



论 文

基于蛋白质反式剪接的双载体凝血 因子
基因转移朱甫祥^①, 刘泽隆^①, 迟晓艳^①, 屈慧鸽^①, 刘相钦^②^① 鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025;^② Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Dalhousie University, Halifax B3H 4H7, Canada

E-mail: fuxiangmail@163.com

收稿日期: 2009-04-10; 接受日期: 2009-07-02

山东省自然科学基金(批准号: Y2005D14)、烟台市科技计划(批准号: 2008152)、教育部留学回国人员科研启动基金和鲁东大学科研启动经费资助项目

摘要 以 intein 的蛋白反式剪接为工具, 研究了运用双载体的真核细胞凝血 因子(F) 基因转移, 通过翻译后剪接得到完整的功能性 F 蛋白. 将 B 结构域大部分缺失($\Delta 761 \sim 1639$)的人功能性 F (BDD-F) cDNA 于剪接所需保守残基 Ser¹⁶⁵⁷ 前断裂为重链和轻链, 分别与 106 和 48 个氨基酸的 mini Ssp DnaB intein 的 N 端(IntN)和 C 端(IntC)编码序列融合, 构建一对在质粒 pcDNA3.1 的强启动子 CMV 驱动下的真核表达载体. 用脂质体共转染至 293 细胞和 COS-7 细胞, 培养 48 h 后, 收集细胞上清, 用 ELISA 检测培养上清中剪接形成的 BDD-F 蛋白水平, 用 Coatest 法检测上清的功能性 F 生物活性, 并用 Western blot 观察细胞内的 BDD-F 蛋白质剪接. 结果显示, 两种细胞培养上清中有较高水平的剪接 BDD-F 蛋白形成, 分别达到 (137 ± 23) 和 (109 ± 22) ng/mL, 由细胞内和细胞外(培养上清)的剪接共同组成; 并检测到培养上清中较高水平的 F 生物活性, 分别为 (1.05 ± 0.16) 和 (0.79 ± 0.23) IU/mL, 包括细胞内、外剪接产物 BDD-F 共同形成; 细胞总蛋白的 Western blot 进一步显示共转染后细胞内高效剪接形成的 BDD-F 蛋白. 表明 intein 可用于双载体系统真核细胞 F 基因转移, 并不完全依赖细胞内的剪接产生具有高 F 生物活性的 BDD-F 蛋白, 为进一步在甲型血友病基因治疗研究中应用双腺相关病毒载体(AAV)转运 F 基因, 克服 AAV 载体的容量限制提供了依据.

关键词intein
蛋白质反式剪接
凝血 因子
双载体基因转移

蛋白质剪接作用是一种包埋于前体蛋白中的 intein 多肽序列所介导的类似于 RNA 剪接的翻译后蛋白质连接反应, 主要发现于原核生物和单细胞真核生物的某些宿主蛋白, 在翻译后的蛋白质成熟过程中通过自催化剪接反应被切除, 同时伴随两侧宿

主蛋白(N-extein, C-extein)的肽键连接, 成为具有生物学功能的成熟蛋白质^[1]. 蛋白质剪接分为顺式(cis)和反式(trans)两种, 分别由连续的 intein 和断裂的 intein 介导, 大多数属于前者. Ssp DnaE intein 是第一个被发现的天然反式剪接 intein, 存在于 *Synechocystis*

sp. strain PCC6803 的 DNA 聚合酶催化亚基 DnaE, 介导分开表达的两部分 DnaE 蛋白的剪接、成熟为功能性 DnaE 蛋白^[2]. 人工断裂的顺式作用 intein 可产生反式剪接作用, 如将 *Ssp* DnaB intein 断裂为 106 个氨基酸的 N 端和 48 个氨基酸的 C 端后的 split mini *Ssp* DnaB intein, 表现出对非天然宿主蛋白的反式剪接作用^[3]. Intein 间的同源性较低, 通过剪接部位保守性氨基酸进行四步自发催化反应完成剪接, 剪接反应不依赖细胞机制, 也不需要能量消耗^[4], 这为蛋白质剪接技术的应用提供了方便. 在基因治疗研究中, 为克服基因载体如 AAV 的容量限制、蛋白质反式剪接技术提供了一种解决的策略. 将大基因断裂后分别与 intein 融合, 构建双载体, 通过向靶细胞的基因共转染、表达后蛋白质水平的反式剪接形成完整的功能性蛋白(图 1).

