

蛋白质内含肽的研究及应用进展

韦静宜, 宋洪元*, 李成琼, 王小佳, 司军, 任雪松

西南大学蔬菜重点实验室, 重庆 400715

摘要: 内含肽的发现与研究只经过短短的20年, 但已在各个生物领域展现出应用潜力。本文阐述了蛋白质内含肽的相关概念、种类、分布、结构、功能和自我剪接机制。分析了内含肽在当前生物技术领域中的应用情况以及存在的优点和局限性, 最后就内含肽的应用前景进行了展望。

关键词: 内含肽; 自我剪接机制; 研究及应用

Research and Application Advancement of Intein

WEI Jing-Yi, SONG Hong-Yuan*, LI Cheng-Qiong, WANG Xiao-Jia, SI Jun, REN Xue-Song

Key Laboratory of Olericulture, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: In spite of only 20 years period for discovery and investigation of intein, its potential application value in biological research has been revealed. This paper reviewed the related concepts, types, distribution, configuration, functions and the self-splicing mechanism of intein. The applications of intein in biotechnology area were analyzed advantages and limitation. The application direction for the intein in future was also suggested.

Key words: intein; self-splicing mechanism; research and application

1 内含肽的相关概念

内含肽(intein)即蛋白质内含子, 是存在于前体蛋白质中的一段氨基酸序列。在前体蛋白转变为成熟蛋白的过程中, 内含肽靠自我剪切的方式从前体蛋白中释放出来, 同时两端的肽链以肽键的方式相连, 该过程即为蛋白质剪接(protein splicing), 这一过程不需要特定的细胞环境以及任何辅助因子的参与, 甚至可以体外进行。与内含肽相对应的是外显肽(extein), 即内含肽两侧的氨基酸序列。位于内含肽N端的序列称为N-外显肽, 位于内含肽C端的序列称为C-外显肽。N-、C-外显肽在内含肽的作用下通过肽键连接成完整成熟蛋白(Perler等1994)。内含肽有蛋白质和核酸2种水平上的含义, 既指宿主蛋白质中的插入序列又指与此多肽序列相对应的核苷酸序列(Kane等1990)。内含肽的存在有2种状态: 剪接反应前称为融合内含肽(fused intein), 剪接反应后称为游离内含肽(free intein)。两者的一级结构相同但功能却不同, 前者可自我催化蛋白质前体的剪接反应, 后者可作为归巢核酸内切酶(homing endonuclease)参与内含肽归巢。

2 内含肽的特征

2.1 分布 1990年, Kane等在研究酿酒酵母空泡ATP酶 *TFPI* 基因时发现了第1个内含肽。1994年

Perler等将其正式命名为内含肽。迄今为止, 在<http://www.neb.com/neb/inteins.html>上注册的内含肽已有487个。这些内含肽广泛分布于生物界的三大领域——真核生物、真细菌和古细菌、病毒和原噬菌体等宿主中。在487个内含肽中, 真细菌中发现的内含肽种类最多, 为231种; 其次是古细菌, 为156种; 真核生物最少, 为100种。内含肽的宿主蛋白质种类也很多, 包括代谢酶、核酸聚合酶、蛋白酶和核酸还原酶等, 其中绝大部分与DNA复制、修复、转录和翻译相关(Liu 2000)。目前尚未在多细胞真核生物中发现内含肽。

2.2 结构 大部分内含肽由两端的剪切区域(terminal splicing region)和中间的核酸内切酶结构域(homing endonuclease domain)或连接结构域(linker domain)组成(图1)。根据这一特征, 内含肽可分为3种: 经典内含肽(canonical intein)、微小内含肽(mini intein)和断裂型内含肽(split intein)。经典内含肽和微小内含肽均包含两端的剪切结构域和中间区域, 不同

