

## TMD2 前断裂 CFTR 翻译后的连接及氯离子通道功能

朱甫祥<sup>1</sup>, 官贤弟<sup>2</sup>, 刘泽隆<sup>1</sup>, 杨树德<sup>1</sup>, 屈慧鸽<sup>1</sup>, 迟晓艳<sup>1</sup>

1 鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025

2 Department of Physiology & Biophysics, Medical college of Dalhousie University, Halifax B3H 4H7, Canada

**摘要:** *CFTR* 基因突变导致一种常染色体隐性遗传疾病——囊性纤维化 (CF)。利用 split *Ssp* DnaB intein 的蛋白质反式剪接技术的真核细胞双载体转 *CFTR* 基因, 旨在研究翻译后水平 *CFTR* 的连接, 以及由其建立的氯离子通道功能。于 *CFTR* 膜内第 2 个跨膜结构域 (TMD2) 前的 Glu<sup>838</sup> 密码子后将其 cDNA 断裂为 N 端和 C 端两部分, 与具有蛋白质反式剪接作用的 split *Ssp* DnaB intein 编码序列融合, 分别插入到载体 pEGFP-N1 和 pEYFP-N1, 构建一对真核表达载体 pEGFP-NInt 和 pEYFP-IntC。用脂质体将这对载体共转染至幼年仓鼠肾细胞 (BHK), 瞬时表达实验用 Western blotting 观察 *CFTR* 蛋白质的连接, 并用膜片钳技术记录 Cl<sup>-</sup> 通道电流。结果显示, 基因共转染细胞呈现完整的 *CFTR* 蛋白条带, 膜片钳记录到全细胞 Cl<sup>-</sup> 电流和单个 Cl<sup>-</sup> 通道开放活性。结果表明 split *Ssp* DnaB intein 的蛋白质反式剪接技术可用于双载体共转移 *CFTR* 基因, 为 CF 基因治疗应用双腺相关病毒载体 (AAV) 转运 *CFTR* 基因, 克服 AAV 的容量限制提供了依据。

**关键词:** *CFTR*, Cl<sup>-</sup> 通道, split *Ssp* DnaB intein, 蛋白质反式剪接, 双载体基因转移

## Post-translational ligation of split *CFTR* severed before TMD2 and its chloride channel function

Fuxiang Zhu<sup>1</sup>, Xiandi Gong<sup>2</sup>, Zelong Liu<sup>1</sup>, Shude Yang<sup>1</sup>, Huige Qu<sup>1</sup>, and Xiaoyan Chi<sup>1</sup>

1 College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China

2 Department of Physiology & Biophysics, Medical College of Dalhousie University, Halifax B3H 4H7, Canada

**Abstract:** Mutations of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene leads to cystic fibrosis, an autosomal recessive genetic disorder affecting a number of organs including the lung airways, pancreas and sweat glands. In order to investigate the post-translational ligation of *CFTR* with reconstructed functional chloride ion channel and the split *Ssp* DnaB intein-mediated protein *trans*-splicing was explored to co-deliver *CFTR* gene into eukaryotic cells with two vectors. The human *CFTR* cDNA was split after Glu<sup>838</sup> codon before the second transmembrane dome (TMD2) into two halves of N- and C-parts and fused with the coding sequences of split *Ssp* DnaB intein. Pair of eukaryotic expression vectors pEGFP-NInt and pEYFP-IntC were constructed by inserting them into the vectors pEGFP-N1 and pEYFP-N1 respectively. The transient expression was carried out for observing the ligation of *CFTR* by Western blotting and recording the chloride current by patch clamps when cotransfection of the pair of vectors into baby hamster kidney (BHK) cells. The results showed that an obvious protein band proven to be ligated intact *CFTR* can be seen and a

**Received:** February 24, 2010; **Accepted:** April 9, 2010

**Supported by:** Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2010CM061), Science and Technology Program of Yantai City (No. 2008152), Scientific Research Foundation from Education Ministry for the Returned Overseas Chinese Scholars (No. 2007[1108]), Scientific Research Funds of Ludong University (No. LZ20083305).

**Corresponding author:** Fuxiang Zhu. Tel/Fax: +86-535-6693825; E-mail: fuxiangmail@163.com

山东省自然科学基金 (No. ZR2010CM061), 烟台市科技计划项目 (No. 2008152), 教育部留学回国人员科研启动基金 (No. 2007[1108]), 鲁东大学科研经费 (No. LZ20083305) 资助。

higher chloride current and activity of chloride channel were recorded after cotransfection. These data demonstrated that split *Ssp* DnaB intein could be used as a strategy in delivering *CFTR* gene by two vectors providing evidence for application of dual adeno-associated virus (AAV) vectors to overcome the limitation of packaging size in cystic fibrosis gene therapy.

