断裂内含肽介导的抗体铰链区氨基酸序列的还原剂非依赖型反式剪接

张　静[#]，张婕雨[#]，惠　子，朱建伟，陈俊升[*]
（上海交通大学药学院，细胞工程及抗体药物教育部工程研究中心，上海 200240）

摘要：断裂内含肽介导的蛋白质反式剪接在蛋白质工程领域有巨大的应用前景。天然的断裂内含肽 Aes123 PolB1 氨基酸序列中不含半胱氨酸，且反应无需还原剂催化，适用于结构中含二硫键的蛋白质的剪接。该研究尝试使用 Aes123 PolB1 对 IgG 抗体铰链区氨基酸序列 EPK/SCD 进行反式剪接，结果表明，Aes123 PolB1 可以在体内外剪接 EPK/SCD 序列。并对影响内含肽反式剪接的因素如氯化钠浓度、pH 值和温度进行了考察，结果表明在所考察范围内，Aes123 PolB1 均能在 EPK/SCD 中进行反式剪接且产物生成率相当。该研究实现了抗体铰链区氨基酸序列 EPK/SCD 在非还原条件下的反式剪接，为断裂内含肽应用于抗体药物尤其是双特异性抗体药物的非还原无痕剪接提供了理论和试验依据。

关键字：断裂内含肽；反式剪接；还原剂非依赖型
中图分类号：Q783　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)10-1424-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.10.007

Split Intein Mediated Reducing-agent-independent Trans-splicing of the Antibody Hinge-region Sequence

ZHANG Jing[#], ZHANG Jieyu[#], HUI Zi, ZHU Jianwei, CHEN Junsheng*
(*Engineering Research Center of Cell Therapeutic Antibody (MOE), School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240*)

ABSTRACT: Split intein-mediated protein trans-splicing is a promising technique with excellent prospects in many protein engineering fields. The naturally occurring cysteine-less split intein, Aes123 PolB1, can perform trans-splicing without reducing agents, which is particularly suitable for splicing proteins containing disulfide bonds. In this study, Aes123 PolB1 was used to splice proteins with the junction sequence EPK/SCD derived from the IgG hinge region in trans. The results showed that Aes123 PolB1 could successfully splice proteins with the EPK/SCD sequence without reducing agents. The factors that might affect the splicing activity, such as the concentration of sodium chloride, pH value, and temperature, were also investigated, and the results showed that the splicing reaction of Aes123 PolB1 could perform well in the EPK/SCD sequence. In this study, trans-splicing was performed under non-reducing conditions in the IgG hinge region amino acid sequences, which provided a theoretical and experimental basis for the application of split intein to seamlessly splicing antibody drugs, especially bispecific antibodies, under non-reducing conditions.

Key Words: split intein; trans-splicing; reducing-agent-independent

断裂内含肽（split intein）能介导蛋白质反式剪接（protein trans-splicing，PTS），将自身从前体中剪除，同时将两端的外显肽（extein）以肽键连接为成熟蛋白，是蛋白质工程的重要工具[1]。已有报道将断裂内含肽应用于多种生物技术药物研发领域，如片段抗体或纳米抗体、多肽疫苗的环化[2—4]、免疫毒素的制备或按需重构[5—7]、Fc 融合蛋白的按需装

[#]对文章贡献等同。
收稿日期：2021-09-09
基金项目：国家自然科学基金资助项目(81773621)
作者简介：张　静(1996—)，女，硕士研究生，专业方向：生物技术药物。
张婕雨(1997—)，女，硕士研究生，专业方向：生物技术药物。
通信作者：陈俊升(1985—)，男，博士研究生，助理研究员，从事生物技术药物研发。
E-mail：js.chan@sjtu.edu.cn

配[8]、病毒样颗粒的表面修饰[9]、基因治疗[10—12]。前期，本实验室基于蛋白质反式剪接开发了双特异性抗体装配合成方法（bispecific antibody by protein trans-splicing，BAPTS），该方法解决了类免疫球蛋白G（IgG）型双特异性抗体（IgG-like bispecific antibody）制备过程中的轻重链错配难题[13—14]，以BAPTS为基础，德国默克与勃林格殷格翰团队发展了双特异性抗体的高通量快速筛选技术[15]。

