

酸性区 3 融合重链促进基于蛋白质内含子的双载体 B 域缺失型凝血因子Ⅷ转基因表达*

朱甫祥** 杨树德 刘泽隆 缪 静 屈慧鸽 迟晓艳

(鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025)

摘要 最近的研究表明, 蛋白质内含子(intein)介导的 B 区缺失型凝血因子Ⅷ(BDD-FⅧ)的轻链和重链剪接可顺式促进后者的分泌, 而且剪接反应在细胞内、外均可发生. 为进一步提高基于蛋白质内含子的双载体转 BDD-FⅧ基因的功效, 将具有促进重链分泌作用的位于 Pro¹⁶⁰~Ser¹⁶⁰ 的酸性区 3(acidic region-3, AR-3)引入重链, 检验对蛋白质内含子剪接的 BDD-FⅧ蛋白分泌和活性的影响. 用融合蛋白内含子的附加 ar-3 重链(HCAR3IntN)基因和轻链(IntCLC)基因共转染培养的 HEK293 细胞, 分别用 ELISA 和 Coatest 法定量分析分泌至培养上清中剪接 BDD-FⅧ蛋白量和生物活性, 并用免疫印迹观察了细胞内的 BDD-FⅧ剪接. 结果显示, 共转 HCAR3IntN 和 IntCLC 基因细胞, 分泌至上清的剪接 BDD-FⅧ蛋白量和活性分别为 (173±26) μg/L 和 (1.31±0.15) U/ml, 明显高于未添加 ar-3 的蛋白质内含子融合重链(HCIntN)与轻链(IntCLC)基因共转染细胞 [(102±12) μg/L 和 (0.79±0.09) U/ml], 提示 AR-3 对蛋白质内含子剪接的 BDD-FⅧ蛋白分泌和活性有明显改善作用. 而且, 分别转 HCAR3IntN 和 IntCLC 基因细胞混合培养后的上清中, 亦检测到剪接的 BDD-FⅧ蛋白和活性 [(35±7) μg/L 和 (0.28±0.08) U/ml], 表明蛋白质内含子可进行不依赖细胞机制的蛋白质剪接. 另外, 转基因细胞总蛋白呈现明显的可与 FⅧ多克隆抗体进行反应的剪接 BDD-FⅧ蛋白条带, 直观地反映细胞内 BDD-FⅧ的剪接. 为动物模体内运用蛋白质反式剪接技术的双腺相关病毒载体(AAV)转 BDD-FⅧ基因实验提供了依据.

关键词 凝血因子Ⅷ, 酸性区 3, 分泌, 蛋白质内含子, 蛋白质反式剪接

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00235

凝血因子Ⅷ(FⅧ)虽然与因子Ⅴ(FⅤ)具有相似的结构域组成 A1-A2-B-A3-C1-C2, 而且二者的 A 和 C 结构域的氨基酸有 40%的同源性, 但前者的分泌效率明显低于后者^[1], 限制了外源重组 FⅧ产品在甲型血友病患者治疗中应用, 也因 FⅧ表达水平较低使甲型血友病基因治疗的疗效欠佳, 另外编码 FⅧ的基因较大, 也给基因治疗中具有较多优点的基因载体腺相关病毒载体(adeno-associated virus, AAV)的应用带来了困难^[2]. 目前, 采用 AAV 携带 FⅧ基因的策略之一是选择小的基因调控序列, 但缺点是缺乏组织特异性和较低基因表达水平^[3-4].

采用双 AAV 分别转运 FⅧ的重链和轻链基因、通过表达后重链和轻链多肽形成功能性异源二聚体的方法, 可有效克服 AAV 容量限制^[5-6], 但由于异源二聚体形成依赖细胞机制, 且重链的分泌效率远低于轻链, 由此导致突出的链不平衡问题, 一方面使分泌的异源二聚体水平降低, 另一方面使过多分泌

的轻链多肽归于“无效分泌”. 如何提高基因共转染率和重链分泌效率是改善双载体转 FⅧ基因的关键. 我们最近应用蛋白质内含子的蛋白质反式剪接技术进行双载体转 B 区缺失型 FⅧ(B-domain deleted FⅧ, BDD-FⅧ)基因研究证明, 轻链不仅可顺式促进重链多肽的分泌, 而且蛋白质内含子催化的重链与轻链多肽连接反应可不依赖细胞机制^[7-8]. 蛋白质内含子是包埋在蛋白质前体中的多肽序列, 翻译后蛋白质水平通过自催化作用切除其自身, 并