**Keywords:** CFTR, chloride ion channel, split *Ssp* DnaB intein, protein *trans*-splicing, dual-vector gene delivering

CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 为 cAMP 依赖性氯离子 ( $\text{Cl}^-$ ) 通道蛋白, 由 5 个结构域组成: 2 个跨膜结构域 (Transmembrane domains, TMDs)、2 个核苷酸结合域 (Nucleotide-binding domains, NBDs) 和 1 个调节域 (Regulatory domain, RD)。囊性纤维化 (Cystic fibrosis, CF) 是由该基因突变引起的一种常染色体隐性遗传疾病<sup>[1]</sup>。属于单基因突变的该病是体细胞基因治疗的适应症。因此自 1989 年 *CFTR* 基因的成功克隆, 对 CF 的基因治疗研究成为热点。基因治疗中合适的基因运载体系是关键, 在众多已开发的载体系统中, 腺辅助病毒 (Adeno-associated viruses, AAV) 由于非致病性、可感染非增殖期细胞、定点整合宿主基因组使转基因稳定表达且安全性高以及不会引起宿主免疫反应等优点, 为基因治疗的理想载体, 而且 AAV5 具有靶向感染呼吸道上皮细胞的特性<sup>[2]</sup>, 使其特别适合 *CFTR* 基因的呼吸道上皮细胞的定向转移。*CFTR* 的编码序列长 4.4 kb, 加上基因调控序列, 难以为包装容量上限为 4.7 kb 的 AAV 所承载。Intein 的蛋白质反式剪接作用为双 AAV 载体转运 *CFTR* 基因提供了一种分子手段。Intein 为包埋于原核生物和单细胞真核生物某些蛋白前体中的一段多肽序列, 翻译后通过蛋白质剪接反应被切除, 同时两侧的宿主蛋白以肽键相连<sup>[3]</sup>。蛋白质剪接分顺式和反式两种形式。对 split *Ssp* DnaB intein 的研究表明其可介导非天然宿主蛋白的反式剪接反应<sup>[4]</sup>。不同的 intein 之间氨基酸序列同源性较低, 只在剪接部位存在直接参与剪接反应的保守氨基酸残基<sup>[5]</sup>。

本文选择于 *CFTR* cDNA 紧邻 NBD2 的 Ser<sup>839</sup> 密码子前将其断裂成两部分, 分别与 split *Ssp* DnaB intein 基因融合, 构建一对真核表达载体, 共转染培养的真核细胞, 瞬时表达观察 *CFTR* 的剪接, 膜片钳记录细胞的  $\text{Cl}^-$  电流和通道开放活性, 为运用双 AAV 载体转 *CFTR* 基因的 CF 基因治疗研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

质粒 pMST (含 split *Ssp* DnaB intein 编码序列) 由加拿大 Dalhousie 大学医学院 Paul Liu 教授实验室提供。含 *CFTR* 的质粒 pIRES2-EGFP-*CFTR* 和幼年仓鼠肾脏细胞 (Baby hamster kidney, BHK) 由加拿大 Dalhousie 大学医学院 Paul Linsdell 教授提供。绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFP-N1 和黄色荧光蛋白表达质粒 EYFP-N1 购自 Clontech 公司。内切酶、DNA 连接酶试剂盒为 New England Biolabs 公司产品。高保真 *Pfu* Turbo DNA 聚合酶购自 Stratagene 公司。Gel Extraction Kit、PCR Purification Kit、Spin Miniprep Kit 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。山羊抗人 *CFTR* 的 N 端和 C 端抗体 N-20 和 C-19 购自 Santa Cruz 公司。兔抗山羊 HRP-二抗和 ECL plus Western Blotting Detection 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech (GE) 公司。其他试剂均为国产或进口分析纯, 电生理实验所用试剂除注明外均为 Sigma 公司产品。

### 1.2 真核表达载体的构建

考虑到 intein 下游剪接位点附近氨基酸组成对剪接反应的影响, 选择于 *CFTR* 的 TMD2 后与 *Ssp* DnaB intein 天然宿主蛋白具有 2 个相同残基的 Ser<sup>839</sup> Ile<sup>840</sup> 前断裂 *CFTR*。用 *Pfu* Turbo DNA 聚合酶、引物 P1 和 P2 进行 PCR 从 pIRES2-EGFP-*CFTR* 扩增 *CFTR* 的 N 端编码序列, 用引物 P3 和 P4 从 pMST 扩增 split *Ssp* DnaB intein N 端 106 个氨基酸 (IntN) 的编码序列, 分别用 *Pst* I/*Nsi* I 和 *Nsi* I/*Bam*HI 酶切 2 种 PCR 产物, 与 *Eco*R I/*Bam*HI 酶切的载体 pEGFP-N1 连接, 得到 *CFTR* 的 N 端与 IntN 的融合表达质粒 pEGFP-NInt。用 P5、P6 和 P7、P8 引物对分别从 pMST 和 pIRES2-EGFP-*CFTR* 扩增 split *Ssp*