现有研究深入、应用广泛的*Npu* DnaE、*Ssp* DnaE等断裂内含肽及其介导的PTS反应在应用中存在两方面问题，一是剪接反应依赖还原剂触发，在剪接含二硫键的蛋白质时，还原剂的使用可能会影响产物蛋白中的二硫键，进而影响产物蛋白的结构，须引入再氧化步骤以得到剪接产物；二是剪接反应高度依赖于侧翼临近氨基酸序列，较窄的侧翼氨基酸序列（flanking sequences）底物谱将导致在剪接产物中残留外源氨基酸[16]。本实验室在开发BAPTS时采用了*Npu* DnaE断裂内含肽，因此在合成双特异性抗体时也遭遇上述问题。为解决在BAPTS中外源氨基酸残留的缺陷，前期采用Npu_{GEP}突变体，在还原条件下实现了抗体铰链区氨基酸序列PKS/CDK中的蛋白质反式剪接，为类IgG型双特异性抗体无痕剪接提供了理论和试验依据[17]，但还原剂对富含二硫键的抗体片段的影响仍有待解决。

近期，BHAGAWATI等从杀鲑气单胞菌（*Aeromonas salmonicida*）噬菌体基因组中挖掘到嗜中温的无半胱氨酸天然断裂内含肽Aes123 PolB1，该断裂内含肽的催化活性氨基酸组合为Ser1/Ser+1，无需还原剂催化反式剪接反应，可用于抗体等富含二硫键的蛋白质的反式剪接[18]。但Aes123 PolB1对剪接位点（splicing junction）氨基酸序列的宽泛性尚无系统研究报导，故其能否识别IgG1型抗体铰链区序列，用于BAPTS介导的抗体装配仍是未知。

本研究对不依赖还原剂的断裂内含肽Aes123 PolB1在IgG1型抗体铰链区氨基酸序列EPK/SCD中的剪接情况进行探究，为双特异性抗体在非还原条件下的模块化无痕装配合成提供理论和试验依据。

1 仪器与试药

Tanon 1600型DNA凝胶电泳仪和凝胶成像分析系统（上海天能科技有限公司）；PowerPac Basic电源和Mini-PROTEAN Tetra电泳槽（美国Bio-Rad公司）；LRH-70F型生化培养箱（上海天呈实验仪器制造有限公司）；Centrifuge LYNX 4000型离心机（美国Thermo Scientific公司）；Centrifuge 5418型台式离心机（德国Eppendorf公司）；AH-1500型高压均质机（加拿大ATS Engineering公司）。

PCR所用DNA聚合酶、连接酶和限制性内切酶均购自宝生物工程（大连）有限公司；快速定点突变试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；质粒抽提试剂盒和PCR产物回收试剂盒均购自美国Axygen公司；增强型化学发光试剂（ECL）发光显色液购自美国Millipore公司；异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）购自美国Sigma公司；抗组氨酸标签抗体（anti-His）、抗绿色荧光蛋白抗体（anti-eGFP）、抗麦芽糖结合蛋白标签抗体（anti-MBP）和羊抗鼠二抗（goat anti-mouse IgG）、5×蛋白质加样缓冲液均购自生工生物工程（上海）股份有限公司；β-巯基乙醇购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；Bradford蛋白浓度测定试剂盒及考马斯亮蓝快速染色液购自上海碧云天生物技术有限公司；镍金属螯合亲和色谱填料（常州天地人和生物科技有限公司）；Amicon Ultra离心超滤管（美国Millipore公司，截留分子量30 000）；其他试剂均为市售分析纯。

大肠埃希菌DH5α及BL21（DE3）感受态细胞购自苏州新赛美生物科技有限公司；质粒pMAL-c5E、pET-30a(+)为本实验室保藏；编码包含天然N端、C端外显肽的Aes123 PolB1连续型内含肽基因*DTD-Aes-SVY*由南京金斯瑞生物科技有限公司合成并克隆至pET-41a(+)的*Spe* Ⅰ/*Hind*Ⅲ之间，得到重组表达质粒pET-41a(+)/DTD-Aes-SVY-6H。

2 方法与结果

2.1 重组表达质粒的构建

以pET-41a(+)/DTD-Aes-SVY-6H为模板，利用快速定点突变试剂盒，以表1所列引物突变连续型Aes内含肽的剪接位点氨基酸序列，突变位点以下划线标注［引物合成及测序服务由生工生物工程（上海）股份有限公司提供］。利用引物N-F、N-R将N端剪接位点的氨基酸序列由DTD突变为EPK，进一步利用引物C-F、C-R将C端剪接位点

的氨基酸序列由 SVY 突变为 SCD，得到重组质粒 pET-41a(+)/EPK-Aes-SCD-6H。

表 1　本试验中所用引物

Tab.1　Primers Used in This Experiment

引物名称	引物序列(5'-3')
N-F	TACATAGAACCTAAATCTGTTGTTGGTGACACCATTATTG
N-R	AACAGATTTAGGTTCTATGTAACTAGTTGAACCATCCGATTT
C-F	AACTCGTGCGACTTGAACAAGCTTGCGGCC
C-R	GTTCAAGTCGCACGAGTTATGGACCAATATATCGTTTC