* 山东省自然科学基金(ZR2010CM061), 烟台市科技发展计划(2008152), 教育部留学回国人员科研启动基金(20071108)和鲁东大学科研基金(LZ20083305)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0535-6693825, E-mail: fuxiangmail@163.com

收稿日期: 2010-05-03, 接受日期: 2010-08-09

伴随两侧宿主蛋白的肽键连接, 类似于 RNA 分子剪接, 被称为蛋白质剪接作用^[9]. 最近有报道将位于 BDD-FⅧ的 Pro¹⁶⁴⁰~Ser¹⁶⁹⁰ 酸性区 3(acidic region-3, AR-3)添加于重链末端可显著提高重链的分泌效率^[10]. 为进一步提高蛋白质内含子剪接 BDD-FⅧ蛋白的分泌效率和活性, 本文将具有促进重链分泌的 AR-3 序列添加于重链末端, 用双载体 HEK293 细胞共转融合蛋白内含子的 BDD-FⅧ重链和轻链基因, 观察到 AR-3 添加重链对蛋白质内含子剪接的 BDD-FⅧ蛋白分泌和活性的明显改善作用, 为进一步运用蛋白质内含子的双 AAV 动物体内转 BDD-FⅧ基因研究提供了实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料

含有 *Ssp* DnaB 蛋白内含子编码序列的质粒 pMST 为加拿大 Dalhousie 大学医学院 Liu 教授实验室构建, 本室保存. 含有全长 FⅧ cDNA 的质粒 pXX-FⅧ为美国 Pittsburgh 大学分子遗传与生物化学系基因治疗中心 Xiao 教授实验室构建, 本室保存. BDD-FⅧ的真核表达质粒 pCMV-F8 由本实验室构建. BDD-FⅧ重链、轻链与 *Ssp* DnaB 蛋白内含子融合表达载体 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 为我们以前的工作构建^[9]. 大肠杆菌菌株 DH5 α 为本室保存. HEK293 细胞购自中国科学院细胞库. 限制性内切酶、DNA 连接酶试剂盒、DNA 分子质量标准产自 New England Biolabs 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; 重组 FⅧ为 BioChain 公司产品; FⅧ的重链单克隆抗体 ESH-5 和 FⅧ轻链单克隆抗体 ESH8 及 HRP 标记的 ESH8 购自 American Diagnostica 公司; HRP 标记的兔抗人 FⅧ多克隆抗体购自 Novus 公司; 羊抗兔 HRP-二抗和 ECL plus Western blotting detection 试剂盒购自 GE 公司; 人正常参比血浆为 George King Biomedical 公司产品; FⅧ活性检测的 COATEST SP FⅧ试剂盒购自 Chromogenix 公司. 其他试剂均为国产或进口分析纯.

1.2 真核重组表达质粒的构建

以本室以前构建的含有人 FⅧ重链和 *Ssp* DnaB 蛋白内含子融合基因的表达质粒 pCMV-HCIntN (重链末端已包含了 1640~1656 氨基酸编码序列)

为模板, 用 5' TGCATCAGTGGAGATAGTTTG 3' 和 5' CCATCGATTTCCCGTTGATGGCGTTTC 3' (含 *Cla* I 位点)引物对, 通过反向 PCR 扩增得到 pCMV-HCIntN 的线性化 DNA 大片段; 以 pXX-FⅧ为模板, 用 5' CCATCGATCTGACTACTCTTCAGTCAG 3' (含 *Cla* I 位点)和 5' GCTGCGGGGGC-TCTGA 3' 引物对 PCR 扩增 FⅧ的 1657~1690 氨基酸的编码序列, 用 *Cla* I 分别酶切 PCR 产物后用 T4 DNA 连接酶连接, 得到末端添加 AR-3(1640~1690) 编码序列的重链基因表达载体 pCMV-HCAR3IntN, 与以前构建的含有 BDD-FⅧ轻链和 *Ssp* DnaB 蛋白内含子融合基因的表达质粒 pCMV-IntCLC 成为一对载体.

1.3 细胞培养及基因转染

HEK293 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 5×10⁵ 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-HCAR3IntN 和 pCMV-IntCLC 按等比例各 4 μ g 混合稀释于 250 μ l 的 Opti-MEM 培养液, 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 HEK293 细胞. 同时用 pCMV-F8 转染 HEK293 细胞、用 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 共转染 HEK293 细胞作为对照, 并用空载体 pcDNA3.1 转染 HEK293 细胞作为阴性对照(mock). 培养箱内温育 5 h 后换 2 ml 新鲜的 Opti-MEM 培养液, 继续培养 48 h, 收集细胞和培养上清, 并在收集的上清中加 40 μ l 混合蛋白酶抑制剂. 为观察蛋白质内含子在培养上清中的剪接反应, 按上法分别单独用 pCMV-HCAR3IntN 和 pCMV-IntCLC 转染 HEK293 细胞, 培养 24 h 后合并两组细胞继续培养 48 h, 收集细胞和上清.