DnaB intein 的 C 端 48 个氨基酸 (IntC) 的编码序列和 CFTR 的 C 端编码序列, 分别用 *EcoR I/ApaL I* 和 *ApaL I/BamH I* 酶切, 与 *EcoR I/BamH I* 酶切的载体 pEYFP-N1 连接, 得到 IntC 与 CFTR 的 C 端的融合表达质粒 pEYFP-IntC。同时构建 CFTR 的 N 端和 C 端表达载体 pEGFP-N 和 pEYFP-C 以及全长 CFTR 的表达载体 pEGFP-CFTR 作为对照, 构建作为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

Table 1 Primers and sequences used in vector construction

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Cutting site
P1	AAA <u>ACTGCAG</u> ACCATGCAGAG GTCGCCTCT	<i>Pst I</i>
P2	CCAATGCATTCATATCATCAA AAAGGCACTC	<i>Nsi I</i>
P3	CCAATGCATCAGTGGAGATAGT TTGATC	<i>Nsi I</i>
P4	CGGGATCCCGCAATTGTAAAGA GGAGCTTCTAG	<i>BamH I</i>
P5	CGGAATTCACCATGTCACCAGA AATAGAAAAGTTGT	<i>EcoR I</i>
P6	CGGTGCACAATGATGTCATTGG CGACAAAG	<i>ApaL I</i>
P7	CGGTGCACAACAGCATAACCAGC AGTGACTACATG	<i>ApaL I</i>
P8	CGGGATCCCGAAGCCTTGTATCT TGCACCTCTC	<i>BamH I</i>

### 1.3 细胞培养及基因转染

BHK 细胞于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 培养箱以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液贴壁培养。转染前 1 天用胰蛋白酶消化分散细胞, 按每孔 5×10<sup>5</sup> 个细胞于 2 mL DMEM 培养液将细胞接种于含盖玻片的 6 孔培养板, 待细胞生长融合至 80% 以上时, 用 Lipofectamine 2000 脂质体按试剂盒说明书进行转染, 将 2 种质粒 pEGFP-NInt 和 pEYFP-IntC 按 1:1 比率各 4 μg 混合稀释于 250 μL 的 Opti-MEM 培养液, 与室温放置 5 min 的含 20 μL 脂质体的 250 μL Opti-MEM 培养液混合后继续室温放置 20 min, 共转染 BHK 细胞, 同时, 用 4 μg 的 pEGFP-N 和 pEYFP-C 共转染并分别单独转染 BHK 细胞。用 4 μg 的 pEGFP-CFTR 作为阳性对照、4 μg 的质粒载体 pEGFP-N1 作为阴性对照 (Mock) 转染 BHK 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, 收集细胞用于 Western blotting 检测。用作电生理记

录的细胞基因转染于底部放置盖玻片的培养板, 使细胞贴壁于玻片生长。

### 1.4 Western blotting 观察 CFTR 蛋白的剪接

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 μg 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% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h, 用 1:1 000 稀释的 CFTR 抗体 N-20 或 C-19 于 37℃ 轻摇孵育 1 h, 用 HRP-抗山羊血清 37℃ 轻摇孵育 1 h, ECL plus 法曝光 X 胶片。

### 1.5 膜片钳记录

荧光显微镜下观察于盖玻片贴壁生长的转基因 BHK 细胞, 根据转基因所带有的荧光蛋白基因的表达, 选择荧光强度高且在细胞膜上表达的细胞进行记录。全细胞膜片钳记录参照笔者以前报道的方法进行<sup>[6]</sup>, 细胞浴池液 (细胞外液) 的成分及浓度为: 140 mmol/L HCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L *N*-羟甲基-2-氨基乙醇磺酸 (TES); 电极液 (细胞内液) 的成分及浓度为: 110 mmol/L 天冬氨酸, 30 mmol/L HCl, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L TES, 1 mmol/L MgATP, 0.1 mmol/L EGTA。两种液体均用 *N*-甲基-D-葡萄糖胺调至 pH 7.4。用电极吸附细胞获得全细胞构型后, 记录背景电流, 然后滴加以下混合液至细胞浴池中激活 CFTR 通道蛋白: 2 μmol/L 毛喉素, 100 μmol/L 8-(4-氯酚硫-3', 5'-环腺苷酸 (pCPT-cAMP), 100 μmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)。单通道膜片钳记录参照笔者以前报道的方法进行<sup>[7]</sup>。电极液 (细胞外液) 和细胞浴池液 (细胞内液) 的成分和浓度为: 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L TES, 用 NaOH 调 pH 至 7.4。形成内面向外式 (Inside-out membrane patches) 记录结构后, 在细胞浴液滴中加以下溶液激活 CFTR 通道蛋白: 蛋白激酶 A 催化亚基 (PKA, 80~120 nmol/L, Promega 公司产品) 和 1 mmol/L MgATP。