收稿 2010-02-01 修定 2010-04-13

资助 国家自然科学基金(30771462)、重庆市自然科学基金(2007BB1358)和西南大学博士启动基金(SWUB2008021)。

* 通讯作者(E-mail: yuahs@sohu.com; Tel: 023-68250974)。

的是,前者中间区域为核酸内切酶结构域,而后者为连接结构域,不同微小内含肽连接结构域的长度并不相同。断裂型内含肽的中间区域在特定位点断开,形成N端片段(I_N)和C端片段(I_C),而且分别位于基因组上相距较远的2个基因上,在前体蛋白翻译成熟过程中,这2个片段相互识别并恢复核酸内切酶活性,介导蛋白质反式剪切(*protein trans-splicing*) (Wu等1998; Sun等2005)。

序列分析表明,内含肽由10个模块组成(图1)。从内含肽N端开始依次为A、N2、B、N4、C、D、E、H、F和G,其中A、N2、B、N4为N端剪切区域,F、G为C端剪切区域,C、D、

E、H为自导引核酸内切酶活性区域或连接结构域(Pietrokovski 1994, 1998; Perler等1997)。Perler等(1997)对内含肽序列的进一步分析表明,参与内含肽剪接的基序A、B、F、G在剪接位点处的氨基酸残基高度保守,并参加了内含肽剪接过程中的亲和置换反应。大多数内含肽基序A中含有带有羟基或巯基的氨基酸,如Ser、CysH。基序B中则含Thr-XX-His高度保守的氨基酸序列,该序列也存在于丝氨酸蛋白酶中。基序G中参与剪接反应的保守氨基酸残基为Asn、Ser、CysH、Thr、His。比对现有的内含肽序列后发现基序A中的保守位点(如Ser、CysH)在某些内含肽中会被Ala、

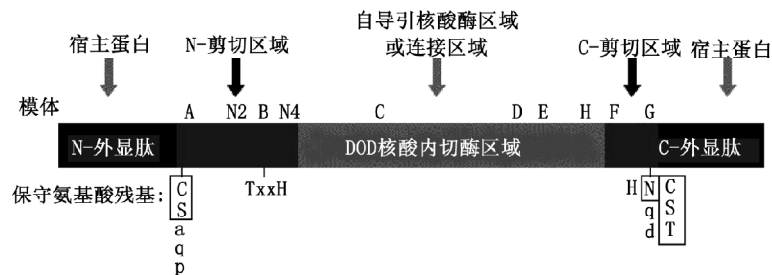


图1 内含肽结构示意图(根据 <http://www.neb.com/neb/inteins.html> 图片修改)

Fig.1 Structure of inteins (modified from <http://www.neb.com/neb/inteins.html>)

方框内氨基酸: 标准剪切反应中的亲核攻击位点; 大写字母: 经典内含肽中的保守氨基酸; 小写字母: 内含肽中的多态氨基酸位点。

Gln 或 Pro 等所替代, 基序 G 中也一样。

2.3 核酸内切酶活性 内含肽中间区域的模块 C、D、E、H 共同构成了内含肽核酸内切酶区域 (family core homing endonuclease domain, DOD) (Duan等1997; Heath等1997)。DOD 区域在结构和功能上都与核酸内切酶相似, 可以通过“归巢”进行内含肽自身的转移, 但没有剪切功能。内含肽归巢即内含肽序列转移到没有这一序列的同源蛋白的等位基因上。DOD 区域可以识别、切割不含内含肽的同源蛋白的等位基因, 利用同源重组, 将编码内含肽的基因转移到等位基因上, 且插入位点两端不形成重复序列 (Guhan 和 Muniyappa 2003a)。因此编码这种内含肽的 DNA 分子是一种有别于转座子的可移动遗传因子。自导引核酸内切酶作用时不需要其他分子辅助。但研究表明某些自导引核酸内切酶作用时需要金属离子参与: 结核分支杆菌的 RecA 内含肽具有 Mn^{2+} 依赖性 (Guhan 和

Muniyappa 2003b); 在 ColE7 核酸内切酶的 HNH 家族中, Zn^{2+} 在稳定酶结构和水解 DNA 过程中是必需的 (Ku 等 2002)。

