 博士提供 pKEB1 和 pMEB4 质粒和 Lori Tonello 给予的帮助。

参考文献

- 1 Noren C J, Wang J, Perler F B. Dissecting the chemistry of protein splicing and its applications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2000, 39(3): 450—466
- 2 Perler F B. Protein splicing of inteins and hedgehog autoproteolysis: structure, function, and evolution. *Cell*, 2003, 11(8): 997—1003
- 3 Gogarten J P, Senejani A G, Zhaxybayeva O, et al. INTEINS: structure, function, and evolution. *Annu Rev Microbiol*, 2002, 56: 263—287 [\[DOI\]](#)
- 4 Southworth M W, Adam E, Panne D, et al. Control of protein splicing by intein fragment reassembly. *EMBO J*, 1998, 17(4): 918—926 [\[DOI\]](#)
- 5 Mills K V, Lew B M, Jiang S, et al. Protein splicing in trans by purified N- and C-terminal fragments of the *Mycobacterium tuberculosis* RecA intein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(7): 3543—3548 [\[DOI\]](#)

- 6 Martin D D, Xu M Q, Evans Jr T C. Characterization of a naturally occurring trans-splicing intein from *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochemistry*, 2001, 40(5): 1393—1402[DOI]
- 7 Mootz H D, Blum E S, Tyszkiewicz A B, et al. Conditional protein splicing: a new tool to control protein structure and function *in vitro* and *in vivo*. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(35): 10561—10569[DOI]
- 8 Brenzel S, Kurpiers T, Mootz H D. Engineering artificially split inteins for applications in protein chemistry: biochemical characterization of the split Ssp DnaB intein and comparison to the split Sce VMA intein. *Biochemistry*, 2006, 45(6): 1571—1578[DOI]
- 9 Saleh L, Perler F B. Protein splicing in cis and in trans. *Chem Rec*, 2006, 6(4): 183—193[DOI]
- 10 Giriat I, Muir T W. Protein semi-synthesis in living cells. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(24): 7180—7181[DOI]
- 11 Nichols N M, Evans Jr T C. Mutational analysis of protein splicing, cleavage, and self-association reactions mediated by the naturally split Ssp DnaE intein. *Biochemistry*, 2004, 43(31): 10265—10276[DOI]
- 12 Evans T C, Martin D, Kolly R, et al. Protein trans-splicing and cyclization by a naturally split intein from the dnaE gene of *Synechocystis* species PCC6803. *J Biol Chem*, 2000, 275(13): 9091—9094[DOI]
- 13 Ozawa T, Sako Y, Sato M, et al. A genetic approach to identifying mitochondrial proteins. *Nat Biotech*, 2003, 21(3): 287—293[DOI]
- 14 Kim S B, Ozawa T, Watanabe S, et al. High-throughput sensing and noninvasive imaging of protein nuclear transport by using reconstitution of split Renilla luciferase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(32): 11542—11547[DOI]
- 15 Ozawa T, Nishitani K, Sako Y, et al. A high-throughput screening of genes that encode proteins transported into the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *Nucl Acids Res*, 2005, 33(4): e34[DOI]
- 16 Ozawa T, Nogami S, Sato M, et al. A fluorescent indicator for detecting protein-protein interactions *in vivo* based on protein splicing. *Anal Chem*, 2000, 72(21): 5151—5157[DOI]
- 17 Ozawa T, Umezawa Y. Detection of protein-protein interactions *in vivo* based on protein splicing. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5(5): 578—583[DOI]
- 18 Ozawa T, Kaihara A, Sato M, et al. Split luciferase as an optical probe for detecting protein-protein interactions in mammalian cells based on protein splicing. *Anal Chem*, 2001, 73(11): 2516—2521[DOI]
- 19 Kanno A, Ozawa T, Umezawa Y. Intein-mediated reporter gene assay for detecting protein-protein interactions in living mammalian cells. *Anal Chem*, 2006, 78(2): 556—560[DOI]
- 20 Wu H, Hu Z, Liu X Q. Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(16): 9226—9231[DOI]
- 21 Xu M Q, Perler F B. The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation. *EMBO J*, 1996, 15(19): 5146—5153
- 22 Pietrovski S. Conserved sequence features of inteins (protein introns) and their use in identifying new inteins and related proteins. *Protein Sci*, 1994, 3(12): 2340—2350
- 23 Xu M Q, Southworth M W, Mersha F B, et al. *In vitro* protein splicing of purified precursor and the identification of a branched intermediate. *Cell*, 1993, 75(7): 1371—1377[DOI]
- 24 Davis E O, Jenner P J, Brooks P C, et al. Protein splicing in the maturation of *M. tuberculosis* recA protein: a mechanism for tolerating a novel class of intervening sequence. *Cell*, 1992, 71(2): 201—210[DOI]
- 25 Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(12): 5547—5551[DOI]
- 26 Hinrichs W, Kisker C, Duvel M, et al. Structure of the tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science*, 1994, 264(5157): 418[DOI]
- 27 Triezenberg S J, Kingsbury R C, McKnight S L. Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev*, 1988, 2(6): 718—729[DOI]
- 28 Shi J, Muir T W. Development of a tandem protein trans-splicing system based on native and engineered split inteins. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(17): 6198—6206[DOI]
- 29 Brenzel S, Mootz H D. Design of an intein that can be inhibited with a small molecule ligand. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(12): 4176—4177[DOI]
- 30 Skretas G, Wood D W. Regulation of protein activity with small-molecule-controlled inteins. *Protein Sci*, 2005, 14(2): 532—368[DOI]