细胞电流以 2 kHz (全细胞) 或 50 Hz (单通道) 的低频过滤, 用 pCLAMP8 软件 (Axon instrument) 进行分析。用 pCLAMP8 软件测得的平均全细胞电容为 (25.9±1.7) pF (*n*=19)。

## 1.6 数据处理及统计分析

实验数据以平均值±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用  $t$  检验进行差异显著性比较,  $P < 0.05$  差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 断裂 CFTR 基因与 intein 融合真核表达载体的构建

Intein 剪接反应除了其本身剪接位点的保守性氨基酸参与, 还有赖于紧临下游剪接位点的宿主蛋白的保守性氨基酸残基, 即 Ser、Cys 或 Thr, 选择与 *Ssp* DnaB intein 下游天然宿主蛋白第 1 个残基相同的 Ser<sup>839</sup> 前断裂 CFTR, 分别与 split *Ssp* DnaB intein 融合, 插入 pEGFP-N1 和 pEYFP-N1, 得到 1 对融合 intein 的 CFTR 两段基因并于 3' 末端分别带有绿色荧光蛋白和黄色荧光蛋白基因的真核表达载体 pEGFP-NInt 和 pEYFP-IntC, 如图 1 所示。所构建的载体经酶切电泳进行鉴定并通过 DNA 测序进行确认。

### 2.2 CFTR 蛋白表达和剪接的 Western blotting 结果

细胞总蛋白 Western blotting 分别用 CFTR 的 N 末端抗体 (N-20) 和 C 末端抗 (C-19) 体检测结果

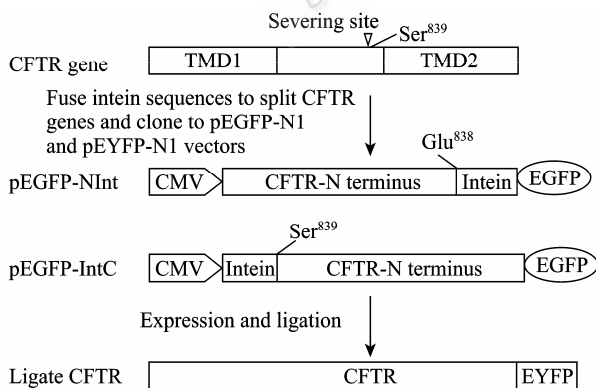


图 1 断裂 CFTR 基因与 intein 融合重组基因结构及剪接示意图

Fig. 1 Schematic representation of recombinant intein-fused split CFTR genes and splicing. The split CFTR half genes severed between Glu<sup>838</sup>-Ser<sup>839</sup> were fused with intein respectively. These two fused genes are inserted into pEGFP and pEYFP vectors separately under the control of CMV promoter/enhancer with EGFP and EYFP following their C termini. The separately expressed CFTR half proteins would be ligated to an intact CFTR protein under the intein-mediated protein trans-splicing.

显示, 转染阳性对照质粒 pEGFP-CFTR 的 BHK 细胞可见明显融合有 EGFP 的 CFTR 蛋白条带 (195 kDa), Mock 转染细胞未见 CFTR 蛋白条带, 共转染 pEGFP-NInt 和 pEYFP-IntC 的细胞用两种抗体均可见一明显的与阳性对照同样大小的剪接形成的 CFTR 蛋白条带, 同时可见未完全剪接的 intein 融合蛋白前体 NInt 和 IntC。共转染 pEGFP-N 和 pEYFP-C 的细胞只可见分别表达的 CFTR 的 N 端蛋白和 C 端蛋白, 另外, 单独转染 pEGFP-N 或 pEYFP-C 的细胞可见表达的 CFTR 的 N 端蛋白或 C 端蛋白 (图 2)。