3 内含肽的剪接机制

内含肽介导蛋白质剪接涉及了 3 个剪切位点保守氨基酸残基的 4 步亲核置换反应 (图 2)。

3.1 N-O 键重组 内含肽 N 端剪切位点的 Ser/Cys 残基侧链的 N-O 键或 N-S 键发生转酯酰基反应, 形成了酯类的线性中间产物。

3.2 转酯作用 由 C 端外显肽 Ser¹ 或 CyH¹ 的羟基或巯基对内含肽 N 端的酯键进行亲核攻击, 发生转酯作用, 形成双 N 端分支状中间产物, 其中内含肽与 C 端外显肽仍以肽键连接, 而 N 端外显肽与 C 端外显肽则通过酯键连接在一起。该反应在碱性条件下 (pH 9~10) 可发生逆转, 由分支中间体变回线性前体 (Xu 等 1993)。

3.3 Asn 环化 内含肽 C 端 Asn 的 NH_2 基团对 C-外

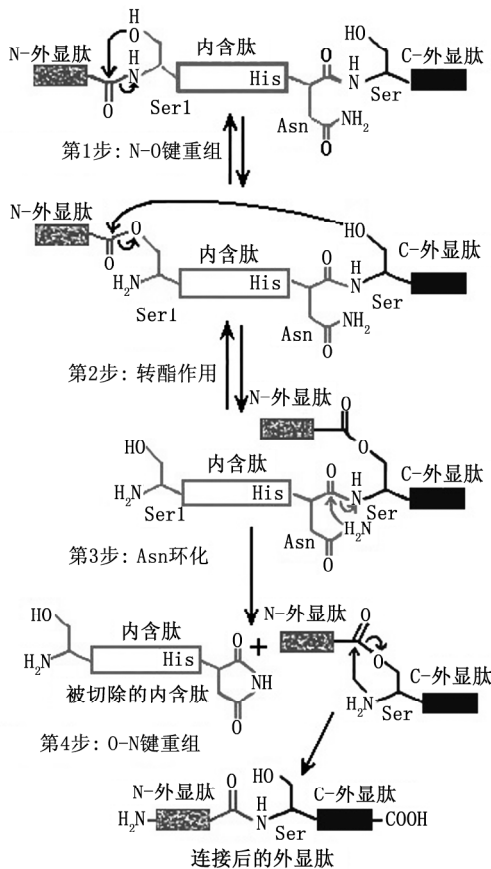


图2 内含肽剪接机制(根据 <http://www.neb.com/neb/inteins.html> 图片修改)

Fig.2 Splicing mechanism of inteins (modified from <http://www.neb.com/neb/inteins.html>)

显肽的羧基发动亲核攻击, 形成氨基琥珀酸五元环结构, 同时将游离内含肽释放出来。Asn/Gln的环化基本上是不可逆的, 此位点的取代会阻断C端肽键的裂解, 但并不影响第2步反应。内含肽C端倒数第1位的His能辅助Asn的环化, His突变也会影响C端肽键的裂解反应。

3.4 O-N键重组 这是自发反应。随着Asn的环化和内含肽的切除, 外显肽相连, 但游离内含肽的氨基琥珀酰亚胺还要发生自发羟基化, 外显肽之间要形成稳定的肽键, 才完成蛋白质的剪接。

4 内含肽的应用

4.1 快速纯化目的蛋白 将靶蛋白与内含肽相互融合能实现靶蛋白的一步纯化。最先人们使用Sce VMA内含肽来进行蛋白质纯化, 先用Ala取代内

含肽C端的Asp残基, 再连接上几丁质(chitin)作为C端的外显肽, 而目的蛋白作为N端外显肽。翻译后的蛋白前体进行N端剪接, 目的蛋白游离出来, 但C端不能剪切, 导致内含肽仍与几丁质相连, 利用几丁质树脂的吸附作用即可将目的蛋白纯化出来。同样的, 也可以用Glu取代C端His残基来调节内含肽C端的剪接, 实现蛋白质纯化。Srinivasa等(2009)利用此方法实现了对大肠杆菌(*E. coli*)中表达出的人体巨细胞集落刺激因子(human granulocyte-macrophage colony stimulating factor, hGMCSF)的一步纯化。

