

内含肽介导的 Split-Cre 系统的构建

敖艺菲¹, 张琪², 陈昱僖³, 黄军就³, 文锦坤^{2*}

1 广东药科大学 生命科学与生物制药学院, 广东 广州 510006

2 广东药科大学 基础医学院, 广东 广州 510006

3 中山大学 生命科学学院, 广东 广州 510275

敖艺菲, 张琪, 陈昱僖, 黄军就, 文锦坤. 内含肽介导的 Split-Cre 系统的构建[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1490-1499.

AO Yifei, ZHANG Qi, CHEN Yuxi, HUANG Junjiu, WEN Jinkun. Construction of an intein-mediated Split-Cre system[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1490-1499.

摘 要: Split-Cre 系统是指被拆分为无活性的 N 端和 C 端这 2 个片段的 Cre 酶在一定条件下重组为有酶活性的全长 Cre 的基因工程工具。该系统常结合 LoxP 元件使用, 近年来在多基因操纵、多基因活性标记以及神经环路示踪等方面有着重要的应用。为了开发更高效的 Split-Cre 系统, 本研究利用海洋嗜热盐菌(*Rhodothermus marinus*, Rma)内含肽对 Cre 进行拆分, 在“红绿灯”报告细胞系中筛选出了能够高效介导 Cre 酶重组的 S102 拆分位点, 并且通过双腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)将 S102 Split-Cre 系统递送至小鼠体内, 证明了 Rma 内含肽介导的 S102 Split-Cre 系统在小鼠体内同样具有高效的活性。本研究为 Split-Cre 的基础和应用研究提供了可靠的参考。

关键词: Cre 酶; Split-Cre 系统; 海洋嗜热盐菌内含肽; 断裂内含肽

Construction of an intein-mediated Split-Cre system

AO Yifei¹, ZHANG Qi², CHEN Yuxi³, HUANG Junjiu³, WEN Jinkun^{2*}

1 School of Life Sciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong, China

2 School of Basic Medical Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong, China

3 School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, Guangdong, China

Abstract: The Split-Cre system consists of two inactive polypeptides: NCre and CCre, which can be recombined into an active full-length Cre under certain conditions. This system is typically used with LoxP. To develop an efficient Split-Cre system, this study used Rma intein

资助项目: 广州市科技计划(2023A04J1136); 广东药科大学高层次人才科研启动经费(51304043008)

This work was supported by the Science and Technology Project in Guangzhou (2023A04J1136) and the Starting Fund for High-level Talent Introduction into Guangdong Pharmaceutical University (51304043008).

*Corresponding author. E-mail: wenjinkun@gdpu.edu.cn

Received: 2024-07-25; Accepted: 2024-09-20; Published online: 2024-09-23

from *Rhodothermus marinus* to split Cre and screened out the split site S102 which could efficiently mediate the recombination of Cre in the “Traffic Light” reporter cell line. Moreover, the S102 Split-Cre system was delivered to mice by dual-adenovirus-associated virus (AAV), and it was demonstrated that the efficiency of the Rma intein-mediated S102 Split-Cre system was comparable to the full-length Cre in mice. This system lays a foundation for both basic and applied research on Split-Cre.

Keywords: Cre; Split-Cre; *Rhodothermus marinus* (Rma) intein; Split-intein

Cre 重组酶(cyclization recombination enzyme)即环化重组酶,是来源于噬菌体 P1 的一种蛋白酶,分子量约为 38 kDa,它可以识别并催化 2 个 LoxP 位点之间发生同源重组。Cre-LoxP 系统可以实现包括删除、插入、倒位及异位等多种类型的基因编辑^[1]。在基础研究领域,Cre-LoxP 系统主要被应用于动物的基因编辑,可以作为高效的条件性基因打靶工具,同时在建立诱导型基因敲除小鼠模型的过程中也得到广泛的应用^[2-3]。此外,Cre-LoxP 系统在标记激活基因和神经环路示踪等方面也有非常广泛的应用。近年来,研究人员把 Cre 酶进行拆分(Split-Cre),即将 Cre 一分为二后分别导入动物体内,用于小鼠体内的多基因操控、多基因激活细胞标记以及远距离神经环路示踪等^[4-7]。Split-Cre 技术的核心是利用拆分后的 Cre 酶在一定条件下在生物体内重组形成具有酶活性的全长 Cre,进而通过 LoxP 位点对基因进行修饰。

内含肽(intein)是存在于前体蛋白质内部的一段多肽序列,是蛋白质水平上的真核生物基因内含子。它通过催化蛋白质自剪接反应将自身序列从前体蛋白质中剪切出来,并将其两侧的蛋白质序列以肽键进行连接^[8]。断裂内含肽(Split-intein)由被分裂成 N 端(IntN)和 C 端(IntC)的 2 部分肽段组成。单独的断裂内含肽 IntN 或 IntC 不具有蛋白质自剪接功能,但是 N 端前体蛋白质中的 IntN 与 C 端前体蛋白质中的 IntC 可互相识别并以肽键结合,形成有功能的完整

内含肽^[9-10]。尽管以往也有许多研究将 Cre 基因进行拆分,例如通过亮氨酸拉链法^[4]等其他方法使其在表达后于细胞内重组,但 Split-intein 介导法由于其合成简便、剪接效率高且自剪切后不残留氨基酸序列等优势而被更加广泛地使用^[11]。