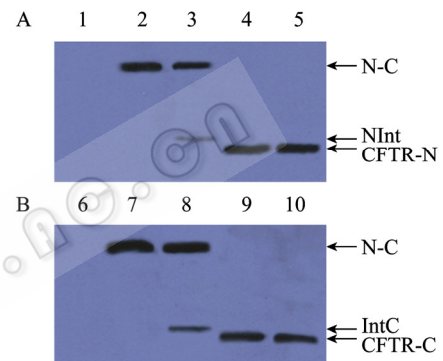


图 2 检测 CFTR 表达和剪接的 Western blotting 印迹结果  
Fig. 2 Western blotting assay of CFTR expression and splicing. (A, B) The antibodies against CFTR N-terminus (N-20) and C-terminus (C-19) were used as probes respectively. 1 and 6: mock control; 2 and 7: positive control of wild type CFTR gene transfection; 3 and 8: NInt and IntC co-transfection; 4 and 9: N and C co-transfection; 5: N transfection alone; 10: C transfection alone. N-C: ligated CFTR by protein trans-splicing; NInt and IntC: non-spliced precursor peptides; CFTR-N and CFTR-C: expressed CFTR N and C termini.

### 2.3 电生理记录结果

全细胞电压钳模式下记录的 Cl<sup>-</sup> 电流显示, 阳性对照转染 wtCFTR 的 BHK 细胞经 cAMP 激活后, 记录到较大的 Cl<sup>-</sup> 电流, 而 Mock 转染细胞未记录到 Cl<sup>-</sup> 电流, NInt+IntC 共转染 BHK 细胞可记录到明显的 Cl<sup>-</sup> 电流, 表明 intein 的蛋白质反式剪接产生的完整 CFTR 蛋白具有与 wtCFTR 相似的 Cl<sup>-</sup> 通道功能, 而 N+C 共转染细胞也可记录到低水平的 Cl<sup>-</sup> 电流, 而单独转染 N 或 C 端基因的细胞未记录到 Cl<sup>-</sup> 电流, 说明两段 CFTR 蛋白尽管没有 intein 介导的共价连接, 也可通过某种机制形成一定的 Cl<sup>-</sup> 通道功能 (图 3)。当实验电压为 -60 mV 时, 根据细胞膜电容进行

标准化处理得到的电流密度 (用 pA/pF 表示) (每组  $n=4$ ), 阳性对照转染细胞 (*wtCFTR*) 经 cAMP 激活后的电流密度为  $495\pm 76$ , *NInt+IntC* 共转染细胞为  $445\pm 68$ , 二者无显著差异 ( $P>0.05$ ), 而 *N+C* 共转染细胞为  $225\pm 34$ , 与 *NInt+IntC* 共转染细胞相比明显要小 ( $P<0.05$ ) (图 4)。

内面向外式 (Inside-out) 单通道膜片钳记录结果显示, 共转染 *NInt+IntC* 的 BHK 细胞表现的 PKA 和 ATP 依赖性  $\text{Cl}^-$  通道开放活性类似于 *wtCFTR* 基因转染细胞 (图 5A); 据此记录计算的 *NInt+IntC* 共转染细胞的平均通道开放概率为  $0.39\pm 0.05$ , 转 *wtCFTR* 为  $0.42\pm 0.03$ , 二者相比差别无显著意义 ( $P>0.05$ ), 而明显高于 *N+C* 共转染细胞的  $0.098\pm 0.01$  ( $P<0.01$ ) (图 5B)。

### 3 讨论

通过于 Ser<sup>839</sup> 前断裂的 CFTR 与 split *Ssp DnaB* intein 融合的双载体培养的 BHK 细胞基因共转染实验, 翻译后 intein 的蛋白质反式剪接作用使分别表达的 CFTR 两段多肽连接成完整的 CFTR 蛋白, 并且较好地恢复了  $\text{Cl}^-$  通道功能, 表明 intein 可作为一种技术手段进行双载体系统的 *CFTR* 基因转移。Intein 的蛋白质剪接作用包括 4 步反应, 直接参与剪接反应的保守性氨基酸残基位于 intein 与宿主蛋白的交界处, 即上游剪接位点 intein 的第 1 个残基、下游剪接位点的 intein 的最后 1 个残基和与之紧邻的宿主蛋白首个残基, 蛋白质剪接的特点在于其不依赖细胞机制, 也不需要消耗能量, 是 1 个完全自