真核细胞凝血因子(F)基因的缺陷导致甲型血友病, 体细胞基因治疗是其理想的治疗模式, 但由于 *F* 基因太大(7 kb)而难以为大多数病毒载体所承载, 即使是使用一种缩减的 B 结构域大部缺失($\Delta 761\sim 639$)突变体功能性 F 即 BDD-F (B-domain-deleted factor), 其 cDNA 长度为 4.5 kb, 加上基因表达的调控序列仍超过理想基因载体 AAV 的容量限制. 因

此相对于乙型血友病, 甲型血友病基因治疗研究进展缓慢. 本文旨在运用蛋白质反式剪接技术进行双载体转运 *F* 基因的研究, 将人 BDD-F 基因与满足剪接反应所需的 Ser¹⁶⁵⁷ 密码子前断裂为重链和轻链两部分, 分别与 split mini *Ssp* DnaB intein 的 N 端(IntN)和 C 端(IntC)基因融合, 克隆到 CMV 强启动子控制下的真核表达载体 pcDNA3.1, 共转染 293 细胞和 COS-7 细胞, 瞬时表达观察到细胞内 BDD-F 的高效剪接; 培养上清中显示剪接形成的高水平 F 活性, 同时观察到不依赖细胞机制的分泌后的 BDD-F 剪接. 这些发现为进一步在动物体内运用双 AAV 载体转基因的甲型血友病基因治疗研究, 提供了实验依据.

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞

含有 split mini *Ssp* DnaB intein 编码序列的质粒 pMST 和含有人 BDD-F ($\Delta 761\sim 1639$)cDNA 的质粒 pXX-F8 构建于加拿大 Dalhousie 大学医学院 Paul Liu 教授实验室, 本室保存. 含有人 BDD-F cDNA 的真核表达质粒 pCMV-F8(骨架为 pcDNA3.1)由本实验室构建并保存. pcDNA3.1(+)购自 Invitrogen 公司. 大

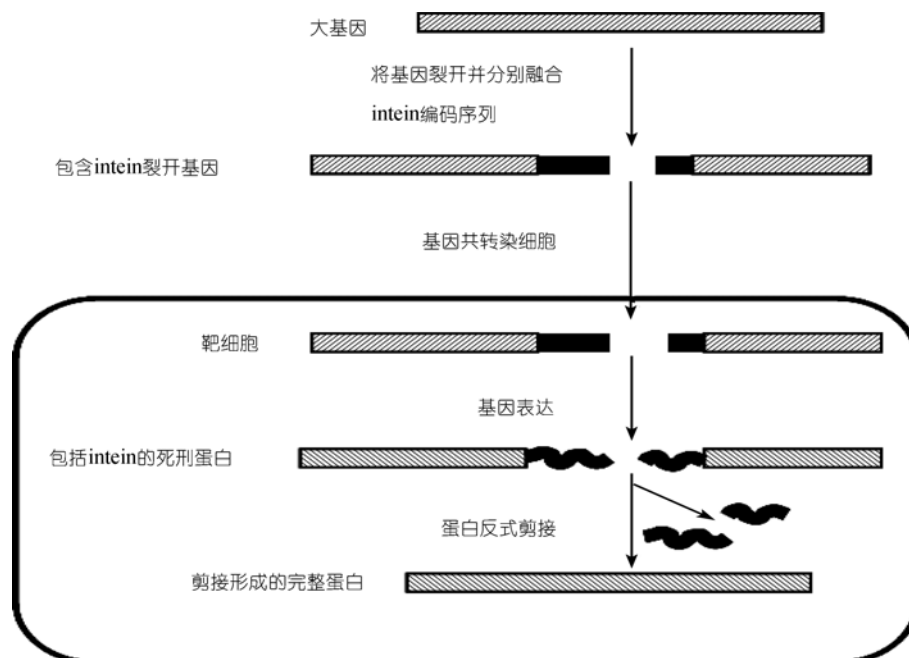


图 1 基于蛋白质反式剪接作用的大基因双载体转染示意图

肠杆菌菌株 DH5 α 为本室保存, 293 细胞和 COS-7 细胞购自中国科学院细胞库。

1.2 工具酶和主要试剂

限制性内切酶、DNA 连接酶试剂盒、DNA 分子量标准产自 New England Biolabs 公司, 高保真 *Pfu* Turbo DNA 聚合酶购自 Stratagene 公司; Gel Extraction Kit, PCR Purification Kit, Spin Miniprep Kit 均为 Qiagen 公司产品。DMEM 和 Opti-MEM 培养基、Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司, 胎牛血清购自 Hyclone 公司。人重组 F 为 BioChain 公司产品, 人 F 重链单克隆抗体 ESH5 和 HRP 标记的轻链单克隆抗体 ESH8(HRP-ESH8)购自 American Diagnostica 公司, 兔抗人 F 多克隆抗体购自 Novus 公司; 羊抗兔 HRP-二抗和 ECL plus Western Blot Detection 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech (GE)公司; 人正常参比血浆为 George King Biomedical 公司产品。F 活性检测的 COATEST SP F 试剂盒购自 Chromogenix 公司。其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 真核融合重组表达质粒 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 的构建