4.2 基因诊断和基因治疗 内含肽的插入会导致宿主蛋白的结构和功能发生改变, 但经剪接后宿主蛋白能恢复原有的结构和功能。利用这一特点可将内含肽插入重组基因的内部, 使细胞质内合成的重组蛋白降低自身的疏水性从而得以透过细胞质到达线粒体内部, 再通过内含肽自我剪接使重组蛋白恢复原有的功能和活性, 由此达到线粒体基因治疗的目的(de Grey 2000)。将内含肽插入到核酸代谢相关基因的内部能干扰到核酸代谢相关蛋白质的表达, 因此内含肽可作为药物靶点, 而阻断内含肽自我剪接的物质将成为基因治疗药物。Paulus (2003)利用内含肽成功扰乱与结核分支杆菌DNA修复和复制相关的蛋白——RecA和DnaB的合成, 导致结核分支杆菌生长受到抑制, 甚至细胞死亡。

4.3 突变体的构建 利用温度敏感型内含肽可构建温敏型突变体, 只需改变温度条件就可以开启或关闭目的基因的表达。温敏型内含肽Sce VMA所介导的剪接反应在18℃条件下可以正常进行, 随着温度升高反应逐渐减缓, 到30℃时停止。Gal80是果蝇(*Drosophila melanogaster*) Gal4转录因子的负调控子。将温度敏感型Sce VMA内含肽插入到Gal80中, 在适宜温度条件下, 内含肽正常剪接, 活性Gal80正常合成, 导致Gal4被抑制, β-半乳糖苷酶不能合成, 果蝇不能利用乳糖; 而在限制温度下, 内含肽不能正常剪接, 活性Gal80无法合成, Gal4仍保有活性, β-半乳糖苷酶可以合成, 果蝇能够利用乳糖(Zeidler等2004)。

4.4 毒素蛋白的合成 利用内含肽可以制备毒性多肽样品(Evans等1998)。Wu等(2002)利用Mtu

RecA蛋白质内含肽在大肠杆菌中表达了对大肠杆菌具有极强致死作用的高活性的I-TevI核酸内切酶。内含肽在宿主细胞中本底水平的剪接反应可导致少量毒性蛋白产生,影响宿主细胞生长。此时可采用断裂型内含肽(如*Ssp dnaE*)来制备目标蛋白,即在2个宿主细胞中分别表达目标蛋白N端与*Ssp dnaE*内含肽N端(1~123)肽段,以及目标蛋白C端与*Ssp dnaE*内含肽C端(124~159)肽段的融合蛋白,再将2种融合蛋白在体外混合进行反式剪接,获得了完整的目标蛋白(Mills等1998)。

4.5 介导蛋白质环化和多聚体制备 内含肽还可用来制备蛋白质串联多聚体和环肽(Evans等1999)。将目标基因插入2个内含肽之间,经转录、翻译、蛋白质剪接后目的蛋白N端留下1个Cys残基,目的蛋白C端留下硫酯键,再通过目的蛋白N端Cys的SH基团进攻C端硫酯键完成环化。内含肽介导的蛋白质环化技术可用于研究蛋白质作用机理,Volkman等(2010)利用断裂型内含肽构建了环状的弧菌(*Vibrio harveyi*)酰基-载体蛋白质(acyl carrier protein, ACP),研究了酰基转移中ACP蛋白伸展所需的条件。