1.4 细胞培养上清中分泌的 BDD-FⅧ重、轻链以及剪接的全长 BDD-FⅧ浓度分析

参照我们以前建立的重链特异性 ELISA 检测培养上清的重链蛋白浓度^[7]. 用 FⅧ重链 A1 区单抗 ESH5 作为包被抗体, HRP 标记 FⅧ多克隆抗体为检测抗体, 用标准系列稀释的标准品 FⅧ的吸光值和浓度绘制标准曲线, 样品中重链多肽的浓度从标准曲线查得.

以轻链特异性 ELISA 检测培养上清的轻链多

肽浓度^[7]。用 FⅧ轻链 C2 区单抗 ESH8 作为包被抗体, HRP 标记 FⅧ多克隆抗体为检测抗体, 用系列稀释的标准品 FⅧ的吸光值和浓度绘制标准曲线, 样品中轻链多肽的浓度从标准曲线查得。

参照文献[11]用双夹心 ELISA 检测上清中的全长 BDD-FⅧ蛋白量, 以 FⅧ重链 A1 区单抗 ESH5 为包被抗体, HRP 标记轻链单抗 ESH8 为检测抗体。以系列稀释的标准品的浓度和吸光度值绘制标准曲线, 根据测得上清样品的吸光度值从标准曲线读取 BDD-FⅧ的浓度。

1.5 细胞培养上清中剪接 BDD-FⅧ产生的生物活性分析

用 Coatest 发色法, 参照文献[12]按试剂盒说明书操作, 分析培养上清的 FⅧ生物活性。以正常人血浆为参比(FⅧ活性为 1.0 U/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 处读取吸光度值, 以稀释百分比为横坐标、405 nm 吸光度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度值从标准曲线读出相应的百分比值, 以 100%为 1.0 U/ml 换算为上清的 FⅧ生物活性。

1.6 Western blotting 观察细胞内剪接的 BDD-FⅧ蛋白

用冻融法裂解所收集的细胞样品, 提取转基因细胞总蛋白, Bradford 法进行蛋白质定量, 每个样品取 12 μg 总蛋白上样, 用还原性 SDS-PAGE 分离蛋白质, 半干电转系统将蛋白质转移至 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h, 1:1 000 稀释的兔抗人 FⅧ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 光胶片。

1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 两组之间用 *t* 检验进行差异显著性比较, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 添加 ar-3 序列重链变构体的构建

FⅧ分子结构域的排列为 A1-A2-B-A3-C1-C2, 去掉大部分 B 结构域(Δ761~1639)后的 FⅧ为 BDD-FⅧ。我们以前的工作将 BDD-FⅧ于 Gln¹⁶⁵⁶~Ser¹⁶⁵⁷ 之间断裂为重链和轻链, 分别与 *Ssp* DnaB 蛋白内含子融合, 构建了融合蛋白内含子的重链

(HCIntN)和轻链(IntCLC), 将它们分别插入真核表达载体 pcDNA3.1 (+) 后得到 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC^[8]。本文将通过 PCR 扩增得到的 FⅧ的 AR-3 区(Pro¹⁶⁴⁰~Ser¹⁶⁹⁰)编码序列, 插入到 HCIntN 中的重链末端, 得到重链添加 ar-3 区融合蛋白内含子的 HCAR3IntN。上述几种 FⅧ的结构示意图见图 1。

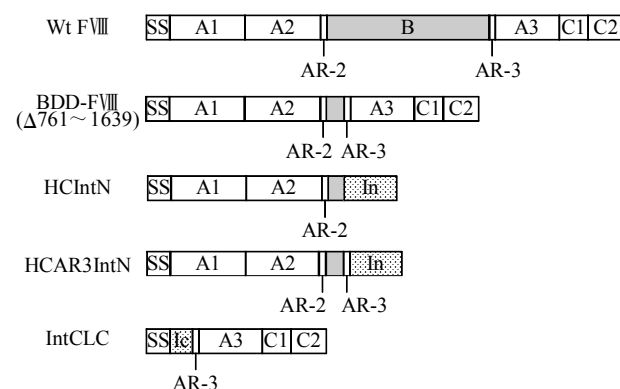


Fig. 1 Schematic representation of FVIII structures

The wild-type human full-length FVIII (wt FVIII) contains three distinct structural domains including A1~3, B, and C1~2 defined by internal sequence homology and arranged in the order of A1-A2-B-A3-C1-C2. The BDD-FVIII was produced by deleting amino acids of B-domain from 761~1639 with a small B-domain retention. A pair of intein-contained heavy and light chains termed HCIntN and IntCLC were constructed previously by splitting BDD-FVIII before Ser1657 to heavy and light chains and fusing N- and C-terminus (In, Ic) of *Ssp* DnaB intein to them. The intein-fused heavy chain with an additional AR-3 (HCAR3IntN) was produced by incorporating an AR-3 sequence of FVIII to the C-terminus of the heavy chain within HCIntN. SS: Signal sequence of FVIII.