以质粒 pCMV-F8 为模板, 用高保真 *Pfu* Turbo

DNA 聚合酶、引物 P1 和 P2 进行反向 PCR 扩增含 BDD-F 重链(HC)的编码序列和 pcDNA3.1 质粒骨架, 以质粒 pMST 为模板, 用引物 P3 和 P4 PCR 扩增 *Ssp* DnaB intein N 端 106 个氨基酸(IntN)的编码序列, 用 *Apa* 分别酶切上述 PCR 产物, T₄ DNA 连接酶连接, 得到 F HC 与 IntN 的融合表达质粒 pCMV- HCIntN。

鉴于 F 的分泌特性, 在构建 intein 与轻链融合表达载体时将其由 19 个氨基酸组成的信号肽的编码序列融合到表达框的 5'端, 为此合成一对互补的编码信号肽的寡核苷酸 P5 和 P6, 退火后双链的两侧分别含 *Hind* 和 *Mfe* 的黏性末端。同时在起始密码子附近引入了人 F 的 Kozak 序列 5'-GTCATGC-3'; 以引物 P7 和 P8 进行 PCR 从质粒 pMST 扩增出 *Ssp* DnaB intein 的 C 端 48 个氨基酸(IntC)的编码序列, 用 *Mfe* 酶切 PCR 产物; 用引物 P9 和 P10, 以质粒 pCMV-F8 为模板反向 PCR 扩增含 BDD-F 轻链(LC)的编码序列和 pcDNA3.1 质粒骨架, 用 *Hind* 酶切 PCR 产物。将上述经酶切的 PCR 产物与退火的 F 信号肽编码 DNA 用 T₄ DNA 连接酶连接, 构建成信号肽、IntC 和 LC 的融合表达质粒 pCMV-IntCLC。用酶切方法及 DNA 测序鉴定所构建的质粒。所用引物及序列见表 1, 由上海生工公司合成。

表 1 构建载体所用寡核苷酸引物及序列

引物	序列	引入酶切位点
P1	5'-GCTAGGGCCCGTTTAAACCCGCTG-3'	<i>Apa</i>
P2	5'-CTGAAGAGTAGTACGAGTTATTTC-3'	
P3	5'-TGCATCAGTGGAGATAGTTTGATC-3'	
P4	5'-CTAGGGGCCCTCACAAATTGTAAAGAGGAGCTTTCTAG-3'	<i>Apa</i>
P5	5'-AGCTTGTCATGCAAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTC TGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGTC-3'	<i>Hind</i>
P6	5'-AATGACTAAAGCAGAATCGCAAAAGGCACAGAAAGAA GCAGGTGGAGAGCTCTATTTCATGACA-3'	<i>Mfe</i>
P7	5'-CTAGCAATTGTCACCAGAAATAGAAAAG-3'	<i>Mfe</i>
P8	5'-GTTATGGACAATGATGACATTGG-3'	
P9	5'-TCAGATCAAGAGGAAATTGACTATG-3'	<i>Hind</i>
P10	5'-CTCCAAGCTTAAGTTTAAACGCTAGC-3'	

1.4 细胞培养及基因转染

293 细胞和 COS-7 细胞于 5%CO₂、37℃ 培养箱以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液贴壁培养. 转染前一天用胰蛋白酶消化分散细胞, 按每孔 5×10^5 个细胞于 2 mL DMEM 培养液将细胞转接于 6 孔培养板. 待细胞生长融合至 80% 以上时, 用 Lipofectamine2000 脂质体按试剂盒说明书进行转染. 将两种质粒 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 按 1:1 比率各 4 μ g 混合稀释于 250 μ L 的 Opti-MEM 培养液中, 与室温放置 5 min 的含 20 μ L 脂质体的 250 μ L Opti-MEM 培养液混合后继续室温放置 20 min, 共转染 293 细胞和 COS-7 细胞. 同时, 分别用 4 μ g 的 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 质粒转染上述两种细胞, 用 4 μ g 的 pCMV-F8 作为阳性对照和 pcDNA3.1 空白质粒作为阴性(Mock)对照转染上述两种细胞. 培养箱内温育 5 h 后换以 2 mL 的新鲜 Opti-MEM 培养液, 继续培养 48 h, 收集培养上清及细胞. 为了观察分泌后培养上清的蛋白质剪接, 将分别转染 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 的细胞于转染后 24 h, 吹打悬浮、合并后转移至新培养板, 继续培养 24 h 后, 收集上清.

1.5 细胞培养上清中剪接的 BDD-F 蛋白浓度及其 F 生物活性检测

将收集的细胞培养上清, 参照文献[5]用双夹心 ELISA 检测上清中剪接产生的 BDD-F 蛋白量. 参照文献[6]用 Coatest 发色分析法检测上清中由 BDD-F 蛋白产生的 F 生物活性.

