

研究报告

DnaB Split Intein 高表达载体及其介导的环肽库构建

蔺增曦¹, 王胜兰², 杨秀山¹, 杨克迁²

1 首都师范大学, 北京 100037

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

摘要: 以 pET28a 为起始质粒, 构建高表达 DnaB split intein 的重组质粒。将质粒 pVmut 上的编码 Int_C-dnaB-N-Int_N 片段克隆至 pET28a, 得到表达载体 pEV, 在 T7 启动子的作用下可使融合 DnaB split intein 大量表达; 并在 split intein 介导下发生催化 DnaB-N 的剪接反应, 生成环化的 DnaB-N 蛋白。将合成的包含随机编码 5 肽的大小为 115 bp 的片段插入质粒 pEV DnaB-N 位置, 转化大肠杆菌后得到一个编码含有 6 肽 (含 5 个随机氨基酸和 1 个 Cys) 的包含约 10³ 个克隆的表达载体 pEV-IS 库。随机挑取 20 个克隆, 测序证明均按正确阅读框插入了不同的小肽序列; 挑取其中 9 个克隆进行表达, 结果表明可产生大量的融合蛋白, 90% 的融合蛋白在 16°C 表达 20 h 后发生体内剪接。将在 30°C 表达 3 h 的融合蛋白用 His 柱进行纯化, 通过 MALDI-TOF 质谱检测到了目的环肽分子量。

关键词: split Ssp DnaB mini-intein, 环肽库, 自我剪接

Construction and Evaluation of DnaB Split Intein High Expression Vector and a Six Amino Acids Cyclic Peptide Library

Zengxi Lin¹, Shenglan Wang², Xiushan Yang¹, and Keqian Yang²

1 Capital Normal University, Beijing 100037, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: A library with potential to produce six amino acids cyclic peptides was prepared using pET-28a as the starting plasmid. pVmut was used to amplify the Int_C-dnaB-N-Int_N fragment that was inserted into pET28a to give pEV. On pEV, DnaB split intein was expressed under the strong T7 promoter. Analyses of *Escherichia coli* transformed with pEV showed that DnaB split intein was produced in large quantity and the fusion protein self-spliced efficiently to produce cyclized DnaB-N. A synthesized 115 bp fragment mixture encoding 5 random amino acids was inserted into pEV to generate pEV-IS. The ligation mixture was transformed into *E. coli*. A library of 10³ clones was obtained, 20 randomly picked clones were sequenced. All of them contain different sequences. Nine clones were chosen for further analysis. Split-intein-ISs were expressed in large quantity, and 90% of them self-spliced under 16°C in 20 hours. After induction at 30°C for 3 hours, the expressed DnaB split intein was purified using His-column, and then a molecular weight of target cyclic peptide was detected by MALDI-TOF-MS.

Keywords: split Ssp DnaB mini-intein, cyclic peptide, self-splicing

Received: April 9, 2008; **Accepted:** June 10, 2008

Corresponding author: Keqian Yang. Tel: +86-10-64807459; E-mail: yangkq@im.ac.cn

Xiushan Yang. Tel: +86-10-68902330; E-mail: cnu_xsyang@263.net

环肽是一种构象稳定的多肽分子。相对于线性肽,环化的肽可以限制分子的构象,使其能与受体紧密结合;并且环肽在生物体内具有更好的抗蛋白酶水解的能力^[1]。因此,环肽较线性肽具有更丰富的生理活性和特异性,能够作为先导化合物用于新药开发。目前,一些生理活性环肽,如胰岛素、催产素、抗体、真菌毒素,已被成功合成并广泛应用于药理学、医药领域^[2]。环肽合成的方法一直都不多见。目前,通过生物途径对肽碳骨架进行环化的方法主要有2种:一种是利用微生物非核糖体多肽合成的多功能酶体系生成环肽;另一种是通过基因工程手段,对与环肽合成有关的基因进行人工改造,从而改变环肽的氨基酸序列及组成,创造出新的环肽化合物^[3,4]。现在已有多个生物法合成环肽被成功开发成药物的例子^[4]。近年来,随着 intein 的发现及其自我剪接反应机理的阐明,利用 intein 的蛋白质剪接反应进行肽碳骨架的环化,为生物合成环肽提供了一个新的途径。