4.6 介导蛋白质连接 内含肽还可以介导蛋白连接(intein mediated protein ligation, IPL)或表达蛋白连接(expressed protein ligation, EPL)。将目的基因连接在内含肽的N端,在还原剂(如巯基试剂)存在时,经过蛋白质剪接后所得的目的蛋白的C端留下1个活泼的硫脂键,该硫酯键可用于连接标记物或探针(如自旋标记或荧光标签)、其他蛋白质和非天然氨基酸(David等2004)(如生物素化或磷酸化的氨基酸),从而为研究蛋白与蛋白之间的相互作用以及目标蛋白在细胞内的代谢路径提供方便。David等(2003)采用IPL方法对人白介素8(human interleukin-8, hIL-8)的末端羧基进行荧光标记,在HL60细胞中研究了IL-8和几种IL-8受体亚型之间的相互作用以及IL-8与受体复合物的摄取、内化过程。Zhang等(2001)用重叠的寡聚核苷酸构建了一个有效的微小内含肽检测系统,在微小内含肽N端和C端之间插入亲和标记,把绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)连在微小内含肽C端,目的蛋白连在微小内含肽的N端,通过检测荧光蛋白就能检测到融合蛋白的表达。Ozawa等

(2001)则用这个系统检测2种细菌蛋白之间的相互作用:把2个具有相互作用的目的蛋白分别融合进蛋白质内含肽的2个片段,再直接与分开的增强型绿荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的C端和N端相连,蛋白剪接作用产生EGFP荧光团。

通过IPL还可将接蛋白质与核酸连接起来,形成蛋白质-核酸杂合体,获得双功能的蛋白质-核酸芯片,此芯片可同时进行蛋白质和核酸2个水平上的检测。Burbulis等(2005)采用IPL合成多肽-DNA杂合分子,当杂合分子中的亲和受体与吸附在固相支持介质上的配体结合后洗去游离的杂合分子,再加入DNA聚合酶以及与杂合分子中DNA序列互补的引物进行PCR扩增,通过对PCR产物的定量分析,可使对配体的检测下限达到150个分子。

4.7 在转基因植物中的应用 断裂型内含肽的应用可以防止基因水平转移导致的转基因污染,这是由于拆分后的基因片段无法翻译成为功能性全长蛋白质。植物的遗传是花粉遗传,质体中的DNA并不遗传给下一代,如果将目的基因进行拆分,再与断裂型内含肽融合后分别转化核基因组和质体基因组,可提高转基因植物的安全性。为了证明内含肽在核基因组和质体基因组中均可进行反式剪接,将抗除草剂基因进行拆分,再与断裂型内含肽结合,然后分别转化叶绿体基因组和核基因组,核基因组中还包含有叶绿体导向的信号肽序列,结果证实了完整抗除草剂蛋白质的存在,表明位于不同基因组中的断裂型内含肽可以进行反式剪接(Sun等2001; Chin等2003; Chen等2001)。除了除草剂基因,其它基因也可以进行拆分。Yang等(2003)将 β -半乳糖苷酶基因拆分后分别与断裂型内含肽的2个片段构成融合基因,然后共转化拟南芥,随后在拟南芥中观察到有活性的 β -半乳糖苷酶。

内含肽的应用可以实现蛋白质在植物活体中的组装,从而控制植株性状,创新种质资源,如雄性不育植株的获得。Kempe等(2009)将barnase毒蛋白拆分成2个片段,然后分别与断裂型内含肽*Ssp DnaB*的N、C端进行融合然后分别转化小麦(*Triticum aestivum*),在绒毡层特异性启动子的控制下,融合基因转化所得的2种植株的杂交后代F₁代花药绒毡败育从而获得不育株。早在2008年,Gils等研

研究者就利用上述技术建立了新型的断裂型内含肽介导的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)两系配套杂交育种系统。首先将 *dnaB* 的 N 端、*barnase* 基因的 N 端、乙酰乳酸合成酶基因 (*acetolactate synthase*, *ALS*) 的 N 端和 *dnaE* 的 N 端融合在一起构建成 A_1 系, *dnaB* 的 C 端、*barnase* 的 C 端、*ALS* 的 C 端和 *dnaE* 的 C 端融合在一起构建成 A_2 系, A_1 和 A_2 连接起来构建成原初的雄性不育系——A 系(图 3)。A 系与带有 PhiC31 重组酶位点的 B 系进行杂交, F_2 代即