在目前的技术应用中,对 Cre 酶蛋白进行拆分的具体位点并没有统一的标准,也尚未见针对不同拆分位点的 Split-Cre 技术应用效果的分析研究。由于拆分后蛋白质分子结构的差异,在不同位点处进行拆分的 Split-Cre 系统的重组效率和作用效果也可能存在较大的区别。这种因素可能成为 Split-Cre 技术作为实验工具的一个潜在干扰变量,对实验结果造成严重的影响,甚至使 Split-Cre 技术不能发挥作用。

为了开发更高效的 Split-Cre 系统,本研究利用来源于海洋嗜热盐菌(*Rhodothermus marinus*, Rma)的内含肽对 Cre 的 T87、S102、S108 和 S110 位点进行拆分,并在“红绿灯”报告细胞系中筛选能够高效介导 Cre 酶重组的 S102 拆分位点,进一步通过双腺相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)将 S102 Split-Cre 系统递送至小鼠体内,以期证明 Rma 内含肽介导的 S102 Split-Cre 系统在小鼠体内同样具有高效的活性。

1 材料与方法

1.1 质粒载体构建

Cre 基因序列参考质粒 hGFAP-Cre (RRID: Addgene_40591), Rma 内含肽(来源于

Rhodothermus marinus DnaB) N 端(IntN)及 C 端序列(IntC)参考课题组早期发表的文章^[12]。Cre 全长基因, 以及断裂 Cre 和断裂内含肽的融合序列由广州艾基生物技术有限公司合成, 并通过 Age I (ThermoFisher Scientific 公司, FD1464) 和 EcoR I (ThermoFisher Scientific 公司, FD0274)酶切后克隆至 pAAV 骨架质粒(RRID: Addgene_61591)中。LoxP-DsRed-Stop-LoxP-GFP 序列参考质粒 CMV-LoxP-DsRed-LoxP-eGFP (RRID: Addgene_141148), 由广州艾基生物技术有限公司合成, 并通过 Not I (ThermoFisher Scientific 公司)和 BamH I (ThermoFisher Scientific 公司)酶切后克隆至 pLVX-EF1a-IRES-Puro 载体中。

1.2 细胞培养及建立报告细胞系

293T 细胞系(CRL-3216)购自 ATCC (<https://www.atcc.org/products/crl-3216>), 用含 10%胎牛血清(苏州双洙生物科技有限公司)的 DMEM 培养基(Corning)在 5% CO₂、37 °C 条件下进行常规培养。慢病毒包装步骤如下: 将状态良好的 293T 细胞按照 5×10⁵ 个每孔接种至 6 孔板中, 第 2 天当细胞密度达到 80%–90%时进行聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)转染。用 PEI 将病毒包装质粒 psPAX2 (RRID: Addgene_12260)、pMD2.G (RRID: Addgene_12259)以及穿梭质粒 pLVX-LoxP-DsRed-Stop-LoxP-GFP 共转染至细胞中, 分别于转染后 48 h 和 72 h 收集含慢病毒的细胞上清用于侵染细胞。将状态良好的 293T 细胞按照 1.5×10⁵ 个每孔接种至 6 孔板中, 接种第 2 天将收集的病毒上清加入细胞中进行侵染, 侵染后 72 h 加入终浓度为 2 µg/mL 的嘌呤霉素进行筛选, 连续筛选 7 d。使用倒置荧光显微镜(Olympus 公司)观察细胞荧光和拍照。

1.3 AAV 包装

将 293T 细胞按照 1×10⁷ 个/皿接种至 150 mm 培养皿中, 第 2 天当细胞密度达到 80%–90%时

进行转染。将 12 µg pAAV 表达质粒、20 µg pAAV2/8 (武汉森灵生物科技有限公司)稀释到 1 mL Opti-MEM (Gibco 公司)中。接着将 96 µg PEI 用 1 mL Opti-MEM 稀释后和质粒混匀。静置 15 min 后将 PEI 和质粒的混合物滴加至培养的细胞中进行转染。于转染后第 4 天收集培养基上清和细胞。培养基上清中加入上清 1/4 体积的 40% PEG 8000 (Sigma-Aldrich 公司)以沉淀病毒; 收集细胞则通过超声裂解释放细胞内的病毒。然后通过 OptiPrep™ 密度梯度培养基 (Sigma-Aldrich 公司)超速密度梯度离心法以及超滤管离心超滤法纯化和浓缩 AAV, 通过实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR)测定滴度后保存于 -80 °C 备用。用于测定 AAV 滴度的正向引物为: 5'-GGAA CCCCTAGTGATGGAGTT-3'; 反向引物为: 5'-C GGCCTCAGTGAGCGA-3'; 使用商业化的 AAV (武汉枢密脑科学技术有限公司)作为标准品。