将编码 EPK-AesN 的片段克隆至 pMAL-c5E 的 *Sac* Ⅰ/*Bam*H Ⅰ之间，构建 N 端融合蛋白 MBP-EPK-AesN-6H 的重组表达质粒，经测序验证后命名为 pMAL-c5E/EPK-AesN-6H；将编码 AesC-SCD-eGFP 的片段克隆至 pET-30a(+) 的 *Nde* Ⅰ/*Xho* Ⅰ之间，构建 C 端融合蛋白 AesC-SCD-eGFP-6H 的重组表达质粒，经测序验证后命名为 pET-30a(+)/AesC-SCD-eGFP-6H。

2.2　重组蛋白的诱导表达及纯化

2.2.1　重组蛋白的诱导表达

将重组表达质粒分别转化入大肠埃希菌 BL21(DE3) 中得到相应重组蛋白表达菌株。挑取单克隆菌落分别接种至含有对应抗性的 LB 培养基 5 ml 中，在 37 ℃、220 r/min 下过夜培养，次日按 1%的接种量将过夜培养物接种于含有相同抗性的 LB 培养基中，37 ℃、220 r/min 培养至 OD_{600} 达 0.5，加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L，于 25 ℃、220 r/min 下过夜诱导。分别取诱导前、诱导后、裂解后上清液与裂解后沉淀，加入 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）蛋白上样缓冲液煮沸制样，以备后续检测，本试验中表达的蛋白及其理论相对分子质量见表 2。

2.2.2　重组蛋白的纯化

将转化有重组蛋白表达质粒的表达菌株按“**2.2.1**”项下条件进行过夜诱导表达，诱导物于 4 ℃、离心 (5 114×*g*) 15 min，收集菌体，用上样缓冲液（含 20 mmol/L Tris，150 mmol/L NaCl，20 mmol/L 咪唑；pH 7.5）40 ml 将沉淀菌体重悬分散后，用高压均质机在 90 MPa、4 ℃下破菌 5 min 后，收集破裂菌液。裂解液于 4 ℃、离心 (29 461×*g*) 30 min，收集上清液并用 0.45 μm 滤膜过滤后，分别上样于镍金属螯合亲和色谱柱，用上样缓冲液和 2 mol/L 咪唑母液配制不同浓度的缓冲液进行梯度洗脱，收集纯化过程中的流穿及各洗脱浓度下的样品，进行 12% SDS-PAGE 检测，合并含有目的蛋白的收集液，将缓冲液置换为剪接缓冲液（含 50 mmol/L Tris，150 mmol/L NaCl；pH 7.5），并依照厂家说明书以 Bradford 法测定浓度。

表 2　IPTG 诱导表达的重组蛋白

Tab.2　IPTG-induced Expression of Recombinant Proteins

重组蛋白名称	理论相对分子质量/×10^3
GST-DTD-Aes-SVY-6H	46.8
GST-EPK-Aes-SCD-6H	46.8
GST-6H	28.1
AesC-SCD-eGFP-6H	33.3
MBP-EPK-AesN-6H	55.8
MBP-eGFP-6H	69.5

其中内含肽 N 端重组蛋白 MBP-EPK-AesN-6H 及 C 端重组蛋白 AesC-SCD-eGFP-6H 经诱导表达及纯化后，其 12% SDS-PAGE 结果显示，内含肽 N 端重组蛋白在约 60 000 处出现条带（图 1A），符合 MBP-EPK-AesN-6H 的理论相对分子质量；内含肽 C 段重组蛋白在约 35 000 处出现条带（图 1B），符合 AesC-SCD-eGFP-6H 的理论相对分子质量，重组蛋白在 100 mmol/L 咪唑条件下可被集中洗脱，合并含有目的蛋白的洗脱液，超滤浓缩后待后续使用。

2.3　Aes123 PolB1 的体内剪接反应

将转化有 pET-41a(+)/DTD-Aes-SVY-6H 及 pET-41a(+)/EPK-Aes-SCD-6H 质粒的表达菌株，按“**2.2.1**”项下方法进行诱导表达，通过蛋白质印迹法对诱导表达后的总蛋白进行检测，考察 Aes123 PolB1 的体内剪接。

天然断裂内含肽 Aes123 PolB1 的天然 N 端侧翼氨基酸序列为 DTD，C 端侧翼氨基酸序列为 SVY，其中的 C+1 位 Ser 为反式剪接活性的必须氨基酸。IgG1 型抗体铰链区氨基酸序列为 EPKSCDKTHTCP，为使 Aes 内含肽的剪接反应能够在 IgG1 铰链区氨基酸序列中进行，选择剪接位点为 EPK/SCD。同时，将天然断裂内含肽 Aes123