可获得互为等位基因系的 A_1 系和 A_2 系, A_1 系与 A_2 系杂交获得同时带有 N-融合基因和 C-融合基因的后代—— A_1A_2 杂合体, 经过内含肽介导的蛋白质剪切, 完整的 *barnase* 毒蛋白和乙酰乳酸合成酶被表达出来, 使得 F_3 代即是雄性不育又能抗除草剂。利用 A_1A_2 杂合体就可以进行杂交种子的生产、雄性不育系的保持和转育(图 4)。此系统和现行的杂交育种系统相比, 能大大简化制种过程、更好的生产和保持亲本以及恢复杂交种子的生产力。

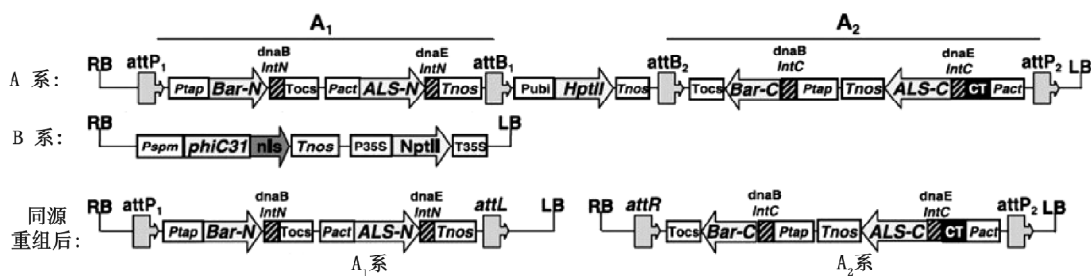


图3 重组前和重组后的载体示意图(Gils 等 2008)

Fig.3 Structure of the constructs before and after recombination (modified from Gils et al 2008)

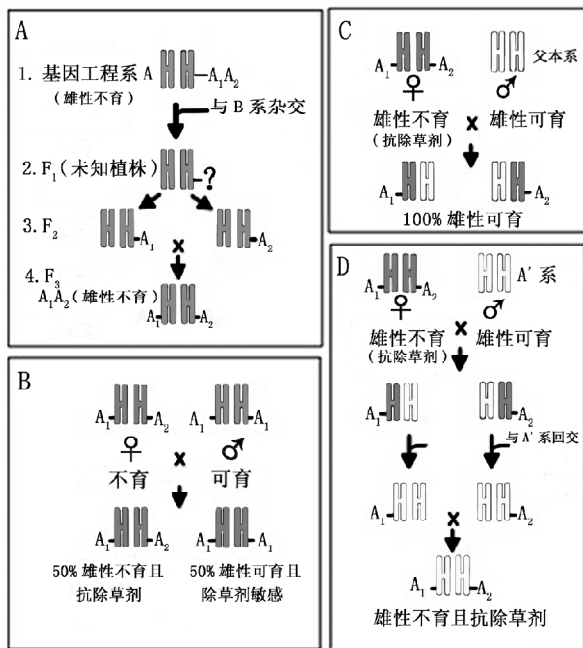


图4 杂交种子生产策略(Gils 等 2008)

Fig.4 Strategy for the production of hybrid seed (modified from Gils et al 2008)

A: 雄性不育系的构建; B: 雄性不育系的保持; C: 杂交种子的生产; D: 雄性不育系的转育。

5 展望

虽然内含肽的发现和只有短短的20年时间, 但无论是在基础科学研究中还是在医学实践中, 内含肽的应用潜力已充分表现出来, 尤其是内含肽介导的蛋白质纯化技术、蛋白质连接技术已日趋成熟。内含肽在转基因植物上的应用也开始崭露头角。随着研究的深入, 内含肽将会在更多的生物技术领域和生产实践中发挥重要作用。然而, 内含肽在生物技术领域中的全面应用还需要周全的考虑, 如表达载体的选择、适宜内含肽的选择、内含肽中恰当突变的引入、表达系统中合适密码子的使用、目的蛋白中内含肽适宜插入位点的选择、表达条件的确定和优化、蛋白质剪接条件的确定等。只有充分考虑并解决以上的问题, 才能更好的发挥内含肽的作用, 从而达到简化生产、实验过程, 降低成本的目的。