2.2 转基因细胞分泌的重链、轻链多肽和剪接 BDD-FⅧ蛋白的量

为观察 AR-3 对蛋白质内含子融合重链多肽(HCAR3IntN)分泌的影响, 以 FⅧ重链特异性抗体 ESH-5 为包被抗体和以 HRP 标记 FⅧ多克隆抗体为检测抗体的 ELISA 结果显示(图 2), 单独转 *HCAR3IntN* 基因后分泌至培养上清中的重链多肽为(59±8) μg/L, 明显高于单独转蛋白质内含子融合未添加 ar-3 序列重链 *HCIntN* 基因细胞分泌的重链多肽(13±4) μg/L ($P < 0.01$), 表明 AR-3 可显著促进重链分泌。共转 *HCAR3IntN* 基因和融合蛋白内含子的轻链 *IntCLC* 基因结果显示, 重链多肽分泌量进一步增加到(248±32) μg/L, 明显高于共转 *HCIntN* 和 *IntCLC* 基因细胞的重链分泌(146±17) μg/L, 也明显高于转 *BDD-FVIII* 基因对照细胞的重链分泌

(125±19) $\mu\text{g/L}$, 由于蛋白质内含子催化轻链与重链多肽的共价连接, 表明轻链多肽可以顺式促进 AR-3 添加重链的分泌。

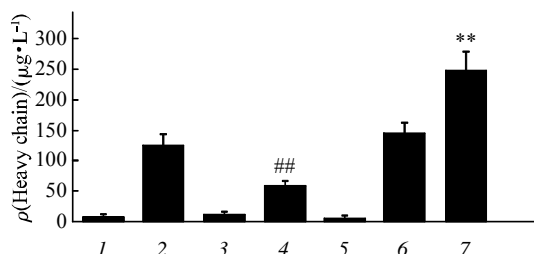


Fig. 2 Secreted heavy chain

The data are represented as the $\bar{x} \pm s$, $n=3$ in each group, $^{**}P < 0.01$ vs HCIIntN transfection, $^{**}P < 0.01$ vs HCIIntN and IntCLC co-transfection and BDD-F VIII transfection. 1: Mock; 2: BDD-F VIII; 3: HCIIntN; 4: HCA3IntN; 5: IntCLC; 6: HCIIntN+IntCLC; 7: HCA3IntN+IntCLC.

我们以前的研究证明, BDD-F VIII的轻链分泌效率明显高于重链^[7]. 为了观察共转 HCA3IntN 和 IntCLC 基因对轻链分泌的影响, 以轻链特异性抗体 ESH-8 为包被抗体和以 HRP 标记 F VIII多克隆抗体为检测抗体的 ELISA 结果显示(图 3), 转基因细胞的轻链多肽分泌量为(309±36) $\mu\text{g/L}$, 共转 HCIIntN 和 IntCLC 基因细胞的轻链分泌量为(289±22) $\mu\text{g/L}$, 单独转 IntCLC 基因细胞的轻链分泌量为(279±25) $\mu\text{g/L}$, 三者之间无明显差别($P > 0.05$), 但均明显高于转 BDD-F VIII基因对照细胞的轻链分泌 (136±17) $\mu\text{g/L}$, 上述结果提示, 添不添加 AR-3 重链对轻链的分泌无明显影响, 但单独分开的轻链分泌明显高于 BDD-F VIII分子的轻链分泌, 因为 BDD-F VIII分子中轻链和重链的等比率关系, 反映受重链分泌低效率性的拖累, 轻链的分泌也随之降低。

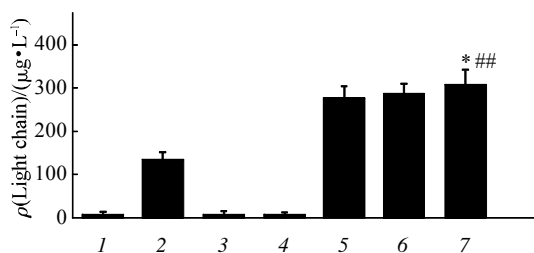


Fig. 3 Secreted light chain

The data are represented as the $\bar{x} \pm s$, $n=3$ in each group, $^{*}P > 0.05$ vs HCIIntN and IntCLC co-transfection, and IntCLC transfection, $^{***}P < 0.01$ vs BDD-F VIII transfection. 1: Mock; 2: BDD-F VIII; 3: HCIIntN; 4: HCA3IntN; 5: IntCLC; 6: HCIIntN+IntCLC; 7: HCA3IntN+IntCLC.