PolB1 融合为连续型内含肽，以略过断裂内含肽反应过程中活性构象重构步骤，并在连续型 Aes123 PolB1 内含肽的 N 端融合 GST 蛋白，在 C 端融合 His 标签，构建前体蛋白 GST-Aes-6H，剪接产物为 GST-6H。蛋白质印迹法检测结果如图 2 所示，携带天然剪接点氨基酸 DTD/SVY 的重组蛋白过夜诱导物在约 27 000 处出现条带，符合剪接产物 GST-6H 的相对分子质量大小，但在预计的前体蛋白（相对分子质量大小 47 000）处没有出现特异性条带；以抗体铰链区氨基酸序列 EPK/SCD 为剪接点氨基酸的重组蛋白的过夜诱导物在约 47 000 处出现条带，符合前体蛋白 GST-Aes-6H 的相对分子质量大小，同时在约 28 000 处出现条带，符合剪接产物 GST-6H 的相对分子质量大小。

上述结果表明，连续形式的野生型 Aes123 PolB1 能够识别 N 端侧翼氨基酸序列为 EPK、C 端侧翼氨基酸序列为 SCD 的外显肽，并发生剪接反应。

2.4 断裂内含肽 Aes 在抗体铰链区氨基酸序列中的体外反式剪接

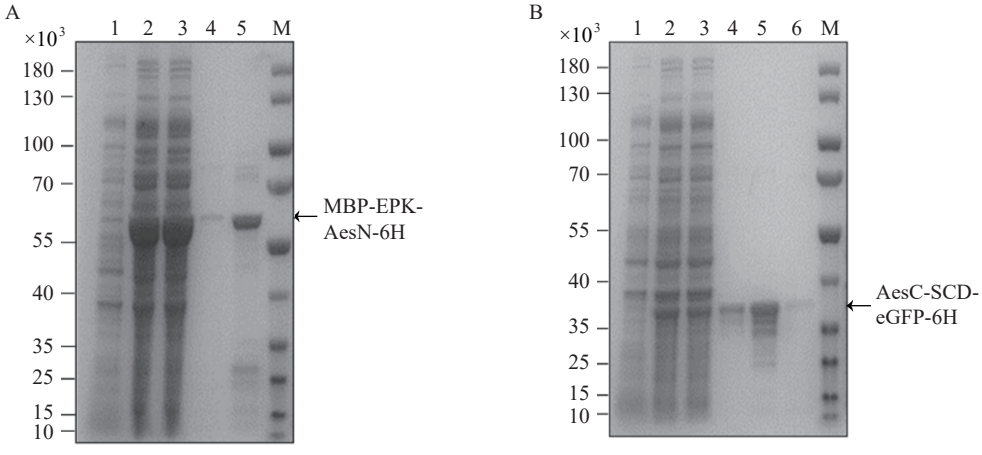
天然 Aes123 PolB1 内含肽在 IgG1 型抗体铰链区氨基酸序列 EPK/SCD 中具有体内剪接活性，进一步通过 SDS-PAGE 及蛋白质印迹法检测其体外反式剪接活性。

将“**2.2.2**”项下纯化得到的 N 片段反应底物 MBP-EPK-AesN-6H 与 C 片段反应底物 AesC-SCD-eGFP-6H 以等物质的量比例混合，在 37 ℃下反应 1 h 后加入 SDS-PAGE 5× 上样缓冲液终止反应，反应体系分别使用抗 His-tag 抗体、抗 eGFP 抗体及抗 MBP 抗体为一抗进行蛋白质印迹法检测；并用考马斯亮蓝染色法对内含肽的剪接反应进行检测，使用 ImageJ（1.51k）软件扫描 SDS-PAGE 电泳图上对应条带的光密度并计算产物生成率，产物生成率计算公式如下。

产物生成率 =Splicing product/（Splicing product+AesC-SCD-eGFP-6H+MBP-EPK-AesN-6H）

式中：Splicing product 即 MBP-eGFP-6H；上述名称均代表相应条带的光密度值。

蛋白质印迹法结果如图 3 所示，MBP-EPK-AesN-6H 与 AesC-SCD-eGFP-6H 孵育后在约 70 000 处出现新条带，大小与剪接产物 MBP-eGFP 的理论相对分子质量相符。表明野生型 Aes123 PolB1 能够识别 IgG1 型抗体铰链区氨基酸序列 EPK/SCD 为剪接点氨基酸的外显肽，在非还原条件下发生蛋白质反式剪接。