将以 2 μ g/mL 稀释的重链特异性单抗 ESH5 每孔 100 μ L 加入 96 孔酶标板, 4℃ 包被过夜. 用洗涤液 (PBS/0.05% Tween 20) 洗板 3 次, 每孔用 200 μ L 封闭液 (PBS+1% BSA+0.05% Tween 20), 37℃ 温育 2 h, 洗板 3 次后, 将收集的培养上清和用 Opti-MEM 培养液稀释的标准品 F (浓度范围为 10~300 ng/mL), 每个样品及每个稀释度的标准品分别平行重复加样 3 个孔, 每孔 100 μ L, 37℃ 温育 1 h. 洗板后每孔加入 100 μ L 浓度为 2 μ g/mL 的 HRP 标记轻链单抗 HRP-ESH8, 37℃ 温育 1 h 后洗板 10 次, 加反应底物 OPD 溶液 37℃ 温育 30 min 进行显色, 用 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应, 490 nm 读板. 以系列稀释的标准品的浓度和吸

光值绘制标准工作曲线. 根据测得的上清样品的吸光值从标准曲线读取 BDD-F 浓度.

用 Coatest 发色分析法, 按照试剂盒说明书操作分析上清的 F 生物活性. 以正常人参比血浆 (F 活性为 1.0 IU/mL), 用 Opti-MEM 培养液配成低浓度范围 (1%~20%) 和高浓度范围 (20%~150%) 两种浓度系列, 序列反应后 405 nm 处读取吸光值. 以稀释百分比为横坐标、405 nm 吸光值为纵坐标分别绘制低量程和高量程标准曲线, 由培养上清样品测得的吸光值从标准曲线读出相应的百分比值, 以 100% 为 1.0 IU/mL 换算为上清的 F 生物活性.

1.6 Western blot 观察细胞内的蛋白质剪接

将胰蛋白酶消化收集的细胞, 液氮 3 min, 37℃ 3 min 反复冻融 3 次, 提取细胞总蛋白. 用 Bradford 法进行蛋白定量, 取 12 μ g 总蛋白上样进行还原性 SDS-PAGE, 半干电转法将蛋白印迹至硝酸纤维素膜, 5% BSA 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h, 用 1:500 稀释的兔抗人 F 多克隆抗体 37℃ 轻摇孵育 1 h, 再用 HRP-抗兔血清 37℃ 轻摇孵育 1 h, ECL plus 法曝光 X 胶片. 实验中设置 β -actin 为内参照, 用 1:1000 稀释的小鼠抗 β -actin 抗体进行检测内源性 β -actin 的表达.

2 结果

2.1 断裂 BDD-F 基因 intein 融合真核表达载体的构建及鉴定

Intein 剪接反应除了其本身剪接位点的保守性氨基酸参与, 还有赖于与下游剪接位点相连的宿主蛋白首个保守性氨基酸残基, 即 Ser, Cys 或 Thr 的参与, 选择与 *Ssp* DnaB intein 天然宿主蛋白相同的 Ser¹⁶⁵⁷ 前断裂 BDD-F. 用高保真 *Pfu* DNA 聚合酶从插入 BDD-F cDNA 的质粒 pCMV-F8 反向 PCR 扩增包含信号肽的 BDD-F 重链部分编码序列和 pcDNA3.1 载体序列, 与 PCR 扩增的末端引入终止密码子的 *Ssp* DnaB intein 的 IntN 编码序列, 连接环化得到重链与 intein 融合表达质粒 pCMV-HCIntN. 反向 PCR 扩增的轻链编码序列与 pcDNA3.1 载体序列, 与 F 信号肽编码序列、PCR 扩增的 *Ssp* DnaB intein 的 IntC 连接环化, 成为信号肽、intein 与轻链融合表达质粒

pCMV-IntCLC. 重组质粒 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 的基因融合简图如图 2(A)所示. pCMV-HCIntN 经 *Mfe* 和 *BsrG* 酶切鉴定可见 0.9, 5.0 和 2.2 kb 3 个片段, pCMV-IntCLC 经 *Mfe* 和 *EcoR* 酶切得到 0.9, 2.0 和 4.8 kb 3 个片段(图 2(B)). 测序结果得到进一步证实, 所构建的质粒完全正确.

2.2 细胞培养上清中剪接形成的 BDD-F 蛋白浓度

用 F 重链单克隆抗体为包被抗体和轻链单克隆抗体为检测抗体的双夹心 ELISA 结果显示(图 3), 共转染 HCIntN 和 IntCLC 的 293 细胞和 COS-7 细胞培养上清的 BDD-F 蛋白浓度分别为(137±23)和(109±22) ng/mL, 低于 BDD-F 转染的阳性对照上清(146±28)和(123±24) ng/mL. 单独转染 HCIntN 和 IntCLC 的细胞合并培养后上清仍可检测到剪接形成的完整 BDD-F 蛋白(46±11)和(35±8) ng/mL, 提示分泌后的两部分融合蛋白在上清中仍能进行剪接反应, 清楚地表明共转染细胞上清的 BDD-F 由以细胞内剪接为主的细胞内、外剪接共同形成. Mock 转

染、单独 HCIntN 或 IntCLC 转染的细胞上清均未检测到 BDD-F .

