

运用 mRNA 体外展示技术筛选 胸苷酸合成酶 RNA 亲和肽*

阎松^{1,2)} 牛荣丽¹⁾ 张培军¹⁾ 林秀坤^{1,3) **}

⁽¹⁾中国科学院海洋研究所, 实验海洋生物学重点实验室, 青岛 266071;

⁽²⁾中国科学院研究生院, 北京 100039;

⁽³⁾Department of Medicine and Pharmacology, Yale University School of Medicine, New Haven CT 06520, USA)

摘要 以体外选择方法筛选不同功能的核酸、肽和蛋白质是近年的研究热点, mRNA 体外展示是一种新兴的高效多肽选择技术, 其基本原理是通过含嘌呤霉素寡核苷酸的 Linker 使 mRNA 与它编码的肽或蛋白质共价结合, 形成 mRNA-蛋白质融合体, 这一方法已用于多种功能肽的鉴定. 以 mRNA 体外展示技术进行了由大容量多肽库中 ($>10^{13}$) 筛选胸苷酸合成酶 (thymidylate synthase, TS) RNA 亲和肽的研究, 通过精密的实验设计, 建立了一套完整有效的筛选方法, 并对实验条件进行了优化. 已进行了 8 轮筛选, 结果表明, 以 mRNA 体外展示技术获得的多肽分子, 可以与 TS mRNA 亲和. 将测序结果与初始肽库进行比较, 发现亲和肽中碱性氨基酸及芳香族氨基酸含量明显增加, 说明其在与 RNA 结合中具有重要作用. mRNA 展示技术作为一种大容量文库的体外筛选方法, 将广泛应用于与固定化靶物质具高度亲和性及特异性的多肽和蛋白质的筛选.

关键词 mRNA 体外展示, 筛选, 胸苷酸合成酶, 亲和肽

学科分类号 Q78

目前应用的组合多肽 / 蛋白质库技术 (combinatorial peptide/protein libraries) 包括噬菌体展示技术 (phage display)、核糖体展示技术 (ribosome display, RD) 及 mRNA 体外展示技术 (*In vitro* mRNA display). mRNA 体外展示又称 mRNA-蛋白质融合体展示 (mRNA-protein fusion display), 是近年来发展的一种高效多肽选择技术^[1]. 它可以由大容量的多肽库中 ($10^{13} \sim 10^{15}$ 个分子) 获得具有特定生物学功能的多肽分子. 与噬菌体和核糖体展示技术相比, mRNA 体外展示技术具有多肽库容量大、筛选方法简便等优点, 特别适用于获得小分子功能性多肽. 这一方法的基本原理是借助一种蛋白质合成抑制剂嘌呤霉素 (puromycin) 来形成 mRNA-蛋白质融合体, 从而实现基因表型 (RNA) 与蛋白质表型 (多肽) 的结合. 嘌呤霉素是一种模拟 tRNA 末端氨酰基的抗生素, 将其连接于 mRNA 分子的 3' 端, 当 mRNA 翻译完成时, 嘌呤霉素进入核糖体的 A 位点接纳新生肽, 抑制蛋白质翻译, 在多肽与嘌呤霉素的 O-甲基酪氨酸之间形成稳定的酰胺键, 生成肽酰嘌呤霉素复合物, 而使 mRNA 3' 端和蛋白质的羧基端通过嘌呤霉素分子共价地联系在一起^[2] (图 1). 人们已利用这种新的技术鉴定了许多功能性多肽, 包括 RNA 结合肽^[3]、TNF- α 结合因子^[4]等. 本文建立了以 mRNA 体外展

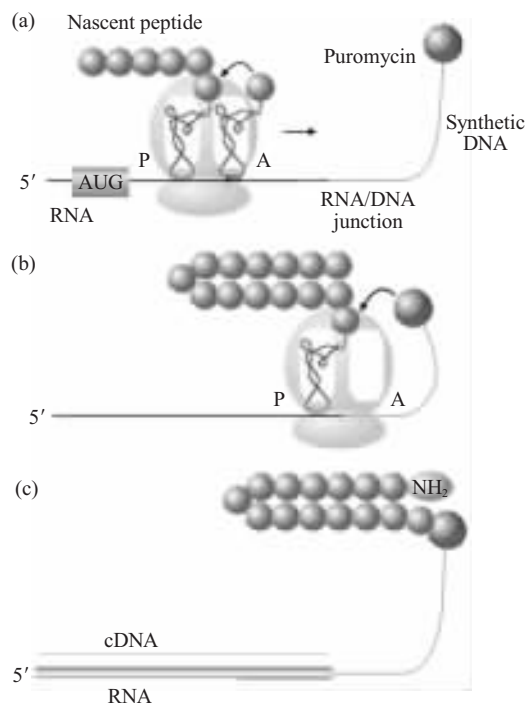


Fig. 1 Formation of an mRNA-protein fusion^[2]