生理性 F VIII功能的发挥有赖于其重链和轻链异源二聚体的形成, 为观察添加 AR-3 重链对于由蛋白质内含子催化与轻链剪接产生的 BDD-F VIII蛋白分泌影响, 用 F VIII重链抗体 ESH-5 和 HRP 标记的轻链抗体 ESH-8 为包被抗体和检测抗体进行的双夹心 ELISA 结果显示(图 4), 共转 HCA3IntN 和 IntCLC 基因细胞培养上清中经蛋白质内含子剪接的 BDD-F VIII蛋白为(173±26) $\mu\text{g/L}$, 明显高于共转 HCIIntN 和 IntCLC 基因细胞上清中分泌的 BDD-F VIII蛋白(102±12) $\mu\text{g/L}$ 和转 BDD-F VIII基因对照细胞分泌至上清的 BDD-F VIII蛋白(129±16) $\mu\text{g/L}$, 与前者的差别更明显, 表明添加 AR-3 的重链具有显著提高培养上清中蛋白质内含子剪接的 BDD-F VIII蛋白分泌. 另外, 从分别转 HCA3IntN 和 IntCLC 基因细胞混合培养后的上清中检测到剪接的 BDD-F VIII蛋白(35±7) $\mu\text{g/L}$, 此为分泌至上清的重链和轻链剪接形成, 表明蛋白质内含子可通过不依赖细胞机制的剪接融合 AR-3 的重链和轻链。

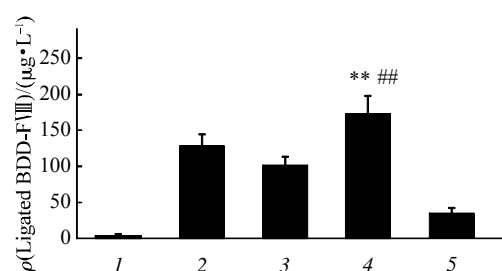


Fig. 4 Spliced BDD-F VIII protein in culture supernatant

The data are represented as the $\bar{x} \pm s$, $n=3$ in each group, $^{**}P < 0.01$ vs HCIIntN and IntCLC co-transfection, and $^{##}P < 0.05$ vs BDD-F VIII transfection. Note that supernatant of mixed cells individually transfected with HCA3IntN and IntCLC gene shows detectable BDD-F VIII spliced. 1: Mock; 2: BDD-F VIII; 3: HCIIntN+IntCLC; 4: HCA3IntN+IntCLC; 5: Mixed HCA3IntN+IntCLC.

2.3 转基因细胞上清的凝血生物活性

应用 Coatest 生色分析法检测培养上清的凝血生物活性结果显示(图 5), 共转 HCA3IntN 和 IntCLC 基因细胞上清中经蛋白质内含子剪接的 BDD-F VIII蛋白所产生的凝血生物活性为(1.31±0.15) U/ml, 明显高于共转 HCIIntN 和 IntCLC 基因细胞培养上清的凝血生物活性(0.79±0.09) U/ml ($P < 0.01$), 也高于转 BDD-F VIII基因对照细胞培养上清的凝血生物活性(0.97±0.15) U/ml. 结合上述蛋白质水平剪接 BDD-F VIII实验结果, 表明添加 AR-3 重链, 可通过

增加蛋白质内含子介导的与轻链剪接的 BDD-FⅧ蛋白分泌量, 提高凝血活性. 另外, 从单独转 *HCAR3IntN* 和 *IntCLC* 基因细胞合并培养后培养上清也可检测到 (0.28 ± 0.08) U/ml 的凝血活性, 提示蛋白质内含子可通过不依赖细胞机制的 BDD-FⅧ剪接产生相应的凝血活性.