2.3 细胞培养上清中的 F 生物活性

Coatest 分析结果显示, 共转染 HCIntN 和 IntCLC 的 293 细胞和 COS-7 细胞培养上清的 F 活性分别为(1.05±0.16)和(0.79±0.23) IU/mL, 由剪接形成的 BDD-F 产生, 从单独转染后合并的细胞上清仍可检测到一定量的 F 活性(0.32±0.06)和(0.23±0.08) IU/mL, 进一步说明, BDD-F 剪接的不完全细胞依赖性. 两种细胞的 BDD-F 阳性对照转染的上清 F 活性均高于共转染的细胞上清, 而 Mock 转染、单独 HCIntN 或 IntCLC 转染的细胞上清均未检测到 F 生物活性(图 4).

2.4 蛋白质剪接的 Western blot 结果

细胞总蛋白 Western blot 结果显示(图 5), 转染 BDD-F 的阳性对照的 293 细胞和 COS-7 细胞可见明显的预期分子量大小的 BDD-F 蛋白条带(169 kD), Mock 转染细胞未见 BDD-F 蛋白条带, 共转染

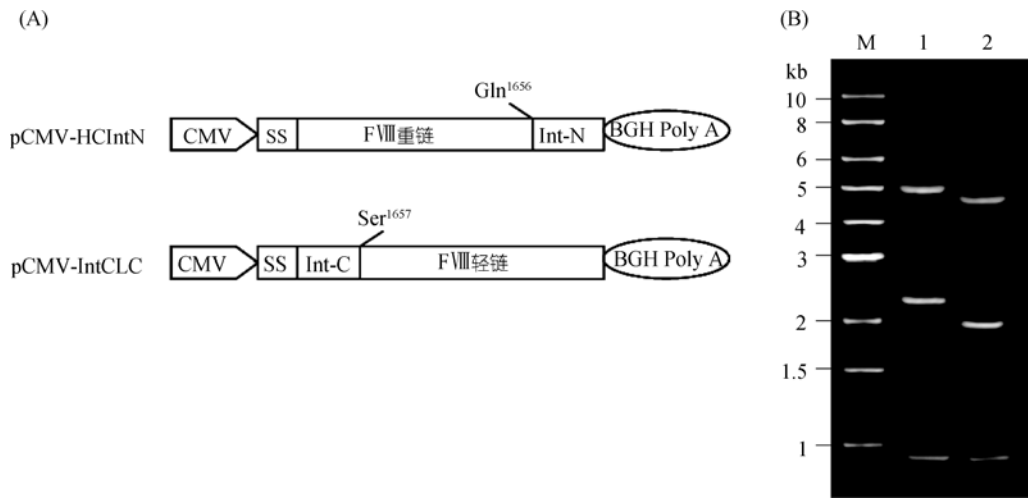


图 2 intein 融合重组表达质粒构建结果

(A) 重组质粒结构示意图. SS 为 F 的信号肽编码序列, 以保证所表达的重组融合蛋白进入分泌途径. IntC 之后的 Ser 残基与 *Ssp* DnaB intein 的天然宿主蛋白相同, 为剪接反应所必需; (B) 质粒酶切鉴定结果. M 为 DNA 分子量 marker, 泳道 1 为 pCMV-HCIntN 的 *Mfe* /*BsrG* 双酶切结果, 由于在质粒骨架和重链与 IntN 融合处分别含有一 *Mfe* 识别位点, 在重链靠近 N 端处含一个 *BsrG* 位点, 经双酶切后可见 0.9, 5.0 和 2.2 kb 3 个片段. 泳道 2 为 pCMV-IntCLC 的 *Mfe* /*EcoR* 双酶切结果, 由于在质粒骨架和 IntC 与轻链融合处分别含有一个 *Mfe* 识别位点, 在轻链靠近 C 端处含一 *EcoR* 位点, 经双酶切后可见 0.9, 2.0 和 4.8 kb 3 个片段

HCIntN 和 IntCLC 的 293 细胞和 COS-7 细胞均可见一明显的与阳性对照同样大小的剪接形成的 BDD-F 蛋白条带(HC-LC), 显示较高的剪接效率, 同时尚可见未完全剪接的两部分 intein 融合蛋白前体, 即重链与 IntN 的融合蛋白(HC-IntN)和 IntC 与轻链的融合蛋白(IntC-LC). 内参照 β -actin 条带比较均匀, 说明蛋白上样量无明显差异.