1.4 小鼠尾静脉注射及组织取材

R26-CAG-LSL-tdTomato 小鼠购自上海南方模式生物科技股份有限公司, 并饲养于中山大学生命科学学院标准化建设和运行的 SPF 级动物房。生长环境为 12 h 光照并给予自由饮食。小鼠 6 周龄时, 将总量为 2×10¹¹ VG 的 AAV 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)稀释至 200 µL, 通过尾静脉注射至小鼠体内。注射后 1 周, 用 4%多聚甲醛对小鼠进行灌注固定, 固定后将肝脏取出置于 4%多聚甲醛在 4 °C 进行后固定以及保存。动物实验方案遵守相关实验动物福利规定, 并获得中山大学生命科学学院实验动物伦理委员会批准(2019-06-05)。

1.5 冰冻切片和细胞核染色

小鼠肝组织经 4%多聚甲醛固定过夜后, 将经过修整的组织浸泡在用 PBS 配制的 30%蔗糖 (Sigma-Aldrich 公司)中过夜进行脱水, 然后用

冰冻切片组织包埋剂(Sakura 公司)包埋后进行切片。在 -20°C 条件下进行切片,切片厚度为 $8\text{ }\mu\text{m}$,载玻片使用正电荷防脱载玻片(江苏世泰实验器材有限公司)。组织用 PBS 进行漂洗后,用 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的 DAPI (Sigma-Aldrich 公司)染色 10 min 以显示细胞核。切片用防淬灭封片剂(Vector 公司)封片后用荧光显微镜(Olympus 公司)进行拍照。

1.6 数据统计分析

采集的图片数据主要用 Photoshop 7.0 软件处理,统计数据用 GraphPad Prism 进行作图以及统计分析。计量数据采用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。流式细胞术实验结果的多组差异性采用单因素方差分析, $P<0.05$ 时认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 内含肽介导的 Split-Cre 双质粒系统的设计

为了探究用 Split-intein 拆分后的 Split-Cre

的重组效率,本研究将 Cre 重组酶拆分为 2 个片段,即 CreN 和 CreC,并分别在 CreN 的 C 端和 CreC 的 N 端上连接了海洋红嗜热盐菌(*Rhodothermus marinus*, Rma)的 DnaB 内含肽,该内含肽 N 端(IntN)和 C 端(IntC)分别包含 106 个和 51 个氨基酸。其介导蛋白进行反式剪接的规律是 IntC 连接的 C 端蛋白质序列的首位必须是含有巯基或羟基的氨基酸,例如半胱氨酸(Cys)、丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)。将 Cre 的编码序列拆分后,分别将 IntN 与 CreN、IntC 与 CreC 进行融合,然后将两个融合片段分别克隆至能够在真核生物细胞体内表达的 pAAV 质粒系统中。如图 1A 所示,将分别表达 CreN-IntN 和 IntC-CreC 的质粒同时导入细胞内,2 种表达产物中的内含肽会进行反式剪接将 CreN 和 CreC 重组成具有酶活性的全长 Cre。本研究根据 Cre 编码序列中段的氨基酸序列特点,选择了 T87、S102、S108 和 S110 这 4 个位点作为筛选断裂位点,选择 Q90 谷氨酸位点作为阴性对照位点(图 1B)。

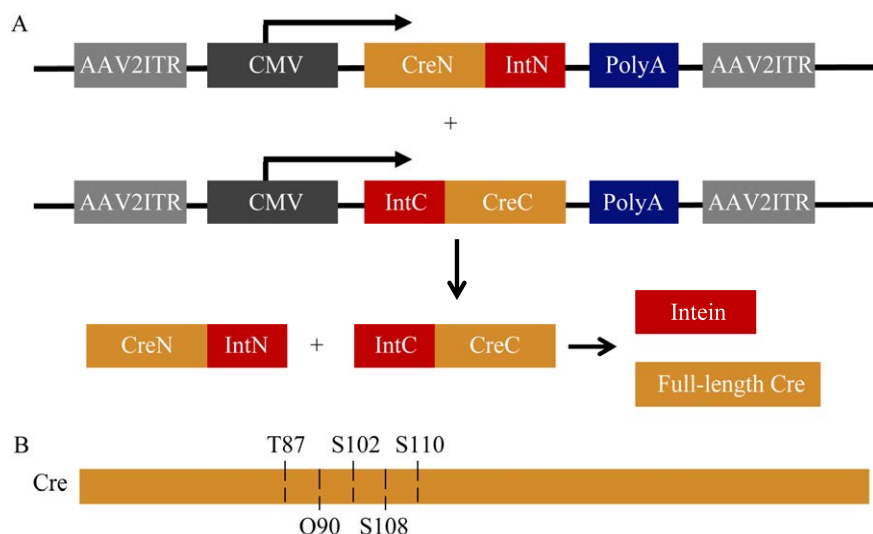


图 1 Split-intein 介导的 Split-Cre 双质粒系统的设计

Figure 1 Design of the Split-intein-mediated Split-Cre system. A: Schematic drawing of the structure of Split-intein-mediated Split-Cre system plasmids; B: Candidate split sites of Cre coding sequence.