Intein 即内蛋白子,又称为蛋白质内含子或内含肽,它是在蛋白质成熟过程中被剪接掉的一段、在编码框内融合于前体蛋白的氨基酸序列,与外蛋白子 (Extein) 相对应。Intein 的编码序列与外蛋白子的编码序列在编码框内融合,和外蛋白子的基因一起表达为前体蛋白;之后前蛋白在 intein 作用下发生自我剪接反应从前体蛋白中释放出 intein,并将余下的 extein 连接成为成熟的功能蛋白^[5]。该剪接过程不需要特定的细胞环境以及任何辅助因子的参与,并且对两侧外蛋白子没有特异性的要求,所以也可以在体外或异源细胞中进行。普通 intein 由具有自我剪接活性的 N 端剪接域、C 端剪接域以及中间的归巢内切酶(Homing endonuclease)区域3部分构成,mini-intein 是改造后的不包含归巢核酸内切酶的 intein。而本研究所利用的 split Ssp DnaB mini-intein 来自蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC6803,是由 Ssp DnaB intein N 端和 C 端剪接域位置前后调换得到的 split intein,中文翻译为分裂型内蛋白子^[6,7];这种 N/C 端调换的 intein 可以剪接同框插入其中的蛋白得到环化的蛋白。

1999年,Scott等人设计和提出 SICLOPPS (*in vivo* split intein-mediated circular ligation of peptide and proteins) 方法——即将编码目的蛋白的序列嵌

入 intein 两个剪接域的编码序列之间,在表达融合蛋白后,通过 intein 的自我剪接来介导目的蛋白的环化^[7]。通过此种方法构建的环肽库可以有足够的化学多样性,为药物筛选提供化合物库。Scott等人首先利用来自蓝细菌 *S. sp.* PCC6803 的 DnaE 分裂型内蛋白子 (DnaE split intein) 将大肠杆菌二氢叶酸还原酶 (DHFR) 和 8 肽的酪氨酸抑制子 pseudostellarin F 进行了首尾环化。之后还利用 DnaE split intein 制备了环肽库^[8],建立了 SICLOPPS 构建环肽库的方法^[9]。随后 Iwai 等人利用人工改造的来自嗜热古菌 *Pyrococcus furiosus* 的分裂型内蛋白子 split PI-PfuI intein 环化了绿色荧光蛋白,环化产率在一定程度上受到未完全剪接产物积累的影响^[10]。2001年,Williams等人利用 split Ssp DnaB mini-intein 成功地将 dnaB-N 蛋白进行首尾环化^[11],他们将编码 split Ssp DnaB mini-intein 的序列引入质粒 pETMCSI,之后将编码 dnaB-N 的片段引入至 intein 的 2 个末端序列之间并同时引入 λ 启动子,得到质粒 pNW1120,其编码的融合蛋白在剪接过程中积累较少的中间产物并展现出较为出色的剪接效率,有效地将 dnaB-N 环化。为了在大肠杆菌中构建环肽库,本实验室吴薇通过定点突变在质粒 pNW1120 上引入了一个新的酶切位点 *Bsr*GI (引入酶切位点后的质粒命名为 pVmut),通过 *Bsr*GI 与 *Bst*B I 酶切将编码 dnaB-N 的片段替换为包含随机编码 6 肽氨基酸的片段,成功地获得了表达载体库 pV-IS。但进一步实验证明,用 pV-IS 表达的融合蛋白量很低,给后续环肽的鉴定和分析带来很大困难。为了进一步提高融合 split intein 的表达量与剪接效率,我们将 pVmut 上的编码片段 Int_C-dnaB-N-Int_N 克隆至含 T7 启动子的质粒 pET28a 上,进一步插入随机编码片段后将连接产物进行表达,期望在较强启动子的作用下提高融合 split intein 的表达量与自我剪接反应效率,获得大量小环肽。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养