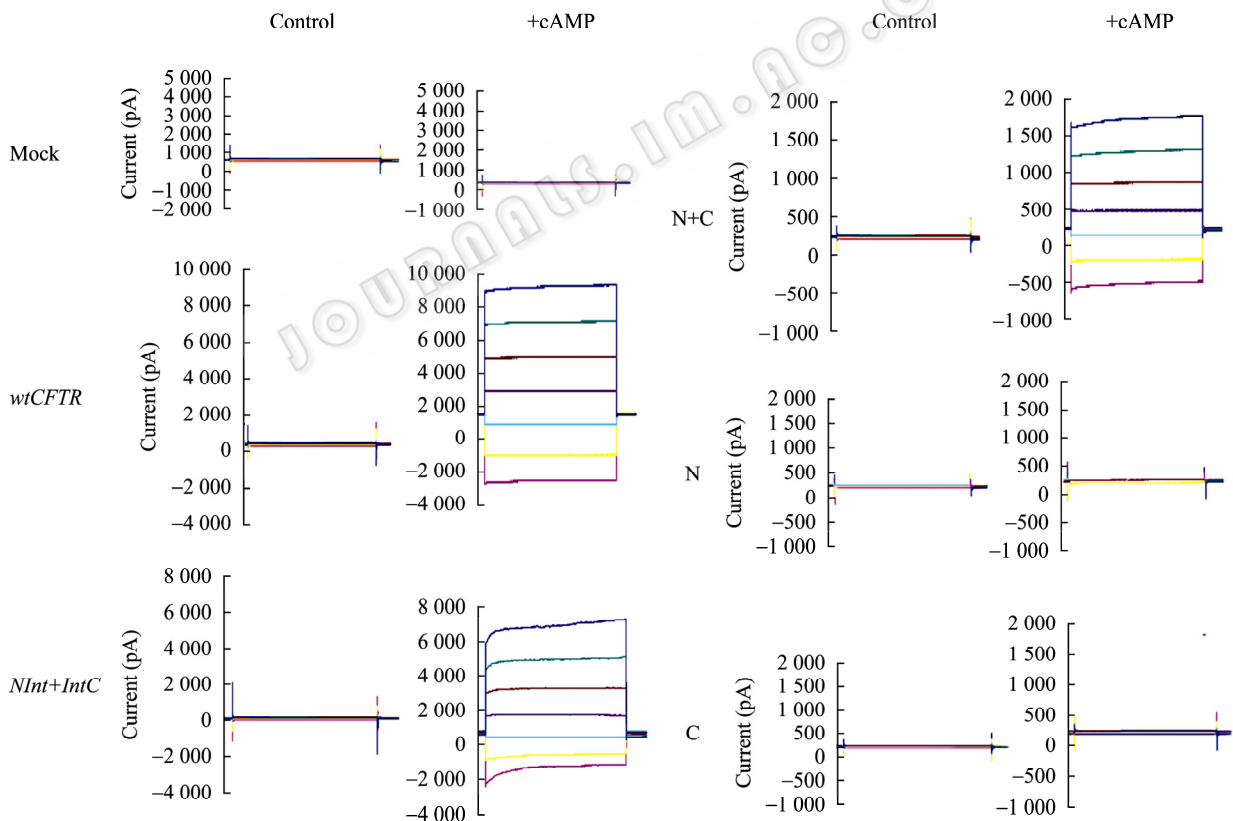


图 3 全细胞模式记录的转基因 BHK 细胞  $\text{Cl}^-$  电流

Fig. 3 Recording of whole cell CFTR  $\text{Cl}^-$  currents in gene transfected BHK cells. The cells expressing EGFP alone control or EGFP-fused *wtCFTR* were set as mock (left top) or positive control (left middle). The whole cell currents of cells coexpressing *NInt+IntC* (left bottom), *N+C* (right top), individual *N* (right middle) or *C* part (right bottom) of CFTR were recorded both before (Control) and after (+cAMP) addition of forskolin ( $2\ \mu\text{mol/L}$ ), pCPT-cAMP ( $100\ \mu\text{mol/L}$ ) and IBMX ( $100\ \mu\text{mol/L}$ ) to the bath solution. Voltage steps were from  $-60\ \text{mV}$  to  $+60\ \text{mV}$  in  $20\ \text{mV}$  increments from a holding potential of  $-14$ .

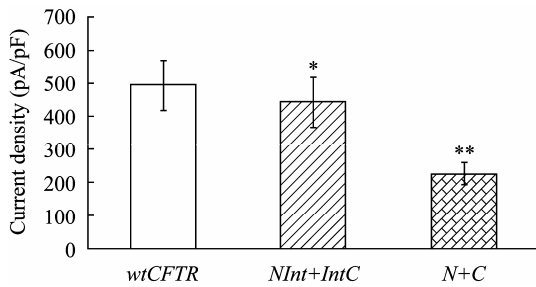


图 4 转基因细胞的电流密度

Fig. 4 Current density of gene transferred BHK cells. Mean cAMP-activated current density was measured at  $-60$  mV from experiments such as those shown in Fig. 3. Mean of data from 4 patches in each case. \*  $P>0.05$  vs wtCFTR group, \*\*  $P<0.01$  vs NInt+IntC group.