2.2 “红绿灯”报告细胞系的构建

为了探究 *Cre* 基因的不同拆分位点在体外细胞实验的重组效率,本研究采用 293T 细胞构建了荧光表达报告细胞系。将“红绿灯”荧光元件 LoxP-DsRed-Stop-LoxP-GFP 克隆至慢病毒载体中,然后包装慢病毒并对 293T 细胞进行感染,感染后添加嘌呤霉素筛选以建立稳定表达该元件的细胞系(图 2A)。报告细胞系在正常培养条件下表达 DsRed 红色荧光, GFP 绿色荧光因为其上游存在 Stop 密码子而不能表达。当有

功能的 *Cre* 结合至 DsRed-Stop 两端的 LoxP 位点时,将从基因组中切除 LoxP-DsRed-Stop 序列,从而使细胞不表达 DsRed;同时,因为 Stop 密码子也一并被切除,下游的 GFP 可以启动表达,从而实现从红色荧光转变为绿色荧光的过程。接着将表达全长 *Cre* 的质粒通过 PEI 转染导入报告细胞系中,结果显示转染后 48 h 阴性对照组细胞只表达 DsRed 而不表达 GFP,而转染全长 *Cre* 质粒组中的细胞表达明显的 GFP。转染 *Cre* 组的细胞因为本底 DsRed 蛋白的存在,

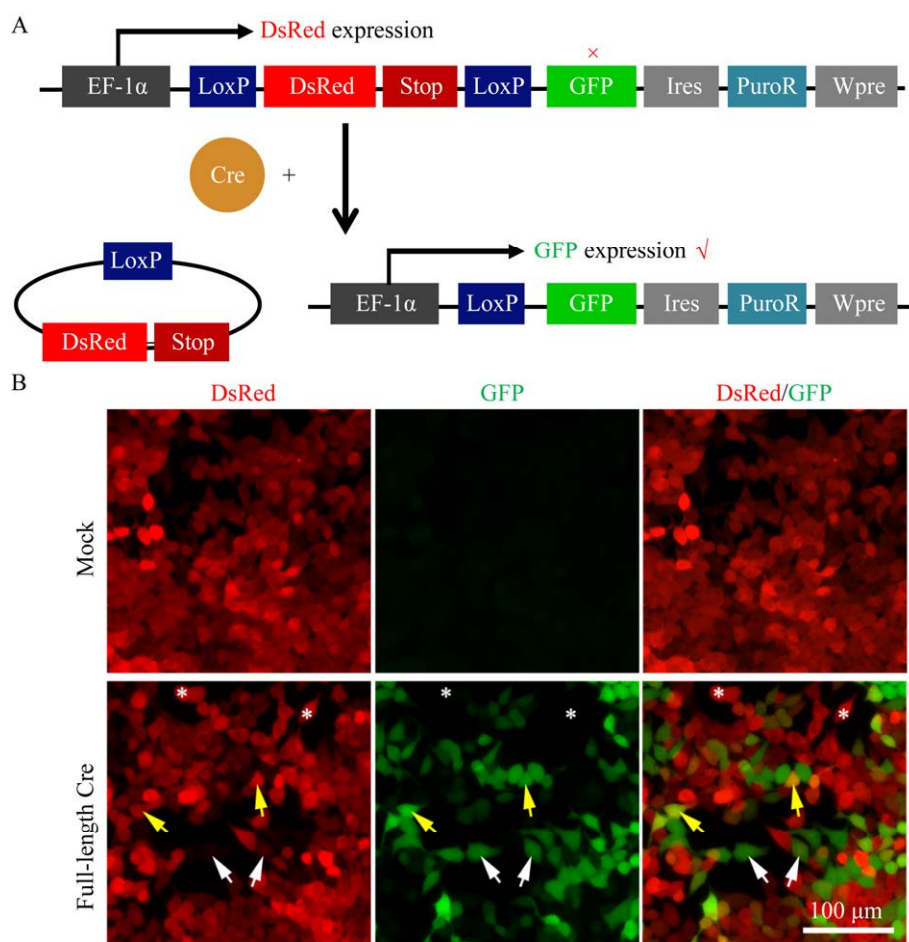


图 2 “红绿灯”报告细胞系的构建

Figure 2 Construction of “Traffic Light” reporter cell line. A: The structure of LoxP-DsRed-Stop-LoxP-GFP traffic lights reporter system; B: After transfection of full-length *Cre* coding sequence, reporter cells showed potent GFP signal. Yellow arrows indicate the GFP⁺ and DsRed⁺ cells, white arrows indicate the GFP⁺ and DsRed⁻ cells, and asterisks indicate GFP⁻ and DsRed⁺ cells.

表现为 GFP 和 DsRed 双阳性细胞(图 2B 黄色箭头);而部分细胞内的 DsRed 蛋白降解完全,则表现为 GFP 阳性而 DsRed 阴性(图 2B 白色箭头);同时,由于少数细胞未能转染成功而呈现 DsRed 阳性而 GFP 阴性结果(图 2B 星号)。上述结果表明本研究成功构建了能够通过荧光变化提示 Cre 酶功能的“红绿灯”报告细胞系。

2.3 体外实验比较不同拆分位点的 Split-Cre 重组效率

“红绿灯”报告细胞系构建成功后,将 Split-Cre 双质粒系统转染至该细胞系中,48 h 后观察细胞荧光表达,结果显示转染全长 Cre 的阳性对照组细胞表达明显的 GFP,而作为阴性对照的 Q90 拆分位点组中的细胞无 GFP 信号;在 4 个候选位点中,S102 组的细胞 GFP 表达最强,S108 和 S110 组中也有明显的 GFP 阳性细胞,而 T87 位点几乎无 GFP 阳性信号(图 3)。为了更准确地对 Split-Cre 的重组效率进行统计,使用流式细胞术对 DsRed 与 GFP 荧光信号进行检测。结果显示,S102 位点组中的 GFP