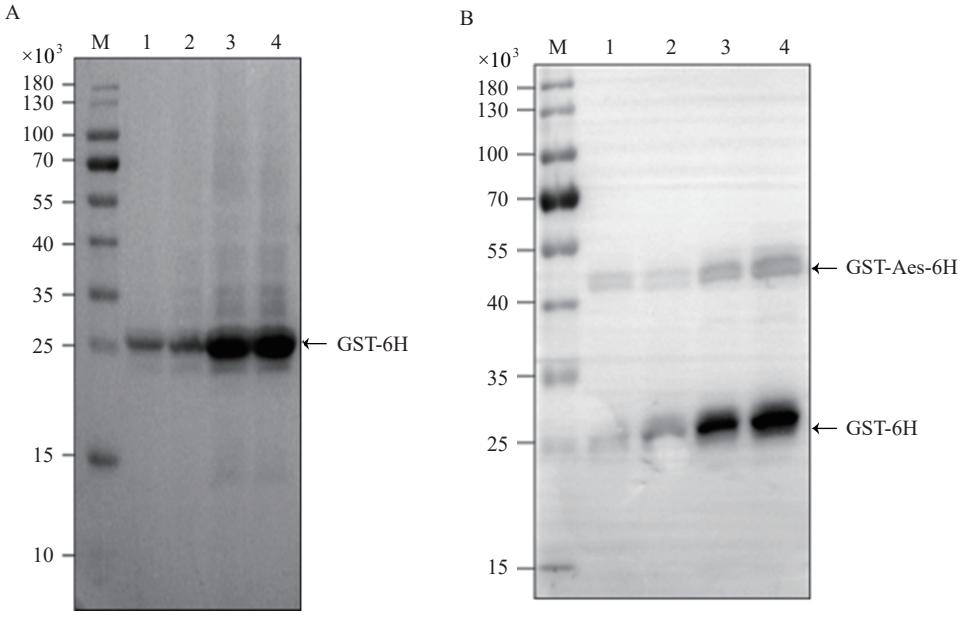


A：MBP-EPK-AesN-6H，B：AesC-SCD-eGFP-6H。

M—Marker；1—诱导前；2—诱导后；3—镍柱流穿液；4—40 mmol/L 咪唑洗脱液；5—100 mmol/L 咪唑洗脱液；6—200 mmol/L 咪唑洗脱液。

图 1 重组蛋白的表达与纯化的 SDS-PAGE 分析

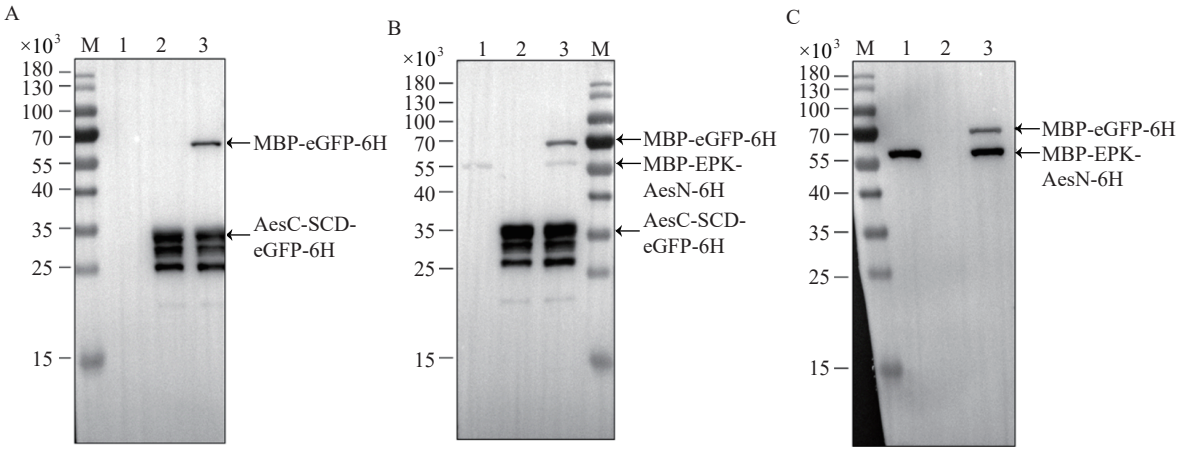
Fig.1 SDS-PAGE Analysis of Expression and Purification of Recombinant Proteins



A：剪接位点氨基酸序列为天然侧翼氨基酸序列 DTD/SVY，B：剪接位点氨基酸序列为 IgG1 型抗体铰链区序列 EPK/SCD。
M—Marker；1—诱导前；2—未诱导；3—IPTG（终浓度 0.5 mmol/L）诱导；4—IPTG（终浓度 1 mmol/L）诱导。

图 2　蛋白质印迹法检测内含肽 Aes123 PolB1 的体内剪接反应

Fig.2　Western Blot Analysis of *in vivo* Splicing of Aes123 PolB1



A：以抗 eGFP 抗体为一抗，B：抗组氨酸标签抗体为一抗，C：抗 MBP 抗体为一抗。
M—Marker；1—重组蛋白 MBP-EPK-AesN-6H；2—重组蛋白 AesC-SCD-eGFP-6H；3—反式剪接反应体系。