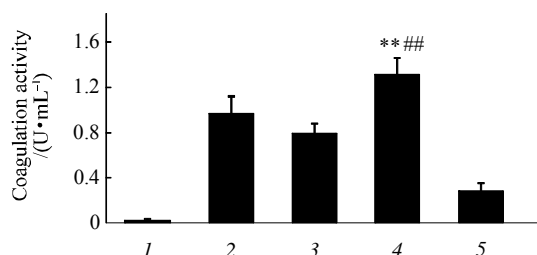


Fig. 5 Bioactivity of spliced BDD-FⅧ in culture supernatant

The data are represented as the $\bar{x} \pm s$, $n=3$ in each group, $**P < 0.01$ vs *HCAR3IntN*+*IntCLC* co-transfection, and $^{##}P < 0.05$ vs *BDD-FⅧ* transfection. Note that supernatant of mixed cells individually transfected with *HCAR3IntN* and *IntCLC* shows a detectable coagulation activity. 1: Mock; 2: *BDD-FⅧ*; 3: *HCAR3IntN* + *IntCLC*; 4: *HCAR3IntN* + *IntCLC*; 5: Mixed *HCAR3IntN* + *IntCLC*.

2.4 转基因细胞内 BDD-FⅧ的剪接

细胞总蛋白经电泳分离、转膜后, 用 FⅧ多克隆抗体进行的 Western blotting 结果显示(图 6), 共转融合蛋白质内含子的 *ar-3* 添加 BDD-FⅧ重链和轻链基因(*HCAR3IntN*+*IntCLC*)细胞, 可见一明显的与转 *BDD-FⅧ*基因阳性对照细胞表达的 BDD-FⅧ蛋白大小一致的剪接 BDD-FⅧ蛋白条带. 另外, 尚可见到未完全剪接的与单独转 *HCAR3IntN* 和

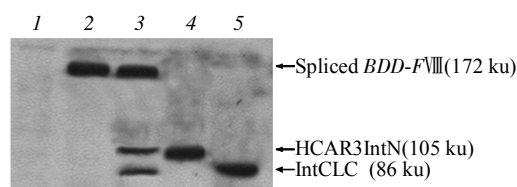


Fig. 6 Observation of spliced BDD-FⅧ protein in gene co-transfected cells by Western blotting

1: Mock transfection showing no reactive protein band(Mock); 2: *BDD-FⅧ* transfection showing a expressed BDD-FⅧ protein band(wt FⅧ); 3: *HCAR3IntN* plus *IntCLC* co-transfection showing a spliced BDD-FⅧ protein band with a molecular mass similar to the control (*BDD-FⅧ* transfection) and incompletely spliced protein precursors (*HCAR3IntN* and *IntCLC*)(*HCAR3IntN*+*IntCLC*); 4: *HCAR3IntN* transfection alone (*HCAR3IntN*); 5: *IntCLC* transfection alone(*IntCLC*).

IntCLC 细胞表达蛋白大小一致的前体蛋白 (*HCAR3IntN*, *IntCLC*), 产生的原因, 一方面为剪接的不反应不完全性所致, 另一方面为没用共感染的细胞分别表达的前体蛋白, 因无另一半前体蛋白可供剪接使然.

3 讨 论

本室最近运用蛋白质内含子的蛋白质反式剪接功能进行双载体分别转 *BDD-FⅧ*重链和轻链基因工作表明, 蛋白质内含子可有效介导转基因后表达的重、轻链多肽反式剪接形成完整的 BDD-FⅧ蛋白, 产生相应的凝血生物活性^[7-8]. 相对于依赖细胞机制的功能性异源二聚体 BDD-FⅧ形成的双载体转基因策略, 重链和轻链基因的非同一靶细胞表达、分泌后的重链和轻链多肽并不能形成异源二聚体, 影响转基因的功效, 蛋白质内含子催化的重、轻链间精确、高效的肽键无缝连接, 以及可进行不依赖细胞机制剪接反应, 因而并不需要重、轻链基因共进入同一靶细胞, 是运用蛋白质内含子转分泌性蛋白基因包括 BDD-FⅧ的优点所在. 另外, 两种双载体转 *BDD-FⅧ*基因的策略中, 由于重链分泌效率远低于轻链, 产生明显的链不平衡问题, 尽管轻链可反式促进重链的分泌, 但依然需要二者共表达于同一靶细胞, 轻链通过蛋白质内含子催化与重链连接可进一步顺式促进后者分泌. 重链多肽分泌效率低下主要是由于其分子的 A1 区存在与内质网分子伴侣蛋白 BiP 结合位点, 使得其分泌依赖 ATP 的能量消耗^[13]. 分泌困难的重链淤积于内质网使细胞变得不稳, 甚至会诱导细胞凋亡^[14]. 我们曾用蛋白质内含子融合的 F309S 突变的 A1 区重链和轻链转全长 *FⅧ*基因证明, F309S 突变具有一定的促进重链分泌作用, 但效率依然明显低于轻链多肽, 说明重链分泌的复杂性^[15]. 虽然我们最近的工作证明轻链具有促进重链分泌的效应^[7], 但此作用的分子机制并不清楚, 推测轻链中存在的某种促进重链分泌的序列元件. 在致力于轻链中促重链分泌元件的探索中, 发现位于 BDD-FⅧ轻链的 AR-3 结构添加于重链末端后可使重链的分泌量提高 5~6 倍^[10]. 本文将 *ar-3* 添加到重链末端, 单独转融合蛋白内含子的该重链基因后表达的重链多肽的分泌明显改善, 近 5 倍于未添加 AR-3 的蛋白质内含子融合重链的分泌(图 2), 与蛋白质内含子融合的轻链共转基因结果显示, AR-3 亦可明显提高蛋白质内含子剪接的 BDD-FⅧ蛋白分泌, 是共转未添加