阳性细胞百分比与全长 Cre 组比较无显著性差异,证明 Rma 内含肽介导的 S102 Split-Cre 系统在体外培养细胞内的酶活性与全长 Cre 相当。尽管向 293T 细胞内导入有功能的 Cre 酶后细胞将由 DsRed 阳性转变为 GFP 阳性,但是因为原先存在于细胞内的红色荧光蛋白需要一定时间降解,所以绝大部分细胞都呈现 DsRed 和 GFP 双阳性。GFP 阳性与 DsRed 阴性的细胞是指 DsRed 蛋白已经完全降解的 GFP 阳性细胞,统计分析发现 S102 拆分位点组该部分细胞比例与全长 Cre 组比较无显著性差异,进一步证明 Rma 内含肽介导的 S102 Split-Cre 体外重组效率和全长 Cre 相当(图 4)。

2.4 小鼠体内实验验证 S102 Split-Cre 的重组活性

为了进一步检测 Rma 内含肽介导的 S102 Split-Cre 系统在动物体内的效率,用该系统的 2 种质粒包装 AAV,通过双 AAV 将 S102 Split-Cre 系统通过尾静脉注射的方式递送至 R26-CAG-LSL-tdTomato 转基因报告小鼠体内。该转基因

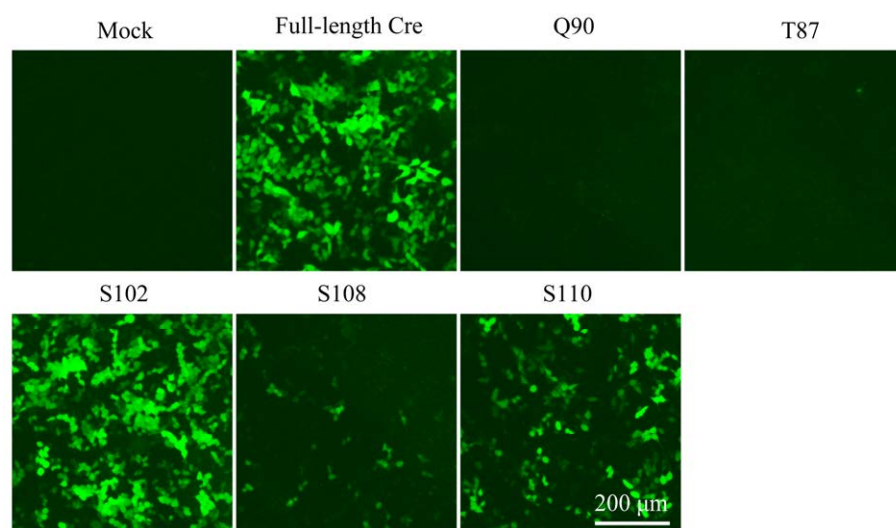


图 3 不同拆分位点 Split-Cre 体外重组效率荧光检测实验

Figure 3 *In vitro* fluorescence detection of Split-Cre recombination efficiency of different sites. Full-length Cre serves as positive control, while Q90 serves as negative control.