E. coli DH5 α , *E. coli* BL21(DE3) (购自 TRANS) 作为宿主菌用于重组载体的构建和表达,携带 DnaB mini-intein 序列的质粒 pNW1120 由澳大利亚国立大学化学研究院的 Nicholas E. Dixon 教授惠赠。质粒

pET-28a 由本实验室保存, pVmut 由本实验室吴薇构建。

大肠杆菌用 LB 培养基 (酵母提取物 5 g/L; NaCl 10 g/L; 胰蛋白胨 10 g/L) 37°C 培养。当携带表达质粒后, 培养基中添加卡那霉素至终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2 pEV-IS 高表达质粒的构建

以质粒 PV-mut 为模板, 通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增其中的 Int_C-DnaB-N-Int_N 片段, 所用引物为 IS-f(5'-TAGGATCCCATATGCTCTCCGAAATC-3'; BamH I) 和 IS-r(5'-CGAAGCTTGCTGCAAGGCGATTA-3'; Hind III), 将扩增后的片段用 BamH I 和 Hind III 进行双酶切处理, 与经过相同酶处理过的 pET28a 连接, 获得质粒 pEV。将人工合成的含有随机小肽编码序列的两条部分互补的多聚核苷酸序列退火延伸, 2 条序列分别为: P1(5'-GCCGTGTACACA ACTCT(NNS)5TGCATCTCTGGT GATTCTCTGATCAGCCTGGCGAGCACCGGTAAACG-3', BsrGI); P2(5'-GCCC GTTCGAAATCTTTTTCGTCCAGCAGATCTTTGATAGAAACACGTTTACCGGTGCTCGCCAGGCTGATCAGAGAA-3', BstB I), 其中斜体部分是 P1 与 P2 序列互补的部分, P1 中的 N 表示 4 种碱基(A、T、G 或 C)中的任意一个, S 表示 2 种碱基(G 或 C)中的任意一个。退火延伸的条件为: 40 μL 体系, 加 2 u Taq DNA 聚合酶, P1 和 P2 各 1 μg , 94°C 5 min, 72°C 延伸 1 h, 之后得到大小为 125 bp 的含有随机小肽编码序列的 DNA 片段 IS, 将片段用 BsrGI 和 BstB I 分别进行酶切, 连接至经相同酶切处理的质粒 pEV。

1.3 重组融合蛋白的表达

将连接产物 pEV-IS 转化 *E. coli* DH5 α 。从转化子中随机挑选 20 个克隆, 提取质粒, 测序验证。选取 9 个克隆提取质粒转至 *E. coli* BL21 (DE3), 从平板挑单菌落接种于 2 mL 含有 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 卡那霉素的 LB 中, 37°C 振荡过夜培养, 至 $OD_{595}=0.5\sim 0.6$, 添加 IPTG 至终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后将菌液置于 16°C 诱导表达 20 h。

1.4 SDS-PAGE、Western blotting 检测融合蛋白的表达及翻译后剪接反应

收集到的蛋白样品上样至 15% SDS-PAGE 胶跑蛋白电泳。取 20 μL 破碎离心后的上清液与 4 μL 上样 buffer 混合, 100°C 水浴 10 min。得到的蛋白样品上样至 15% 的 SDS-PAGE 胶, 表达后的总蛋白经

SDS-PAGE 分离, 考染脱色后进行分析, 另分别电转至 0.2 μm 和 0.4 μm PVDF 膜(聚偏二氟乙烯膜), 进行 Western blotting 检测。检测抗体一抗为 His.Tag 单克隆抗体(购自 TIANGEN 公司); 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG。

1.5 带有 His-tag 融合蛋白的柱上纯化

超声破碎 30°C 诱导 4 h 后的大肠杆菌菌体细胞, 12000 r/min 离心 10 min 后取上清, 将诱导表达出的融合蛋白 Split-intein-IS 经 His·Bind 层析柱纯化, 按 Novagen 操作说明进行纯化, 在用 Wash buffer 洗过之后, 在柱中加入 2 mL Buffer A (20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, pH 6.6), 室温放置 20 h 以促进 DnaB Ssp mini-intein 的自我剪接反应, 洗脱下的 Buffer A 进行 ZiptipC18 除盐处理, 之后进行 MALDI-TOF 质谱检测。一级谱(MS)分析, 采用反射阳离子采集模式(Reflector positive mode), 利用标准肽混合物的单同位素质量 m/z 904.468, m/z 1296.685, m/z 1570.677, m/z 2093.087, m/z 2465.199 进行内标校准。