参考文献

Burbulis I, Yamaguchi K, Gordon A, Carlson R, Brent R (2005). Using protein-DNA chimeras to detect and count small numbers of molecules. *Nat Methods*, 2 (1): 31~37

- Chen L, Pradhan S, Evans TC Jr (2001). Herbicide resistance from a divided EPSPS protein: the split *Synechocystis* DnaE intein as an *in vivo* affinity domain. *Gene*, 263 (1-2): 39~48
- Chin HG, Kim GD, Marin I, Mersha F, Evans TC Jr, Chen L, Xu MQ, Pradhan S (2003). Protein trans-splicing in transgenic plant chloroplast: reconstruction of herbicide resistance from split genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (8): 4510~4515
- David R, Machova Z, Beck-Sickinger AG (2003). Semisynthesis and application of carboxyfluorescein-labelled biologically active human interleukin-8. *Biol Chem*, 384 (12): 1619~1630
- David R, Richter MP, Beck-Sickinger AG (2004). Expressed protein ligation, method and applications. *Eur J Biochem*, 271 (4): 663~677
- de Grey AD Jr (2000). Mitochondrial gene therapy: an arena for the biomedical use of inteins. *Trends Biotechnol*, 18 (9): 394~399
- Duan X, Gimble FS, Quioco FA (1997). Crystal structure of PI-SceI, a homing endonuclease with protein splicing activity. *Cell*, 89 (4): 555~564
- Evans TC Jr, Benner J, Xu MQ (1998). Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element. *Protein Sci*, 7 (11): 2256~2264
- Evans TC Jr, Benner J, Xu MQ (1999). The cyclization and polymerization of bacterially expressed proteins using modified self-splicing inteins. *J Biol Chem*, 274 (26): 18359~18363
- Gils M, Marillonnet S, Werner S, Grützner R, Giritich A, Engler C, Schachschneider R, Klimyuk V, Gleba Y (2008). A novel hybrid seed system for plants. *Plant Biotechnol J*, 6 (3): 226~235
- Guhan N, Muniyappa K (2003a). Structural and functional characteristics of homing endonucleases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 38 (3): 199~248
- Guhan N, Muniyappa K (2003b). *Mycobacterium tuberculosis* RecA intein, a LAGLIDADG homing endonuclease, displays Mn^{2+} and DNA-dependent ATPase activity. *Nucleic Acids Res*, 31 (14): 4184~4191
- Heath PJ, Stephens KM, Monnat RJ Jr, Stoddard BL (1997). The structure of I-Crel, a group I intron-encoded homing endonuclease. *Nat Struct Biol*, 4 (6): 468~476
- Kane PM, Yamashiro CT, Wolczyk DF, Neff N, Goebel M, Stevens TH (1990). Protein splicing converts the yeast *TFPI* gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H^+ -adenosine triphosphatase. *Science*, 250 (4981): 651~657
- Kempe K, Rubtsova M, Gils M (2009). Intein-mediated protein assembly in transgenic wheat: production of active barnase and acetolactate synthase from split genes. *Plant Biotechnol J*, 7 (3): 283~297
- Ku WY, Liu YW, Hsu YC, Liao CC, Liang PH, Yuan HS, Chak KF (2002). The zinc ion in the HNH motif of the endonuclease domain of colicin E7 is not required for DNA binding but is essential for DNA hydrolysis. *Nucleic Acid Res*, 30 (7): 1670~1678
- Liu XQ (2000). Protein-splicing intein: Genetic mobility, origin, and evolution. *Annu Rev Genet*, 34: 61~76
- Mills KV, Lew BM, Jiang S, Paulus H (1998). Protein splicing in *trans* by purified N- and C-terminal fragments of the *Mycobacterium tuberculosis* RecA intein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (7): 3543~3548