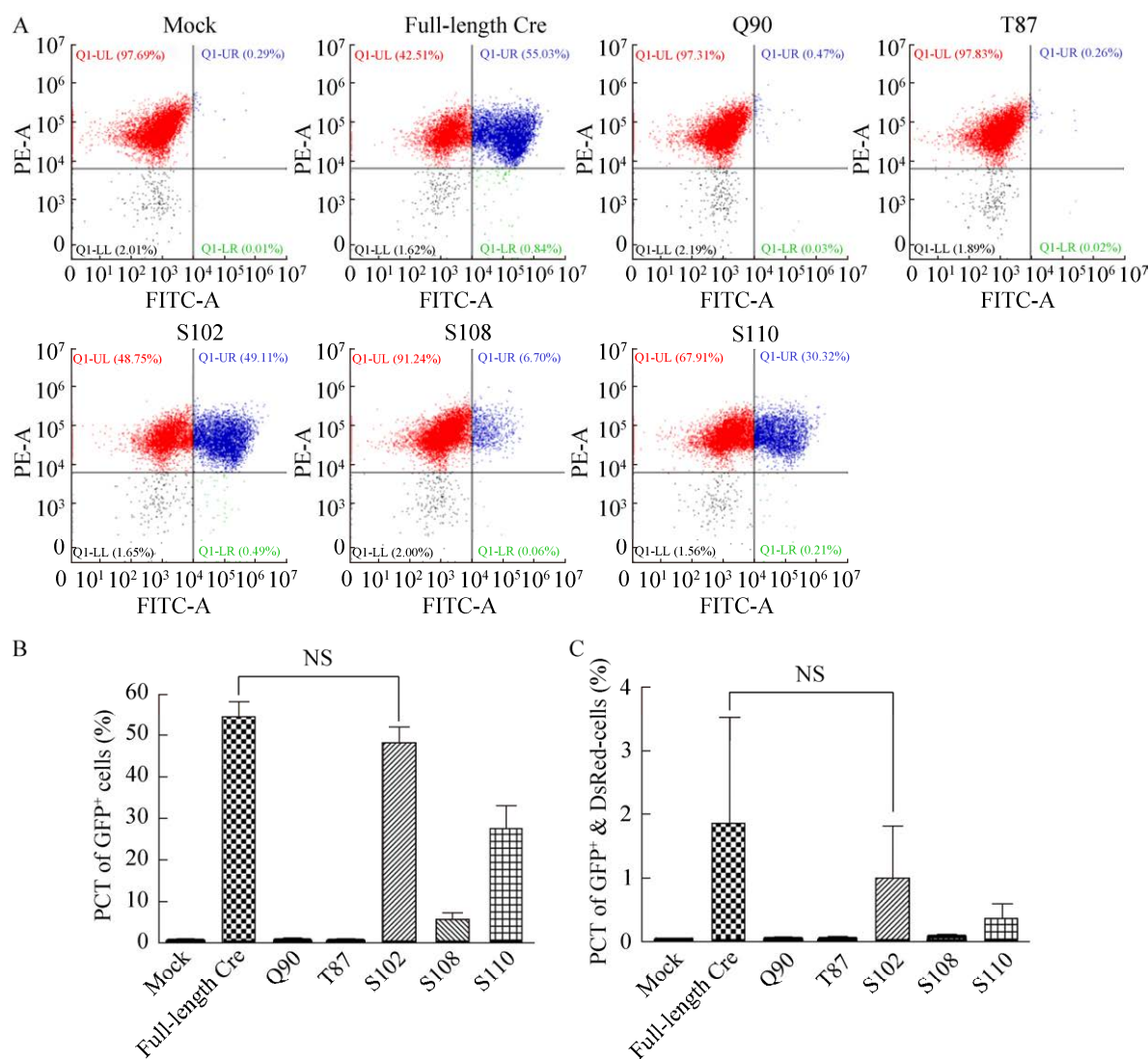


图 4 流式细胞术检测不同拆分位点的 Split-Cre 重组效率

Figure 4 FACS detection of Split-Cre recombination efficiency of different sites. A: Representative results of FACS detection; B: Statistical graph of percentage of GFP positive cells; C: Statistical graph of percentage of GFP positive and DsRed negative cells. NS: No significance.

小鼠基因组的 Rosa26 位点被插入了由 CAG 启动子启动表达的 LoxP-Stop-LoxP-tdTomato 序列, 在正常生长发育过程中该小鼠体内不表达 tdTomato 蛋白。而当其体内导入 Cre 酶后, Cre 酶通过 LoxP 位点将 Stop 元件切除后即可启动 tdTomato 表达(图 5A)。因为小鼠肝组织的取材和冰冻切片较易操作, 所以本研究选择肝脏作为体内验证实验的靶器官, 并选择了对肝脏具有亲嗜性的 AAV8。将表达

S102 Split-Cre 的 AAV 注射至小鼠体内 1 周后, 将小鼠肝脏取出并进行冰冻切片以观察 tdTomato 的表达情况, 结果发现 S102 Split-Cre 组小鼠肝脏表达广泛且明显的 tdTomato 红色荧光, 其介导 tdTomato 表达的效率与作为阳性对照的全长 Cre 组相当(图 5B)。实验结果表明 Rma 内含肽介导的 S102 Split-Cre 系统在小鼠体内能高效介导 Split-Cre 重组形成具有活性的全长 Cre。