2 结果

2.1 在 pET28a 中构建带有 Int_C-DnaB-N-Int_N 基因的高表达载体

以 pVmut 为模板, 扩增 Int_C-dnaB-N-Int_N 基因, 通过酶切位点 BamH I 和 Hind III 将扩增产物连接至载体 pET28a, 得到质粒 pEV, 其图谱如图 1(a)所示, 将 pEV 在 16°C 诱导表达 20 h, 通过 15%SDS-PAGE 检测, 观察到较为明显的环化 DnaB-N 蛋白条带和剪接反应发生后所释放的 intein 的 Int_N 端, 其位置与 Williams 报道的相同, 表明融合蛋白发生了高效的表达和剪接, 与质粒 pNW1120 相比较, 后者在相应位置观察不到明显环化的蛋白条带和剪接后释放的 Int_N 端, 融合蛋白表达量较低(图 3), 由此认为所构建的质粒 pEV 能够提高融合蛋白表达量和剪接反应效率, 可用于环肽库的构建。

2.2 含有随机五肽的环肽库的构建

将人工合成的含有随机小肽编码序列的 2 条部分互补的多聚核苷酸片段退火延伸, 得到大小为 115 bp 的含有随机 5 肽编码序列的重组 DNA 片段 IS(图 2)。将片段 IS 经 BsrGI 和 BstB I 酶切处理后插入 pEV, 得到表达载体库 pEV-IS, 其图谱如图 1 (b)

所示, 将 pEV-IS 转化大肠杆菌 DH5 α , 获得了具有 10³ 克隆的转化子库, 从大量转化子中随机挑取 20 个克隆进行测序, 结果表明编码随机 5 肽的序列互不相同, 其中有 5 个序列含有终止密码子 TAG。

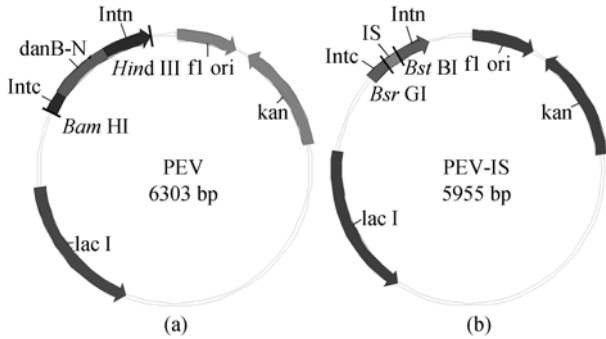


图 1 重组表达质粒 pEV 和 pEV-IS 图

Fig. 1 Restriction maps of recombinant plasmids pEV and pEV-IS

TGTACA CAAC TCTNNNNNNNNNNNNNNNN TGCATCTCTG
 ACATGTGTTG AGANNNNNNNNNNNNNNNN ACGTAGAGAC
 BsrGI Ser 5 random amino acids
 GTGATTCTCTGATCAGCCTGGCGAGCACCGGTAACGT
 CACTAAGAGACTAGTCGGACCGCTCGTGGCCATTTGCA
 GTTTCTATCAAAGATCTGCTGGACGAAAAAGATTTCGAA
 CAAAGATAGTTTCTAGACGACCTGCTTTTTCTAAAGCTT
 BstBI

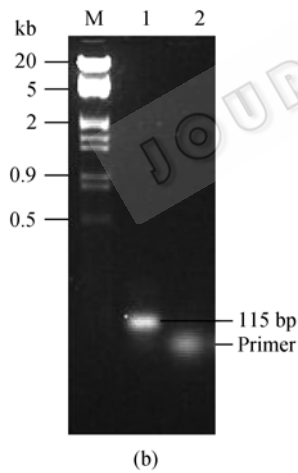


图 2 含有随机编码 5 肽的 DNA 序列 (IS) (a) 及插入片段的琼脂糖凝胶电泳鉴定 (b)