ar-3 的蛋白质内含子融合重链与轻链基因的 1.7 倍, 凝血生物活性也明显提高(图 4, 5), 说明 AR-3 不仅可促进所添加的重链分泌, 而且可增强轻链顺式促剪接 BDD-FVIII 的分泌作用. 轻链的分泌不受共转基因的影响, 但与 AR-3 添加重链共转基因分泌的轻、重链比率为 1.2:1, 而与未添加 AR-3 重链共转基因的比率为 2:1, 前者共转基因使链不均衡得到进一步缓解. 另外从分别转 *ar-3* 添加的蛋白质内含子融合重链和融合轻链基因细胞混合培养上清液中, 可检测到剪接的 BDD-FVIII 蛋白和活性, 说明蛋白质内含子可进行不依赖细胞机制的剪接反应, 与我们以前的观察相一致^[8]. 本文添加于重链末端的 AR-3 序列来自 FVIII 分子本身, 不会因产生新抗原表位而给体内试验带来不利影响, 而且在 FVIII 的分泌过程和 / 或凝血反应过程中被活化时该 AR-3 序列的 Glu¹⁶⁴⁹~Arg¹⁶⁸⁹ 被水解切除^[16]. 需要指出的是, 蛋白质剪接反应被切下的蛋白质内含子存在对细胞和机体的潜在毒副作用和免疫反应, 但由于蛋白质内含子属于小分子多肽, 蛋白质剪接技术在体内、体外研究的应用中均未观察到此类不良反应^[7, 17], 而且其他体内外研究中广泛应用外源小分子多肽如荧光蛋白、荧光素酶和 LacZ 等报告基因表达产物均没有毒副作用的报道. 另外, 迄今发现的蛋白质内含子有 100 多种, 即使某种蛋白质内含子对机体有不良反应, 可选用其他蛋白质内含子, 不会限制蛋白质内含子技术的应用. 因此, 目前蛋白质内含子的精确蛋白质剪接技术作为一种有力工具在蛋白质工程和药物开发, 如体内外多肽的连接、多肽环化、蛋白质纯化、生物传感器及基因治疗等研究中的应用受到较多关注^[18-19]. 本研究为进一步用蛋白质反式剪接技术的双 AAV 载体共转 BDD-FVIII 基因动物体内实验奠定了基础.

致谢 感谢加拿大 Dalhousie 大学医学院 P. Liu 教授提供的 *Ssp DnaB* 蛋白内含子基因以及所提供的蛋白质剪接技术帮助.