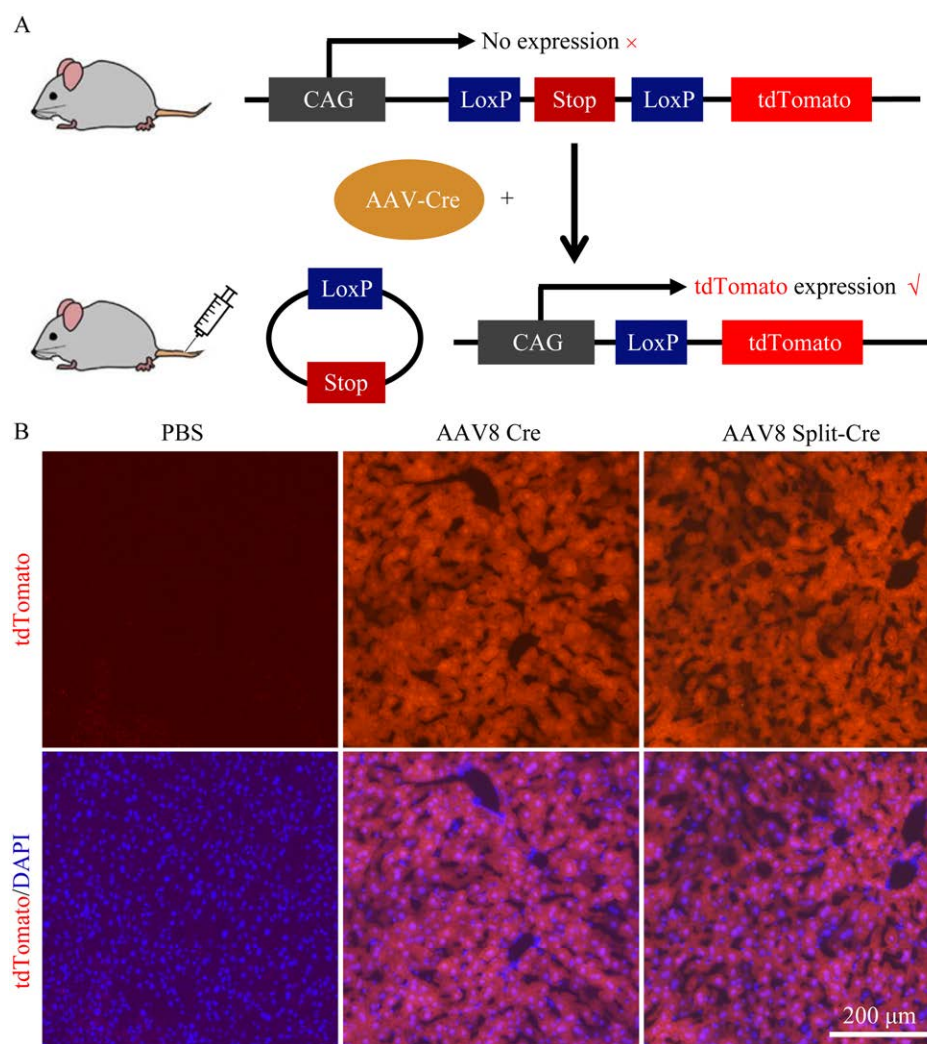


图5 体内验证 Rma 介导的 S102 Split-Cre 系统的重组活性

Figure 5 *In vivo* assay of Rma-mediated S102 Split-Cre system. A: The structure of reporting elements of R26-CAG-LSL-tdTomato transgenic reporter mouse; B: Fluorescent images of full-length Cre (AAV8 Cre) and S102 Split-Cre (AAV8 Split-Cre) treated livers of the reporter mice. DAPI was used for showing nucleus.

3 讨论与结论

在基因编辑工具愈发简便且应用越来越广的背景下, Cre 重组酶作为一种强大且稳定的基因工程工具, 其应用也越来越普遍。根据科学研究的需求, 研究人员开发出了 Split-Cre 系统。Split-Cre 系统既可通过与不同的启动子组合应用, 使 CreN 与 CreC 能够高选择性地特定细胞系中表达, 从而对特定细胞系进行标记^[13-14], 或作为检测多个基因是否同时表达的手段^[15],

也可以作为基因工程工具用于腺病毒载体扩容、双质粒转染细胞筛选等^[16-17]。除了在基础研究领域的应用, 目前 Split-Cre 技术也正在被探索应用于提高转基因食品的安全性方面。例如, 该技术可以利用花原基特异性启动子控制 Split-Cre 片段的表达, 在生殖生长阶段删除转基因作物种子和果实中的外源基因, 使转基因作物生产的种子和果实不含有转基因作物中的外源基因^[18]。因此, 开发高效稳定的 Split-Cre 系

统在基础研究和应用研究中均具有重要意义。

为了使 Split-Cre 实现高效重组,本研究利用 Split-intein 介导的蛋白质自剪接系统开发了一套从细胞实验到动物实验水平寻找最佳断裂位点的方法,并筛选出了一个在体内体外均能使 Split-Cre 进行高效重组的基因断裂位点。在本研究选取的 4 个位点之中,在 S102 位点处进行拆分的 Cre 酶显示出最高的重组成功率。由于本研究中设计的 4 个拆分位点在 Cre 编码序列中分布比较集中,因此不排除有其他更高重组效率的拆分位点的可能性。本研究目前通过间接的表征结果验证了这一现象,其背后的机理可能与 Cre 酶蛋白质结构特征和所选择的 Split-intein 的自剪接性质有关,进一步深入研究可以揭示 Cre 酶蛋白质结构特点与拆分位点相应的重组成功率之间的关系。无论是通过针对 Cre 蛋白结构的分析揭示拆分位点与相应重组成功率之间关联的背后原理,进而得到重组成功率最高的拆分位点,还是通过不同种类的 Split-intein 的自剪接特性进行设计,均可在本研究的基础上进一步提高 Split-Cre 系统的效率,为 Split-Cre 技术的使用提供一个最佳的拆分方案。

综上所述,本研究开发了一套在细胞水平和动物水平均能高效表达的内含肽介导的 Split-Cre 系统,为遗传细胞谱系示踪和精准转基因等基础和应用研究提供了新的有力工具。