Fig. 2 DNA fragment encoding 5 random amino acids (IS) (a) and electrophoresis analysis (b)

1: 115 bp fragment; 2: primers for the 115 bp fragment; M: DNA marker

2.3 高表达和剪接效率

Williams 等人将 pNW1120 中带有 DnaB 基因的 Split Ssp DnaB mini-intein 进行表达, 表达后的融合

蛋白会发生剪接反应, DnaB-N 蛋白被有效环化。吴薇利用 pNW1120 进行环肽库的构建过程中, 融合蛋白表达量较低, 不利于小环肽的获得。为了使融合蛋白表达量有所提高, 将融合蛋白基因构建至大肠杆菌-pET28a 表达系统, 所构建的质粒 pEV 在 16 $^{\circ}$ C 诱导表达 20 h 后, 通过 15% SDS-PAGE 检测, 在与 Williams 所报道的相同位置观察到明显环化的 DnaB-N 蛋白条带和剪切后释放的 Int_N 端, 表明质粒 pEV 使融合蛋白发生了高效的表达和剪接。重组 Split-intein-IS 融合蛋白的大小为 21.9 kD, 当其在细胞内发生剪接反应时, 会将含有 6 个氨基酸残基的小肽 (约 0.6 kD~0.7 kD) 从融合蛋白中剪切出去, 并使之环化, 发生剪切反应后可产生 Int_N (12.1 kD) 和 Int_C (9.2 kD) 2 个部分的蛋白, 15% SDS-PAGE 考染脱色后可以在 12.1 kD 位置检测到明显的蛋白条带, Int_C 部分在 15% SDS-PAGE 上则观测不到。图 3 为 pNW1120、pEV 和 pEV-IS 融合蛋白表达和剪接后蛋白电泳图。

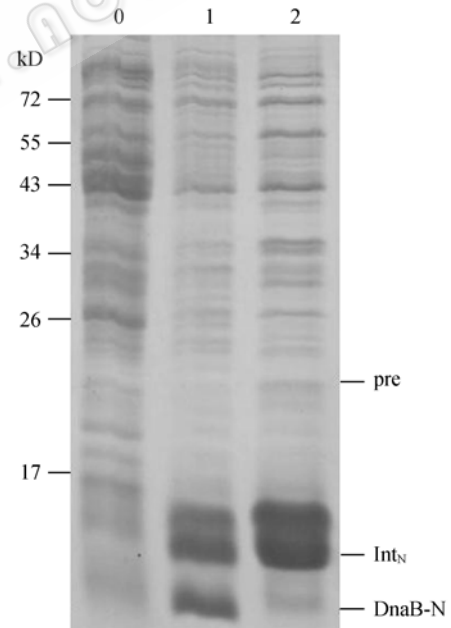


图 3 15% SDS-PAGE 分析 pNW1120、pEV 和 pEV-IS 融合蛋白的表达和剪接反应

Fig. 3 15% SDS-PAGE analysis of the expression and splicing of split ssp DnaB mini-inteins

0: *E. coli* BL21(DE3) with pNW1120 grown in LB at 30 $^{\circ}$ C for 4 h; 1, 2: *E. coli* BL21(DE3) with pEV or pEV-IS grown in LB at 16 $^{\circ}$ C for 20 h

从所测序的 20 个克隆中选取可用的前 9 个克隆, 提取质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 所得转化子中都

含有与测序相同的 6 个氨基酸编码小肽, 将 9 个克隆在 16°C 诱导表达 20 h, 得到的融合蛋白 Split-intein-IS 发生了大量表达, 其中 1 号克隆、5~9 号克隆 90% 的融合蛋白发生了剪接反应, 发生剪切后所释放的 Int_N 端部分接近总蛋白量的 50%。图 4 为选取的 9 个克隆的表达融合蛋白与发生剪接后蛋白电泳图。