参 考 文 献

- [1] Kane W H, Davie E W. Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood*, 1988, **71**(3): 539-555
- [2] Murphy S L, High K A. Gene therapy for haemophilia. *Br J Haematol*, 2008, **140**(4): 479-487
- [3] Ishiwata A, Mimuro J, Kashiwakura Y, *et al.* Phenotypic correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene. *Thromb Res*, 2006, **118**(5): 627-635
- [4] Sarkar R, Xiao W, Kazazian H H Jr. A single adeno-associated virus (AAV)-murine factor VIII vector partially corrects the hemophilia A phenotype. *J Thromb Haemost*, 2003, **1**(2): 220-226
- [5] 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**(12): 3919-3926
- [6] 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**(22): 12725-12730
- [7] Chen L X, Zhu F X, Juan Li J, *et al.* The enhancing effects of the light chain on heavy chain secretion in split delivery of factor VIII gene. *Mol Ther*, 2007, **15**(10): 1856-1862
- [8] Zhu F X, Liu Z L, Chi X Y, *et al.* Protein trans-splicing based dual-vector delivery of the coagulation factor VIII gene. *Sci Chin Life Sci*, 2010, **53**(6): 683-689
- [9] Perler F B. The ins and outs of gene expression control. *Nat Biotechnol*, 2004, **22**(7): 824-826
- [10] Chen L X, Lu H, Wang J H, *et al.* Enhanced factor VIII heavy chain for gene therapy of hemophilia A. *Mol Ther*, 2009, **17**(3): 417-424
- [11] Gnatenko D V, Saenko 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**(1): 27-36
- [12] Sarkar R, Tetreault R, Gao G, *et al.* Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using anAAV 8 serotype. *Blood*, 2004, **103**(4): 1253-1260
- [13] Kaufman R J, Pipe S W, Tagliavacca L, *et al.* Biosynthesis, assembly and secretion of coagulation factor VIII. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1997, **8**(Suppl 2): S3-14
- [14] Zhang K, Shen X, Wu J, *et al.* Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell*, 2006, **124**(3): 587-599
- [15] 朱甫祥, 刘泽隆, 屈慧鸽, 等. 内含肽介导 F309SfVIII 的连接和增强的重链分泌. *生理学报*, 2009, **61**(6): 526-532
- [16] Zhu P X, Liu Z L, Qu H G, *et al.* *Acta Physiol Sin*, 2009, **61**(6): 526-532
- [17] Fay P J, Jenkins P V. Mutating factor VIII: lessons from structure to function. *Blood Rev*, 2005, **19**(1): 15-27
- [18] Li J, Sun W C, 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
- [19] Gimble F S. Putting protein splicing to work. *Chem Biol*, 1998, **5**(10): R251-R256
- [19] Cheriyan M, Perler F B. Protein splicing: A versatile tool for drug discovery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, **61**(11): 899-907

Acidic Region-3 Fused Heavy Chain Ameliorates Intein-based Dual-vector Delivery of The B-Domain Deleted *FVIII* Gene*

ZHU Fu-Xiang**, YANG Shu-De, LIU Ze-Long, MIAO Jing, QU Hui-Ge, CHI Xiao-Yan

(College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract It was previously demonstrated that an intein-catalyzed splicing of B-domain deleted coagulation factor VIII (BDD-FVIII) heavy and light chains could improve the secretion of heavy chain in *cis* and the splicing can occur independently of cellular entities exhibiting a splicing activity in and out of the cell. In order to improve the efficacy of intein-based dual-vector delivery of the *BDD-F VIII* gene, here an additional acidic region-3 (AR-3) between Pro¹⁶⁴⁰ and Ser¹⁶⁹⁰ of FVIII proven to be helpful for the secretion of heavy chain was incorporated into BDD-F VIII heavy chain to examine its effect on secretion and bioactivity of an intein-spliced BDD-F VIII protein. By co-transfection of the cultured HEK293 cells with genes of the *ar-3* incorporated heavy chain and light chain with fused intein (*HCAR3IntN* and *IntCLC*), an ELISA and Coatest assay were performed to determine the amount of spliced BDD-F VIII protein and coagulation activity secreted in the culture supernatant, and the intracellular BDD-F VIII splicing was observed by Western blotting. The data showed that the amount of spliced BDD-F VIII protein (173 ± 26) $\mu\text{g/L}$ and coagulation activity (1.31 ± 0.15) U/ml of supernatant from gene co-transfected cells were greater than supernatant from intein-fused *ar-3*-free heavy and light chain genes (*HCIntN* and *IntCLC*) co-transfected cells (102 ± 12) $\mu\text{g/L}$ and (0.79 ± 0.09) U/ml indicating the additional AR-3 in the heavy chain could dramatically improve the secretion and activity of intein spliced BDD-F VIII. A spliced BDD-F VIII protein ((35 ± 7) $\mu\text{g/L}$) and coagulation activity ((0.28 ± 0.08) U/ml) was also detected in the culture supernatant of combined cells separately transfected with the *HCAR3IntN* and *IntCLC* genes implying the cellular entities independent BDD-FVIII splicing of the intein. The total protein from gene co-transfected cells displayed an obvious protein band of the spliced BDD-FVIII detected by a FVIII polyclone antibody indicating the intracellular BDD-FVIII splicing. It paved a way for ongoing study on protein *trans*-splicing based dual-adenovirus (AAV) delivery of the split *BDD-F VIII* gene in gene therapy for hemophilia A animals.

Key words coagulation factor VIII, acidic region-3, secretion, intein, protein *trans*-splicing

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00235

*This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2010CM061), Science and Technology Program of Yantai City (2008152), The Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry (20071108) and Scientific Research Foundation of Ludong University(LZ20083305).

**Corresponding author.

Tel: 86-535-6693825, E-mail: fuxiangmail@163.com

Received: May 3, 2010 Accepted: August 9, 2010