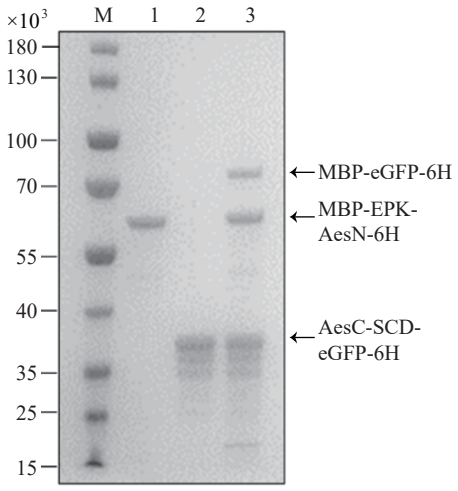
图 3　蛋白质印迹法检测 Aes123 PolB1 的体外反式剪接反应

Fig.3　Western Blot Analysis of *in vitro* Trans-splicing of Aes123 PolB1

以 12% SDS-PAGE 对 MBP-EPK-AesN-6H 及 AesC-SCD-eGFP-6H 的反应进行检测，结果如图 4 所示，经光密度扫描后计算得反式剪接产物生成率为 26%。

2.5　影响 Aes123 PolB1 反式剪接反应因素的探究

利用超滤离心管将纯化后蛋白的缓冲液置换为指定 pH 值、氯化钠浓度的剪接缓冲液，按“**2.4**”项下方法进行体外反式剪接，考察体外非还原条



M—Marker；1—重组蛋白 MBP-EPK-AesN-6H；2—重组蛋白 AesC-SCD-eGFP-6H；3—反式剪接反应体系。

图 4 SDS-PAGE 检测 Aes123 PolB1 的体外反式剪接反应

Fig.4 SDS-PAGE Analysis of *in vitro* Trans-splicing of Aes123 PolB1

件下氯化钠浓度（0 ～ 500 mmol/L）、pH 值（pH 6.0 ～ 9.0）、温度（4、25、30 和 37 ℃）等因素对 Aes123 PolB1 在 EPK/SCD 中反式剪接反应的影响。如图 5 所示，氯化钠浓度在 0 ～ 500 mmol/L 时，产物生成率为 25%～ 30%；pH 为 6 ～ 9 时，产物生成率为 20%～ 30%。对不同温度下内含肽的反应进行考察，结果如图 6 所示。在剪接缓冲液（含 50 mmol/L Tris，150 mmol/L NaCl，pH 7.5）中，所有考察的 4 个温度下，10 min 内产物生成率均快速达到 20%，随后产物缓慢生成，24 h 时产物生成率为 25%～ 30%。

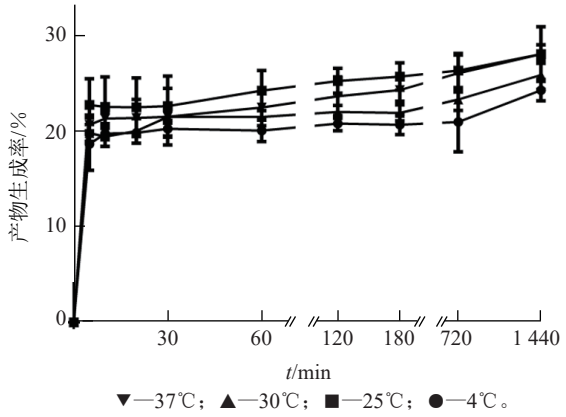


图 6 不同温度下 Aes123 PolB1 的反式剪接反应（*n*=3）

Fig.6 Trans-splicing Reaction of Aes123 PolB1 under Different Temperatures（*n*=3）

3 讨论和总结

断裂内含肽及其介导的蛋白质反式剪接，是蛋白质工程研究中的重要工具，特别是在蛋白质连接方面有广阔的应用前景。但目前研究较深入的断裂内含肽如 *Npu* DnaE、*Ssp* DnaE、gp41-1 等受还原剂依赖和侧翼氨基酸序列的限制，使其在富含二硫