- Ozawa T, Takeuchi TM, Kaihara A, Sato M, Umezawa Y (2001). Protein splicing-based reconstitution of split green fluorescent protein for monitoring protein-protein interactions in bacteria: improved sensitivity and reduced screening time. *Anal Chem*, 73 (24): 5866~5874
- Paulus H (2003). Inteins as targets for potential antimycobacterial drugs. *Front Biosci*, 8: S1157~S1165
- Perler FB, Davis EO, Dean GE, Gimble FS, Jack WE, Neff N, Noren CJ, Thorner J, Belfort M (1994). Protein splicing elements: inteins and exteins - a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucleic Acids Res*, 22 (7): 1125~1127
- Perler FB, Olsen GJ, Adam E (1997). Compilation and analysis of intein sequences. *Nucleic Acids Res*, 25 (6): 1087~1093
- Petrokovski S (1994). Conserved sequence features of inteins (protein introns) and their use in identifying new inteins and related proteins. *Protein Sci*, 3 (12): 2340~2350
- Petrokovski S (1998). Modular organization of inteins and C-terminal autocatalytic domains. *Protein Sci*, 7 (1): 64~71
- Srinivasa Babu K, Muthukumar T, Antony A, Prem Singh Samuel SD, Balamurali M, Murugan V, Meenakshisundaram S (2009). Single step intein-mediated purification of hGMCSF expressed in salt-inducible *E. coli*. *Biotechnol Lett*, 31 (5): 659~664
- Sun L, Ghosh I, Paulus H, Xu MQ (2001). Protein *trans*-splicing to produce herbicide-resistant acetolactate synthase. *Appl Environ Microbiol*, 67 (3): 1025~1029
- Sun P, Ye S, Ferrandon S, Evans TC, Xu MQ, Rao Z (2005). Crystal structures of an intein from the split *dnaE* gene of *Synechocystis* sp. PCC6803 reveal the catalytic model without the penultimate histidine and the mechanism of zinc ion inhibition of protein splicing. *J Mol Biol*, 353 (5): 1093~1105
- Volkman G, Murphy PW, Rowland EE, Cronan JE Jr, Liu XQ, Blouin C, Byers DM (2010). Intein-mediated cyclization of bacterial acyl carrier protein stabilizes its folded conformation but does not abolish function. *J Biol Chem*, 285 (12): 8605~8614
- Wu H, Hu Z, Liu XQ (1998). Protein *trans*-splicing by a split intein encoded in a split *DnaE* gene of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (16): 9226~9231
- Wu W, Wood DW, Belfort G, Derbyshire V, Belfort M (2002). Intein-mediated purification of cytotoxic endonuclease I-*TevI* by insertional inactivation and pH-controllable splicing. *Nucleic Acids Res*, 30: 4864~4871
- Xu MQ, Southworth MW, Mersha FB, Hornstra LJ, Perler FB (1993). *In vitro* protein splicing of purified precursor and the identification of a branched intermediate. *Cell*, 75 (7): 1371~1377
- Yang J, Fox GC Jr, Henry-Smith TV (2003). Intein-mediated assembly of a functional β -glucuronidase in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (6): 3513~3518
- Zeidler MP, Tan C, Bellaiche Y, Cherry S, Häder S, Gayko U, Perrimon N (2004). Temperature-sensitive control of protein activity by conditionally splicing inteins. *Nat Biotechnol*, 22 (7): 871~876
- Zhang AH, Gonzalez SM, Cantor EJ, Chong SR (2001). Construction of a mini-intein fusion system to allow both direct monitoring of soluble protein expression and rapid purification of target proteins. *Gene*, 275 (2): 241~252