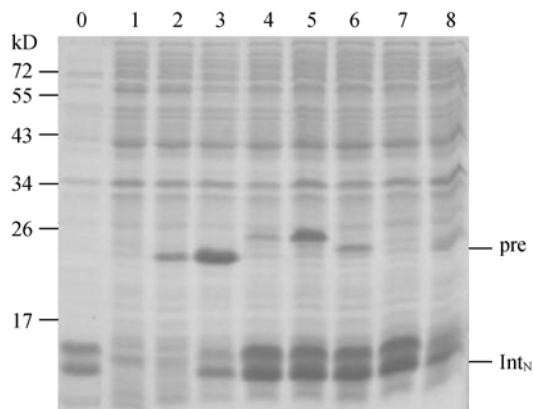


图 4 15% SDS-PAGE 分析 9 克隆在 16°C 表达 20 h 时融合蛋白的表达和翻译后剪接反应的发生

Fig. 4 15% SDS-PAGE analysis of the expression and splicing of DnaB inteins in 9 clones grown at 16 °C for 20 h 0~8: clone 1~9

融合蛋白(21.9 kD)的氨基端有 6 个连续的 His 标签, 其自我剪接后产生的 Int_C 的氨基端也带有这个 His 标签。所以当融合蛋白表达而自我剪接反应不完全时, Western blotting 检测可以同时检测到两条信号带 Split-intein-IS (21.9 kD) 和 Int_C (9.2 kD)。图

5 是 6、7、8 号克隆经 16°C 诱导表达融合蛋白后, 在孔径 0.45 μm PVDF 膜上, 蛋白样品的 Western blotting 检测结果: 从图中看可以肯定 7 号和 8 号克隆的融合蛋白发生了剪切反应, 由于 0.45 μm 孔径膜适用于截留分子量大于 20 kD 的蛋白, 所以看到的融合蛋白的杂交信号较强, Int_C 部分信号较弱, 所以尽管 6 号克隆从图中几乎看不到释放的 Int_C, 但对比 SDS-PAGE 结果来讲, 也不排除其同样发生剪切反应的可能。

2.4 MALDI-TOF 质谱分析

在纯化过程中融合蛋白会在 His · Bind 柱上发生剪切反应, 并释放出小环肽, 将柱上洗脱下的 Buffer A 进行 MALDI-TOF 质谱检测, 结果见图 6。

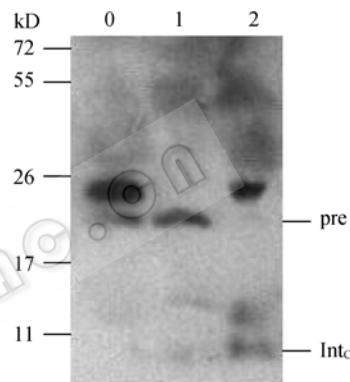


图 5 Western blotting 分析 Split-intein-IS 融合蛋白的表达和翻译后剪接反应的发生

Fig. 5 Western blotting analysis of the expression of clones 6, 7 and 8 grown at 16°C for 20 h 0~2: clones 6~8