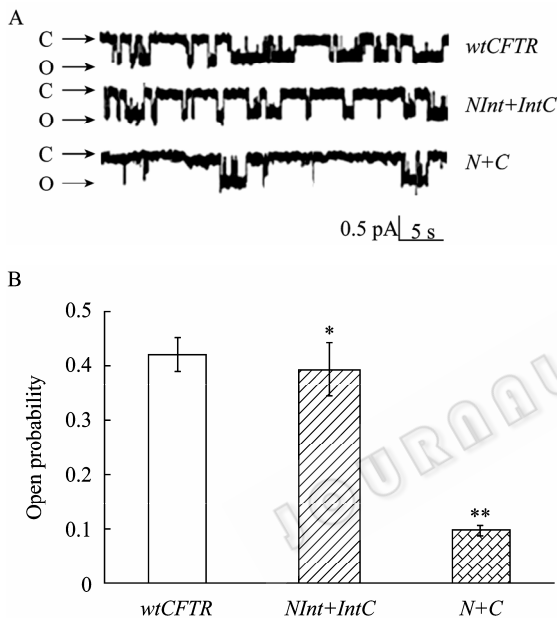


图 5 转基因细胞单 CFTR 通道门控特征

Fig. 5 Gating properties of single CFTR channel from gene transferred cells. (A) Unitary currents recorded from inside-out membrane patches at a membrane potentials of  $-50$  mV (C means channel closed and O means channel open). (B) Mean channel open probability estimated from such recordings lasting at least 60 s. \*  $P>0.05$  vs wtCFTR group, \*\*  $P<0.01$  vs NInt+IntC group.

发的过程<sup>[8]</sup>。尽管如此,在满足剪接部位保守性氨基酸残基组成的前提下,Intein 对不同的外源蛋白表现出不同的剪接效率,说明剪接位点附近特别是下游外源蛋白的其他残基对剪接反应的影响,因此,本研究选择的 CFTR 断裂点的 Ser<sup>839</sup> 后为 Ile<sup>840</sup>,这 2 个残基与所用 intein 下游天然宿主蛋白相同,共转染后的 Western blotting 结果显示,Intein 对此断裂点的两段 CFTR 多肽可进行有效剪接,但仍可

检测到未被完全剪接的前体蛋白,可能的原因为剪接反应本身的不完全,或者两种基因转染效率和/或表达水平的不均衡性所致。电生理结果显示,剪接所形成的 CFTR 蛋白具有与野生型 CFTR 相似的 Cl<sup>-</sup> 通道功能,全细胞膜片钳记录到较高的 cAMP 依赖性 Cl<sup>-</sup> 电流和较高的电流密度,单通道膜片钳记录到较高的 PKA 和 ATP 依赖性 Cl<sup>-</sup> 通道开放活性和开放概率,应该注意的是,虽然蛋白质水平表现出 CFTR 的不完全剪接,但剪接产生的完整 CFTR 蛋白足以形成与野生型 CFTR 相近的 Cl<sup>-</sup> 通道功能。未融合 intein 的两段 CFTR 基因共转染细胞结果显示,尽管不能形成完整的 CFTR 蛋白分子,亦可记录到较低的 Cl<sup>-</sup> 电流,从单独转染 CFTR 的 N 端基因说明,两段 CFTR 蛋白存在某种程度的分子间互补作用,并由此产生部分的 Cl<sup>-</sup> 通道电流,但大小和密度明显低于融合 intein 的共转染细胞,而且通道开放活性和概率也明显较低。最近有研究者用基于 RNA 剪接的双 AAV 载体转 CFTR 基因,但由于剪接效率不够高使得其使用受到限制<sup>[9]</sup>。

由于蛋白质剪接反应的精确、无副反应的特点,近年来在蛋白质纯化<sup>[10]</sup>、多肽环化<sup>[11]</sup>以及蛋白质相互作用<sup>[12]</sup>等研究中得到应用。需要指出的是,尽管 intein 对其天然宿主蛋白的剪接效率极高,甚至观察不到中间产物,但对不同的非天然宿主蛋白,表现出的剪接效率高高低不一,因此对于不同的目的蛋白需要测试不同的满足剪接反应的保守氨基酸残基的断裂位点,笔者曾在大肠杆菌表达实验中证明本文中所选择的断裂位点以及于 Ser<sup>660</sup> 前断裂 CFTR, Ser<sup>660</sup> 后亦为保守的 Ile<sup>661</sup>,Intein 表现出较高的剪接效率<sup>[13]</sup>,但对另一有 2 个保守残基 Ser<sup>707</sup>Ile<sup>708</sup> 前断裂的 CFTR 只观察到很低的剪接效率,对只有一个保守残基 Ser<sup>670</sup> 或 Ser<sup>737</sup> 前断裂的 CFTR 没有观察到剪接反应(数据未显示)。最近笔者还用 intein 在大肠杆菌中实现了对凝血 VIII 因子的高效剪接<sup>[14]</sup>。有报道用 intein 的蛋白质反式剪接功能肌肉注射双 AAV 载体转 Dystrophin 基因后的肌肉形态学证明对肌营养不良小鼠有较好的治疗效果<sup>[15]</sup>。