作者贡献声明

敖艺菲:实验操作、初稿写作;张琪:实验操作、数据统计;陈昱僊:提供材料、实验指导;黄军就:提供材料、稿件润色修改;文锦坤:方案设计、实验操作、经费支持、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 孔梓宇, 柳毅, 汪晖. Cre-LoxP 条件性基因敲除的实际应用策略[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2022, 38(9): 1125-1132.
KONG ZY, LIU Y, WANG H. Practical application strategies of Cre-LoxP conditional gene knockout[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2022, 38(9): 1125-1132 (in Chinese).
- [2] 杨熙玥, 周永婷, 叶莱英, 朱蕾. 基于 Cre-LoxP 系统构建一种新的时间特异性突变 NLRP3 转基因小鼠模型[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(3): 594-598.
YANG XY, ZHOU YT, YE CY, ZHU L. Construction of a novel time-specific NLRP3 transgenic mouse model by Cre-LoxP system[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2023, 39(3): 594-598 (in Chinese).
- [3] 熊锐, 李国瑞, 邹诗施, 李宁, 耿庆. 利用 Cre-LoxP 系统构建 AT2 细胞特异性敲除 HDAC3 基因小鼠[J]. 医学研究杂志, 2023, 52(2): 24-29, 148.
XIONG R, LI GR, ZOU SS, LI N, GENG Q. Establishment of mouse model with AT2-specific HDAC3 gene knockout by Cre-LoxP system[J]. Journal of Medical Research, 2023, 52(2): 24-29, 148 (in Chinese).
- [4] HIRRLINGER J, SCHELLER A, HIRRLINGER PG, KELLERT B, TANG WN, WEHR MC, GOEBBELS S, REICHENBACH A, SPRENGEL R, ROSSNER MJ, KIRCHHOFF F. Split-Cre complementation indicates coincident activity of different genes *in vivo*[J]. PLoS One, 2009, 4(1): e4286.
- [5] GAUTAM M, YAMADA A, YAMADA AI, WU QX, KRIDSADA K, LING J, YU HS, DONG P, MA MH, GU JG, LUO WQ. Distinct local and global functions of mouse A β low-threshold mechanoreceptors in mechanical nociception[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 2911.
- [6] KHOO ATT, KIM PJ, KIM HM, JE HS. Neural circuit analysis using a novel intersectional split intein-mediated split-Cre recombinase system[J]. Molecular Brain, 2020, 13(1): 101.
- [7] KIM YE, KIM S, KIM IH. Neural circuit-specific gene manipulation in mouse brain *in vivo* using split-intein-mediated split-Cre system[J]. STAR Protocols, 2022, 3(4): 101807.
- [8] 宋慧玲. 新型断裂蛋白质内含子介导的蛋白质反式剪接系统的建立及应用[D]. 上海: 东华大学, 2014.
SONG HL. Novel Split-intein based protein trans-splicing system and its applications[D]. Shanghai: Donghua University, 2014 (in Chinese).
- [9] GRAMESPACHER JA, STEVENS AJ, THOMPSON RE, MUIR TW. Improved protein splicing using

- embedded split inteins[J]. Protein Science, 2018, 27(3): 614-619.
- [10] LI YF. Split-inteins and their bioapplications[J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(11): 2121-2137.
- [11] 韩东阳, 任宇祥, 杨子毅, 黄赫, 郑基深. 分裂内含肽: 一种高效的无痕多肽片段连接工具[J]. 高等学校化学学报, 2023, 44(10): 52-69.
HAN DY, REN YX, YANG ZY, HUANG H, ZHENG JS. Split intein: a versatile tool for traceless peptide segment ligation[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2023, 44(10): 52-69 (in Chinese).
- [12] CHEN YX, ZHI SY, LIU WL, WEN JK, HU SH, CAO TQ, SUN HW, LI Y, HUANG L, LIU YZ, LIANG PP, HUANG JJ. Development of highly efficient dual-AAV split adenosine base editor for *in vivo* gene therapy[J]. Small Methods, 2020, 4(9): 2000309.
- [13] WU JL, WANG MY, YANG XP, YI CW, JIANG J, YU YH, YE HF. A non-invasive far-red light-induced split-Cre recombinase system for controllable genome engineering in mice[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 3708.
- [14] WANG P, CHEN TR, SAKURAI K, HAN BX, HE ZG, FENG GP, WANG F. Intersectional Cre driver lines generated using split-intein mediated split-Cre reconstitution[J]. Scientific Reports, 2012, 2(1): 497.
- [15] WEI XD, ZHANG JH, CUI J, XU W, ZHOU XY, MA J. A Split-Cre system designed to detect simultaneous expression of two genes based on SpyTag/SpyCatcher conjugation and Split-GFP dimerization[J]. Journal of Biological Chemistry, 2021, 297(4): 101119.
- [16] GONZALEZ-APARICIO M, BUNUALES M, de LANDAZURI IO, PRIETO J, HERNANDEZ-ALCOCEBA R. Application of a split-Cre system for high-capacity adenoviral vector amplification[J]. Biotechnology Journal, 2023, 18(3): e2200227.
- [17] PALANISAMY N, DEGEN AN, MORATH A, BALLESTIN BALLESTIN J, JURASKE C, ÖZTÜRK MA, SPRENGER GA, YOUN JW, SCHAMEL WW, Di VENTURA B. Split intein-mediated selection of cells containing two plasmids using a single antibiotic[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 4967.
- [18] HE YR, XU LZ, PENG AH, LEI TG, LI Q, YAO LX, JIANG GJ, CHEN SC, LI ZG, ZOU XP. Production of marker-free transgenic plants from mature tissues of navel orange using a Cre/loxP site-recombination system[J]. Horticultural Plant Journal, 2023, 9(3): 473-480.