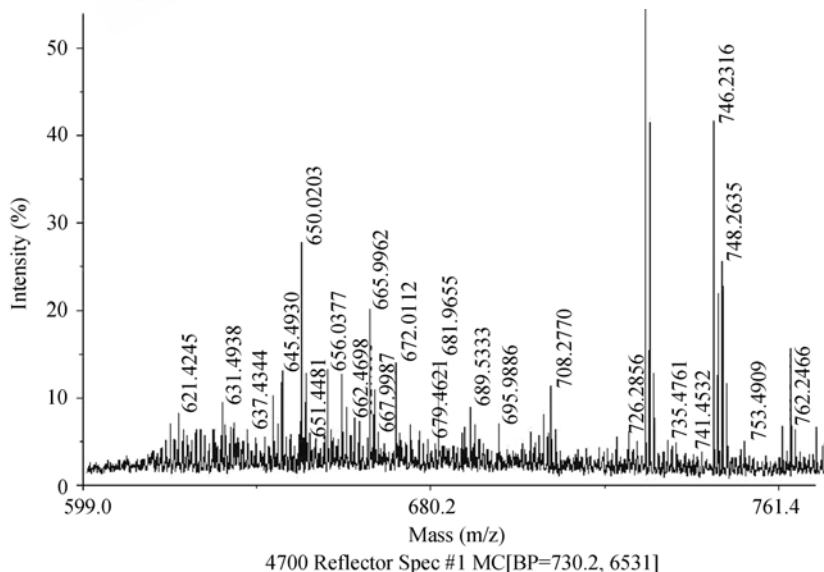


图 6 表达环肽 MALDI-TOF 质谱图

Fig. 6 MALDI-TOF mass spectra of cyclic peptide

所选择检测的 3 号克隆表达的小环肽的蛋白序列为 Ser-Thr-Gly-Glu-Trp-Phe, 去掉一个水分子后其分子量为 707, 检测时样品分子被激发后会得到 1 个质子, 因此检测到的分子量实为 708, 从图中可以看出, 质谱检测到 1 个分子量 708 的离子峰, 为目的小环肽分子量, 但由于其强度较弱, 和周围低质量区信号混杂, 所以也不排除其为背景杂信号的可能。

3 讨论

自从 1990 年第一个 intein 被发现以来, 迄今已经发现了 300 多种 intein, 在古菌、真细菌、真核生物和病毒中均有存在^[12]。已发现的 intein 中, 一些已被深入研究, 并广泛的应用于蛋白质纯化连接^[13]。一些 intein 已被开发为商业产品, 如 NEB 公司成功开发的 IMPACT-TWIN System^[49], 这种新型蛋白剪接工具在蛋白质工程领域有着可观的应用前景。

蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC6803 含有 4 种 intein, 分别为 DnaE、DnaB、DnaX 和 GyrB, 其中 DnaE 和 DnaB intein 已被深入研究与应用, 其晶体结构已被阐明^[6,14]。DnaE intein 曾被用于随机环肽库构建^[8,15], 而随着 Wu^[17]和 Williams^[11]等对 DnaB intein 研究与认识的深入, DnaB intein 也被认为是另一种制备环肽库的有效工具。

本研究是在另一个表达系统-大肠杆菌 pET28a 中构建一个随机环状六肽库, 通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 杂交检测融合蛋白表达、自我剪接反应与肽段连接。SDS-PAGE 结果显示在剪切下来 Int_N(12.1 kD)位置上方可观察到另一条的蛋白条带, 推测可能是在剪切过程中, 由于共价键之间的断裂, Int_N 部分形成了另一种不同的蛋白形态, 其原因有待进一步研究。

Ssp DanB mini-intein 是一种温度诱导型 intein, 剪切反应受温度和 pH 值的影响, 其剪切最适 pH 为 6.5~7.0, 室温下进行^[16]。由于诱导融合蛋白的过程中温度升高, 会使蛋白非正确折叠的可能性增大, 造成蛋白可溶性降低, 因此我们认为在诱导过程中使用 16°C 低温能够减少融合蛋白的非正确折叠, 使获得的融合蛋白能够更有效被利用, 提高剪切效率。结果表明在 16°C 诱导 20 h 后, 大部分克隆的融合蛋白发生了剪接反应, 剪接效率达到 90%以上。

为了获得更多还未来及发生剪切的融合蛋白以进行蛋白的柱上纯化, 选用 30°C 诱导表达 4 h, 但从实验结果来看, 原始融合蛋白的获得是较困难的, 这也导致了融合蛋白进行柱上纯化剪切的困难和最终利用质谱的手段鉴定 6 肽的困难。