鉴于 AAV5 对感染呼吸道上皮细胞的靶向特异性感染的特点,Siminger 等构建了一种去除 TMD1

的 263 个氨基酸残基的缩减型 *CFTR* 基因的重组型 AAV5, *Cfr*<sup>-/-</sup> 小鼠气管内转基因显示对  $\text{Cl}^-$  通道电流的纠正作用, 并改善病菌感染引起的炎症<sup>[16]</sup>。本研究为进一步地应用双 AAV5 载体的全长 *CFTR* 基因转移进行 CF 基因治疗研究奠定了基础。

**致谢:** 感谢加拿大 Dalhousie 大学医学院 Paul Liu 教授提供的蛋白质剪接技术的帮助和 Paul Linsdell 教授提供的膜片钳技术帮助。

## REFERENCES

- [1] Gadsby DC, Vergani P, Csanády L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*, 2006, **440**(7083): 477–483.
- [2] Zabner J, Seiler M, Walters R, *et al.* Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J Virol*, 2000, **74**(8): 3852–3858.
- [3] Saleh L, Perler FB. Protein splicing *in cis* and *in trans*. *Chem Rec*, 2006, **6**(4): 183–193.
- [4] Wu H, Xu MQ, Liu XQ. Protein *trans*-splicing and functional mini-inteins of a cyanobacterial *dnaB* intein. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1387**(1/2): 422–432.
- [5] Xu MQ, Perler FB. The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation. *EMBO J*, 1996, **15**(19): 5146–5153.
- [6] Gong XD, Burbridge SM, Cowley EA, *et al.* Molecular determinants of  $\text{Au}(\text{CN})_2^-$  binding and permeability within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  $\text{Cl}^-$  channel pore. *J Physiol*, 2002, **540**(Pt 1): 39–47.
- [7] Linsdell P, Gong XD. Multiple inhibitory effects of  $\text{Au}(\text{CN})_2^-$  ions on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  $\text{Cl}^-$  channel currents. *J Physiol*, 2002, **540**(Pt 1): 29–38.
- [8] Xu MQ, Perler FB. The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation. *EMBO J*, 1996, **15**(19): 5146–5153.
- [9] Song YH, Lou HH, Boyer JL, *et al.* Functional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in cystic fibrosis airway epithelial cells by AAV6.2-mediated segmental *trans*-splicing. *Hum Gene Ther*, 2009, **20**(3): 267–81.
- [10] Sharma SS, Chong S, Harcum SW. Intein-mediated protein purification of fusion proteins expressed under high-cell density conditions in *E. coli*. *J Biotechnol*, 2006, **125**(1): 48–56.
- [11] Williams NK, Prosselkov 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.
- [12] Paulmurugan R, Umezawa Y, Gambhir SS. Noninvasive imaging of protein-protein interactions in living subjects by using reporter protein complementation and reconstitution strategies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(24): 15608–15613.
- [13] Zhu FX, Liu ZL, Qu HG, *et al.* Intein-mediated *trans*-splicing of chloride ion channel *CFTR*. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2009, **25**(9): 844–848.  
朱甫祥, 刘泽隆, 屈慧鸽, 等. 内含肽介导的氯离子通道蛋白 *CFTR* 的反式剪接. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, **25**(9): 844–848.
- [14] Zhu FX, Liu ZL, Qu HG, *et al.* *Ssp DnaB* intein-mediated ligation of heavy and light chains of coagulation factor VIII in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(7): 1101–1106.  
朱甫祥, 刘泽隆, 屈慧鸽, 等. *Ssp DnaB* intein 大肠杆菌中介导 FVIII 重链和轻链的连接. 生物工程学报, 2009, **25**(7): 1101–1106.
- [15] Li J, Sun WC, Wang B, *et al.* Protein *trans*-splicing as a means for viral vector-mediated *in vivo* gene therapy. *Hum Gene Ther*, 2008, **19**(9): 958–964.
- [16] Sirminger J, Muller C, Braag S, *et al.* Functional characterization of a recombinant adeno-associated virus 5-pseudotyped cystic fibrosis transmembrane conductance regulator vector. *Hum Gene Ther*, 2004, **15**(9): 832–841.