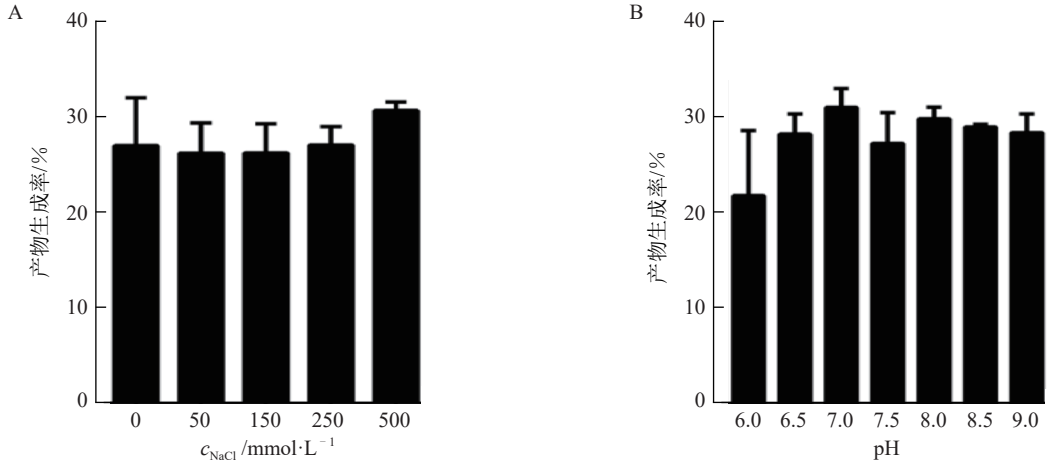


图 5 氯化钠浓度（A）以及 pH 值（B）对 Aes123 PolB1 体外反式剪接反应的影响（*n*=3）

Fig.5 Effects of Sodium Chloride Concentration（A）and pH Value（B）on *in vitro* Trans-splicing of Aes123 PolB1（*n*=3）

键的蛋白质药物（如抗体、双特异性抗体等）连接中的应用受限。

研究表明，Aes123 PolB1 能在非还原条件下反式剪接以 EPK/SCD 为剪接位点的外显肽，表明野生型 Aes123 PolB1 对 EPK/SCD 这一特定的氨基酸序列有一定程度的兼容性。但通常内含肽剪接位点序列底物谱较窄。本课题组另一项针对 Aes 内含肽定向进化的研究将连续型 Aes123 PolB1 插入卡那霉素抗性蛋白 APH(3')-Ⅰa 中不同 Ser 残基前，考察宿主对卡那霉素的抗性，结果表明在不同插入位点野生型 Aes 的剪接能力差异很大（尚未发表），表明 Aes123 PolB1 内含肽与 *Npu* DnaE 等断裂内含肽类似，剪接反应同样受到剪接位点氨基酸序列的影响。此外，体内外活性检测表明 Aes123 PolB1 对 EPK/SCD 的剪接活性较 DTD/SVY 有所下降，也印证了断裂内含肽的剪接活性与剪接位点氨基酸序列密切相关。因此，EPK/SCD 应是恰巧落在 Aes123 PolB1 的底物谱中，但并非较优底物。Aes123 PolB1 的底物谱，以及剪接位点氨基酸参与 Aes123 PolB1 剪接的机制仍需进一步研究。

天然断裂内含肽的 N、C 片段须重构为活性构象后才能进行剪接反应，已有研究表明，N、C 片段之间的重构主要由为静电相互作用和疏水相互作用驱动[19—20]，因而反应体系中 pH 值、离子强度、温度等因素将可能影响 N、C 片段之间的重构，进而对剪接反应造成影响。因此本研究在非还原条件下对 pH 值、氯化钠浓度、温度等因素进行了考察。结果表明，Aes123 PolB1 在所设置的 pH 值、氯化钠浓度、温度等条件内均能发生反式剪接，且剪接产物生成率均在 20%～30%内，说明 Aes123 PolB1 可在较宽的反应条件下对 EPK/SCD 进行反式剪接，有利于在含二硫键蛋白质装配中的应用。

此外，本试验观察到携带同样侧翼氨基酸序列的 Aes123 PolB1 的体内和体外剪接活性表现出较大差异。当 Aes123 PolB1 的 N、C 片段以等物质的量比例进行体外反式剪接反应时剪接产物生成率为 25%～30%，而前述连续形式 Aes123 PolB1 的体内剪接活性检测结果表明，当以 EPK/SCD 为侧翼氨基酸序列时，大部分前体蛋白都可转化为剪接产物（图 2）。由于断裂内含肽的 N、C 片段须首先重构为活性构象才能发生剪接反应，N、C 片段是否正确折叠及重构对剪接反应有巨大影响，因此推测体内外剪接活性的差异是由内含肽是否为断裂的形式所导致的。此外，本研究中观测到的较低的体外反式剪接产物生成率，与 BHAGAWATI 等报道的 Aes123 PolB1 相似[18]，他们同样推测较低的剪接产物生成率是由于一部分表达、纯化的野生型 AesN 片段不能够正确折叠，影响 N、C 片段间重构而导致的。结合体内外活性的差异，我们推测 AesN 的不正确折叠是导致反式剪接活性下降的主要因素。因此，进一步可通过促进 N、C 片段重构、或改善 AesN 片段折叠等研究，改进 Aes123 PolB1，以将其用于蛋白质反式剪接。