3 讨论

由于对 intein 不依赖细胞机制和能量消耗的分子水平剪接机制的基本认识, 以及所表现出的对非天然宿主蛋白的剪接作用, 其近年来在涉及蛋白质操作的研究, 如蛋白质的纯化^[7]、多肽的环化^[8]以及蛋

白质相互作用^[9]等研究中得到有效应用. 本研究运用 split mini Ssp DnaB intein 具有的蛋白质反式剪接功能, 进行的双载体真核细胞转移人 BDD-F 基因结果显示, 通过翻译后蛋白质水平的剪接作用能有效地使重链和轻链连接形成完整的具有较高 F 生物活性的 BDD-F 蛋白, 表明 intein 的蛋白质反式剪接在双载体基因转运系统中可作为一种有效的技术策略. F 基因突变所导致的 X 染色体连锁遗传性甲型血友病占血友病患者总数的 80%. 目前主要依靠血浆源性和重组的 F 补充治疗, 由于 F 在人体内半衰期较短(约 12 h), 需要反复用药, 有诸多不利, 如费用高、易导致血源性传染病传播, 以及超过 20% 的患者

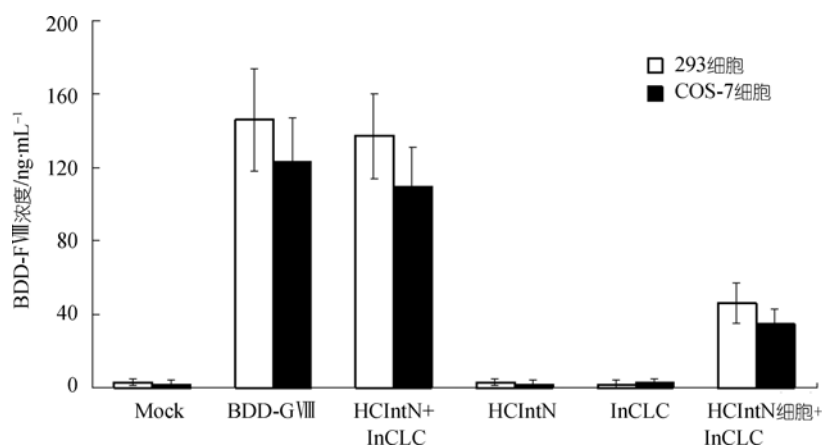


图 3 ELISA 定量分析培养上清中 BDD-F 蛋白的含量

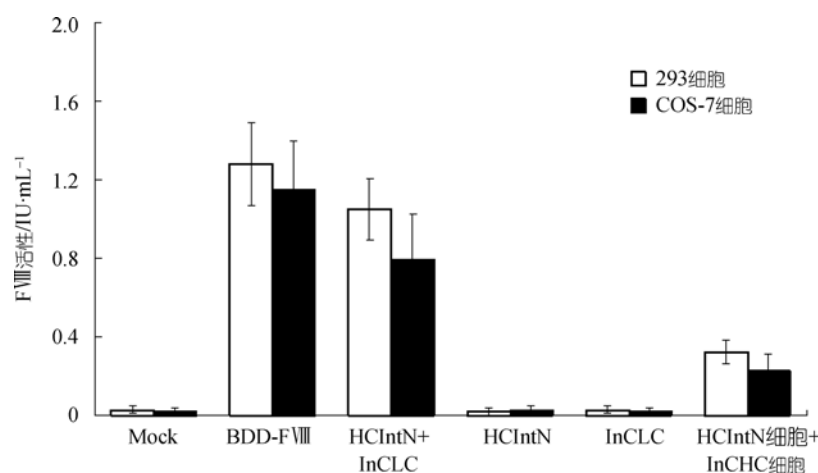


图 4 Coatest 分析法测得的细胞培养上清的 FVIII 生物活性

可产生对 F 的特异性抗体影响再次给药的疗效^[10]. F 是凝血过程的一种辅因子, 只要达到生理水平 (100~200 ng/mL) 的 2%~3% 即可以达到治疗效果^[11], 因此其被认为是理想的体细胞基因治疗适应症. 在众多已开发的基因运载体中, AAV 具有可持续稳定表达转基因, 并可感染非分裂期细胞以及不会引起机体强免疫反应等优点, 而且静脉注射后主要感染特别适合 F 表达的肝细胞. 因生理性 F 主要由肝脏产生, 所以其特别适合于甲型血友病的基因治疗中的基因转移. 但由于容量限制使 AAV 转运 F 基因比较困难, 即使是缩减型的长约 4.5 kb 的功能性 BDD-F 基因, 加上基因表达调控序列后仍然偏大, 超过 AAV 的容量上限. 目前体内、外研究中以 AAV 载体转运 F 基因所采用的克服容量限制的策略主要有两种, 一种是采用基于对内源性 F 部分加工成异源二聚体后分泌机制的认识和基于 DNA 水平的剪接机制的双载体系统策略, 前者通过两个载体共转染后分别表达的重、轻链形成异源二聚体^[12~14], 由于二聚体化对细胞机制的依赖, 必须在同一靶细胞中表达重、轻链, 对共转染要求较高. 但其实际共转染效率并不高, 从而影响形成二聚体的效率, 而且研究表明重链本身的分泌效率明显低于轻链^[12], 容易造成重链在内质网中积聚, 对细胞造成压力而使其不稳定, 甚至可诱导细胞凋亡^[15]. 后者分别在两个载体