我们所选择进行 MALDI-TOF 质谱检测的 3 号克隆的随机 5 肽序列中含有酸性氨基酸 Glu, 所产生的小环肽侧链上带有电荷, 这样就使其更容易在高电场环境中携带电荷, 有利于质谱检测出环肽。最终质谱检测的结果显示了 1 个 708 的目标分子量, 为目的环肽分子量, 但由于质谱检测的过程中各项参数和条件都比较复杂, 所检测到的信号处在低峰区, 并非检测结果中的主峰, 所以此结果还需进一步验证, 此次待检测的环肽分子量处于 MALDI-TOF 离子检测器的极限, 检测条件也需要进一步摸索。由于小分子量环肽检测的困难, 我们认为再次建库时, 可以增加表达环肽随机编码氨基酸数量, 以提高其分子量, 这样更便于通过其他方式来观察和验证。

在利用 SICLOPPS 构建一个有效的环肽库的过程中, 融合蛋白的表达和剪接效率是很重要的因素, 而选用大肠杆菌-pET28a 表达系统使融合蛋白的表达量达到一个很高水平, 为进一步的环肽检测以及活性筛选奠定了基础。

致谢 衷心感谢中国科学院微生物研究所田秀云、徐新平在克隆筛选与蛋白表达上给予的帮助, 以及范可强老师在环肽检测条件上的建议与指导。

REFERENCES

- [1] Humphrey JM, Chamberlin AR. Chemical synthesis of natural product peptides: coupling methods for the incorporation of noncoded amino acids into peptides. *Chem rev*, 1997, **97**: 2243-2266.
- [2] Li P, Roller PP. Cyclization strategies in peptide derived drug design. *Curr Top Med Chem*, 2002, **2**: 325-341.
- [3] Davies JS. The cyclization of peptides and depsipeptides. *J Pept Sci*, 2003, **9**: 471-501.
- [4] Chen QL, Cao JM. Advances in the study of cyclic peptides from microbe. *World Notes on Antibiotics*, 2005, **26**: 193-200.
陈祈磊, 曹建明. 微生物来源的环肽研究进展. 国外医药抗生素分册, 2005, **26**: 193-200.
- [5] Xu MQ, Evans TC Jr. Intein-mediated ligation and cyclization of expressed proteins. *Methods*, 2001, **24**:

- 257-277.
- [6] Ding Y, Xu MQ, Ghosh I, *et al.* Crystal structure of a mini-intein reveals a conserved catalytic module involved in side chain cyclization of asparagine during protein splicing. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 39133-39142.
- [7] Scott CP, Abel-Santos E, Wall M, *et al.* Production of cyclic peptides and proteins *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 13638-13643.
- [8] Scott CP, Abel-Santos E, Jones AD, *et al.* Structural requirements for the biosynthesis of backbone cyclic peptide libraries. *Chem Biol*, 2001, **8**: 801-815.
- [9] Abel-Santos E, Scott CP, Benkovic SJ. Benkovic. Use of inteins for the *in vivo* production of stable cyclic peptide libraries in *E. coli*. *Methods Mol Biol*, 2003, **205**: 281-294.
- [10] Iwai H, Lingel A, Pluckthun A. Cyclic green fluorescent protein produced *in vivo* using an artificially split PI-Pf1L intein from *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 16548-16554.
- [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**: 7790-7798.
- [12] Li SL, Zheng B, Zhang XM. Inteins and its biological significance. *Lett Biotechnol*, 2005, **16**(5): 552-555.
李素丽, 郑斌, 詹希美. 蛋白质内含肽及其生物学意义. *生物技术通讯*, 2005, **16**(5): 552-555.
- [13] Evans TC Jr, Xu MQ. Intein-mediated protein ligation: harnessing nature's escape artists. *Inc Biopoly*, 2000, **51**: 333-342.
- [14] Sun P, Ye S, Ferrandon S, *et al.* 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*, 2005, **353**: 1093-1105.
- [15] Ali Tavassoli SJB. Split-intein mediated circular ligation used in the synthesis of cyclic peptide libraries in *E. coli*. *Nat Protoc*, 2007, **2**: 1126-1133.
- [16] Evans TC Jr, Benner J, Xu MQ. The cyclization and polymerization of bacterially expressed proteins using modified self-splicing inteins. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 18359-18363.
- [17] 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.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论(不用单列标题书写)。目的(Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法(Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results): 本文最后得出的结果(实验数据部分)。结论(Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。

凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的(如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。