本研究表明野生型天然断裂内含肽 Aes123 PolB1 能够在非还原条件下介导以 IgG1 型抗体铰链区氨基酸序列 EPK/SCD 为剪接位点的蛋白质反式剪接，但剪接活性较天然剪接位点氨基酸序列 DTD/SVY 有所降低，为在非还原条件下进行双特异性抗体的模块化无痕装配提供了一定的理论和应用依据。

致谢：上海交通大学医工交叉基金（AE604102）给予支持。

参考文献：

[1] DI VENTURA B, MOOTZ H D. Switchable inteins for conditional protein splicing [J]. *Biol Chem*, 2019, **400**(4): 467-475.

[2] LIU C J, KOBASHIGAWA Y, YAMAUCHI S, *et al*. Convenient method of producing cyclic single-chain Fv antibodies by split-intein-mediated protein ligation and chaperone co-expression [J]. *J Biochem*, 2020, **168**(3): 257-263.

[3] HEMMI S, ASANO R, KIMURA K, *et al*. Construction of a circularly connected VHH bispecific antibody (cyclobody) for the desirable positioning of antigen-binding sites [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, **523**(1): 72-77.

[4] QI X M, XIONG S D. Intein-mediated backbone cyclization of VP1 protein enhanced protection of CVB3-

induced viral myocarditis [J]. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 41485.

[5] PIRZER T, BECHER K S, RIEKER M, *et al*. Generation of potent anti-HER1/2 immunotoxins by protein ligation using split inteins [J]. *ACS Chem Biol*, 2018, **13**(8): 2058-2066.

[6] WANG J, HAN L, CHEN J S, *et al*. Reduction of non-specific toxicity of immunotoxin by intein mediated reconstitution on target cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, **66**: 288-295.

[7] PURDE V, KUDRYASHOVA E, HEISLER D B, *et al*. Intein-mediated cytoplasmic reconstitution of a split toxin enables selective cell ablation in mixed populations and tumor xenografts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(36): 22090-22100.

[8] JAAKKONEN A, VOLKMANN G, IWAI H. An off-the-shelf approach for the production of Fc fusion proteins by protein trans-splicing towards generating a lectibody *in vitro* [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(11): 4011.

[9] WANG Z W, TANG S B, YUE N, *et al*. Development of HBc virus-like particles as modular nanocarrier by intein-mediated trans-splicing [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, **534**: 891-895.

[10] TRUONG D J J, KUHNER K, KUHN R, *et al*. Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, **43**(13): 6450-6458.

[11] MUIK A, REUL J, FRIEDEL T, *et al*. Covalent coupling of high-affinity ligands to the surface of viral vector particles by protein trans-splicing mediates cell type-specific gene transfer [J]. *Biomaterials*, 2017, **144**: 84-94.

[12] CHEN Y X, ZHI S Y, LIU W L, *et al*. Development of highly efficient dual-AAV split adenosine base editor for *in vivo* gene therapy [J]. *Small Methods*, 2020, **4**(9): 2000309.

[13] HAN L, CHEN J S, DING K, *et al*. Efficient generation of bispecific IgG antibodies by split intein mediated protein trans-splicing system [J]. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 8360.

[14] ZHOU Y X, ZONG H F, HAN L, *et al*. A novel bispecific antibody targeting CD3 and prolactin receptor(PRLR) against PRLR-expression breast cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, **39**(1): 87.

[15] HOFMANN T, SCHMIDT J, CIESIELSKI E, *et al*. Intein mediated high throughput screening for bispecific antibodies [J]. *MAbs*, 2020, **12**(1): 1731938.

[16] CHERIYAN M, PEDAMALLU C S, TORI K, *et al*. Faster protein splicing with the *Nostoc punctiforme* DnaE intein using non-native extein residues [J]. *J Biol Chem*, 2013, **288**(9): 6202-6211.

[17] 窦同璐, 陈 浩, 曹 津, 等. 断裂内含肽在含有抗体铰链区氨基酸序列的非天然外显肽中的剪接[J]. 中国药科大学学报, 2019, **50**(5): 606-613.

[18] BHAGAWATI M, TERHORST T M E, FUSSER F, *et al*. A mesophilic cysteine-less split intein for protein trans-splicing applications under oxidizing conditions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, **116**(44): 22164-22172.

[19] SHAH N H, ERYILMAZ E, COWBURN D, *et al*. Naturally split inteins assemble through a "capture and collapse" mechanism [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(49): 18673-18681.

[20] STEVENS A J, SEKAR G, GRAMESPACHER J A, *et al*. An atypical mechanism of split intein molecular recognition and folding [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, **140**(37): 11791-11799.