的 3'端和 5'端引入剪接供点和受点, 共转染后通过 DNA 水平的二聚体化反式剪接形成完整的 F 基因, 因同样依赖同一靶细胞的共转染, 而且存在二聚体化方向的随机性和 AAV 载体 DNA 自身环化的倾向, 头尾正确相连的几率很低^[16~18]. 另一种是采用小的启动子/增强子的单个 AAV 载体策略, 如有人用白蛋白启动子^[19]、 β -肌动蛋白启动子^[20]或甲状腺素运载蛋白启动子^[21]的 AAV 转 BDD-F 基因研究. 缺点在于蛋白表达水平较低和/或缺乏组织特异性表达. 而基于蛋白质反式剪接的双载体基因转移策略是通过表达产物自发地进行高效剪接反应, 精确地将重链和轻链首尾相连形成完整的功能蛋白分子. 不依赖细胞机制, 而且两个载体都有充分的空间, 可以选用旨在提高表达量和/或组织特异性表达的基因调控序列, 与上述两种策略相比具有明显的优势. 由剪接蛋白的定量和功能检测结果(图 3 和 4)可见, 细胞内剪接的比率较上清高. 对此有两种可能的解释, 一是细胞内合成的两部分多肽加工分泌过程中在内质网腔中相遇优先进行剪接, 二是细胞中新合成的两部分多肽浓度比上清高, 有利于它们的相遇并剪接. 因此, 即使在共转染效率不高的情况下, 由于 F 的分泌特性, 分泌后的未剪接蛋白仍可进行剪接产生一定量的功能性 BDD-F. 另外, 由于 BDD-F 重链相对于轻链分泌过程的低效性. 本研究组最近运用 intein

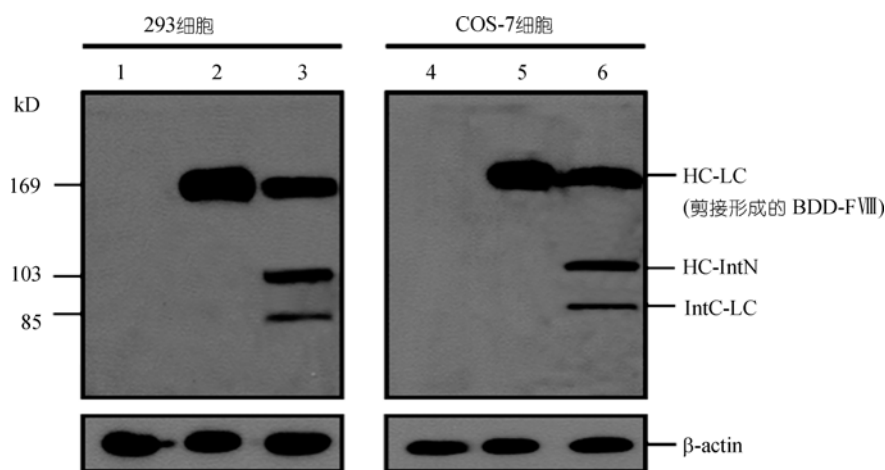


图 5 应用 F 多克隆抗体的 Western blot 结果

泳道 1, 4 示 Mock 转染; 泳道 2, 5 示转染 pCMV-F8 阳性对照; 泳道 3, 6 示 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 共转染

的剪接技术证明, 轻链具有明显的顺式促进重链分泌的作用^[22], 有助于解决细胞内的重、轻链量的不平衡性, 缓解重链聚集对细胞产生的压力。

需要指出的是, *intein* 通常对其天然宿主蛋白的剪接十分迅速而且完全, 甚至难以检测到前体蛋白的存在。但研究^[2]显示, *intein* 对非天然宿主蛋白的剪接效率高低不一, 说明 *intein* 两侧 *extein* 的残基组成和结构影响剪接效率, 但影响的机制未明确。因此对于特定的目的蛋白和 *intein*, 均需实验确定最有利于剪接的融合方式, 特别是反式剪接, 尽管满足直接参与剪接的保守性氨基酸要求, 但剪接位点附近不利于剪接的氨基酸组成势必影响剪接的效率甚至不能剪接。本研究组在原核表达系统实验了 *mini Ssp DnaB intein* 对不同点断裂的 BDD-F 的剪接作用,

包括 Ser⁷⁴¹, Ser⁷⁴³, Ser⁷⁴⁶, Ser⁷⁵⁰, Ser¹⁶⁵⁷ 位点, 只有 Ser¹⁶⁵⁷ 断裂点显示较高的剪接前效率(结果未显示)。最近有人报道用 *split Ssp DnaE intein* 介导的反式剪接在哺乳动物细胞将转录激活因子融合, 产生了较强的促进报告基因转录的活性^[23]。为了提高对目的蛋白剪接效率, 有时甚至引入多个与临近 *intein* 剪接位点的天然宿主蛋白相同的氨基酸残基, 由于剪接后这些氨基酸残基的保留, 由此带来的对目的蛋白生物学功能的影响和/或抗原性的改变都是潜在的不利因素。本研究为进一步运用 *intein* 的双 AAV 载体系统的甲型血友病动物模型体内基因治疗实验奠定了基础, 也对蛋白质反式剪接技术用于其他大基因的双载体转移, 如囊性纤维化治疗基因 CFTR 等具有借鉴意义。

参考文献

- 1 Saleh L, Perler F B. Protein splicing in *cis* and in *trans*. *Chem Rec*, 2006, 6(4): 183—193
- 2 Wu H, Xu M Q, Liu X Q. Protein trans-splicing and functional mini-inteins of a cyanobacterial *dnaB* intein. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1387(1-2): 422—432
- 3 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
- 4 Xu M Q, Perler F B. The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation. *EMBO J*, 1996, 15(19): 5146—5153
- 5 Gnatenko D V, Saneko E L, Jesty J, et al. Human factor VIII can be packaged and functionally expressed in an adeno-associated virus background: applicability to haemophilia A gene therapy. *Br J Haematol*, 1999, 104: 27—36
- 6 Sarkar R, Tetreault R, Gao G, et al. Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV 8 serotype. *Blood*, 2004, 103: 1253—1260
- 7 Sharma S S, Chong S, Harcum S W. Intein-mediated protein purification of fusion proteins expressed under high-cell density conditions in *E. coli*. *J Biotechnol*, 2006, 125(1): 48—56
- 8 Williams N K, Prosser P, Liepinsh E, et al. *In vivo* protein cyclization promoted by a circularly permuted *Synechocystis* sp. PCC6803 *DnaB* mini-intein. *J Biol Chem*, 2002, 277(10): 7790—7798
- 9 Ludwig C, Schwarzer D, Mootz H D. Interaction studies and alanine scanning analysis of a semi-synthetic split intein reveal thiazoline ring formation from an intermediate of the protein splicing reaction. *J Biol Chem*, 2008, 283(37): 25264—25272
- 10 Kaufman R J. Advances toward gene therapy for hemophilia at the millennium. *Hum Gene Ther*, 1999, 10: 2091—2107
- 11 Murphy S L, High K A. Gene therapy for haemophilia. *Br J of Haematol*, 2008, 140: 479—487
- 12 Scallan C D, Liu T, Parker A E, et al. Phenotypic correction of a mouse model of hemophilia A using AAV2 vectors encoding the heavy and light chains of FVIII. *Blood*, 2003, 102: 3919—3926
- 13 Burton M, Nakai H, Colosi P, et al. Coexpression of factor VIII heavy and light chain adeno-associated viral vectors produces biologically active protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 12725—12730
- 14 Mah C, Sarkar R, Zolotukhin I, et al. Dual vectors expressing murine factor VIII result in sustained correction of hemophilia A mice. *Hum Gene Ther*, 2003, 14: 143—152
- 15 Zhang K, Shen X, Wu J, et al. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell*, 2006, 124: 587—599

- 16 Chao H, Sun L, Bruce A, et al. Expression of human factor by splicing between dimerized AAV vectors. *Mol Ther*, 2002, 5(6): 716—722
- 17 Sun L, Li J, Xiao X. Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization. *Nat Med*, 2000, 6(5): 599—602
- 18 Yan Z, Zhang Y, Duan D, et al. *Trans*-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6716—6721
- 19 Sarkar R, Xiao W, Kazazian H H Jr. A single adeno-associated virus(AAV)-murine factor vector partially corrects the hemophilia A phenotype. *J Thromb Haemost*, 2003, 1: 220—226
- 20 Ishiwata A, Mimuro J, Kashiwakura Y, et al. Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor gene. *Thromb Res*, 2006, 118: 627—635
- 21 Scallan C D, Lillicrap D, Jiang H, et al. Sustained phenotypic correction of canine hemophilia A using an adeno-associated viral vector. *Blood*, 2003, 102(6): 2031—2037
- 22 Chen L X, Zhu F X, Li J, et al. The enhancing effects of the light chain on heavy chain secretion in split delivery of factor gene. *Mol Ther*, 2007, 15(10): 1856—1862
- 23 高元吉, 赵传科, 尹琪, 等. Split 内含肽高效介导转录激活因子的细胞融合. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2008, 38(8): 714—721