(a) mRNA is ligated photochemically to a synthetic oligonucleotide containing puromycin at its 3' end. The ribosome initiates synthesis of the template and reads in a 5' → 3' direction. tRNAs and amino acids are shown in the P- and A-sites of the ribosome. (b) Puromycin enters the ribosome, attaching the template to the C terminus of the nascent peptide. (c) Reverse transcription generates cDNA that can be amplified by PCR.

*国家自然科学基金资助项目(30472043).

** 通讯联系人. Tel: 0532-82898916, E-mail: linxiukun@yahoo.com

收稿日期: 2005-05-25, 接受日期: 2005-06-29

示技术筛选与抗肿瘤药物的重要靶酶——胸苷酸合成酶^[9] mRNA 高度亲和多肽的方法, 进行了 8 个循环, 并对选择循环中的文库构建、融合肽生成及筛选方法等问题作了探讨, 以期对相关研究提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 编码多肽库的 DNA 库. 由哈佛大学 Szostak 博士实验室合成, 其 DNA 序列为 TTC TAA TAC GAC TCA CTA TA GGG ACA ATT ACT ATT TAC AAT TAC A ATG GAC TAC AAA GAC GAC GAC GAT AAG AAG ACT YAC TGZ (XYZ)₁₈ YAC TGG TCA GCG AGC TGC CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAC CGG CTA T (底划线: T7 启动子; 黑斜体: 编码 21 个氨基酸残基的随机区; 黑体: His-tag 序列).

1.1.2 DNA 库扩增引物. 上游引物为 5' TTCTAATACGACTCACTATAGGGACAATTACT-ATTTACAATTACA 3', 下游引物为 5' ATAGCCGGTGATGATGATGATGATGATGATGGC 3'. 此引物及以下 Linker 和 TS30 RNA 均由耶鲁大学 Keck 寡核苷酸合成实验室合成.

1.1.3 Linker 结构. 5' 补骨脂素(psoralen) -TAG CCG GTG AAA AAA AAA AAA AAA-(PEG)₂-ACC- 嘌呤霉素 3'.

1.1.4 TS30 RNA. 是 TS mRNA 5' 上游的顺式因子, 序列为 5' CCG CCC GCC GCG CCA UGC CUG UGG CCG GCU-Bi 3'.

1.1.5 主要试剂. Taq DNA 聚合酶、dNTP、RNA 酶抑制剂购于 Promega 上海分公司, 胶回收试剂盒是上海华舜生物工程公司产品, 体外转录试剂盒(T7-MEGAscript™)、Oligo- (dT) 纤维素为 Ambion 公司生产, AMV 反转录酶及兔网织红细胞体外翻译试剂盒(Rabbit Reticulocyte Lysate System) 购自 Promega 公司, 生物素标记的琼脂糖凝胶为 Invitrogen 生物技术公司产品, 同位素 α -³²P-dCTP 是福瑞公司产品, pMD 18-T 载体由大连 TakaRa 公司生产.

1.1.6 仪器. Px2 Thermal Cycler PCR 仪(Thermo Electron Corporation, USA), 紫外透射仪, 手提式紫外分析仪, 电泳仪, 水浴锅等.

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增. 获得大量的 DNA 库. PCR 反应总

体积 25 μ l, 其中含 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ l, 5 U/ μ l Taq 酶 0.25 μ l, 40 mg/L 引物 1 μ l, 50 mg/L 模板 DNA (即 DNA 库) 1 μ l. 反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min. 胶回收纯化 PCR 产物.

1.2.2 体外转录. 采用 T7 RNA 聚合酶, 以上述 DNA 库为模板, 体外转录, 获得 RNA 库. 20 μ l 反应体系中含 250 mg/L DNA 模板 2 μ l, 5 U/ μ l T7 RNA 聚合酶 2 μ l, 10 $\times$ T7 反应缓冲液 2 μ l, 4 种 NTP (75 mmol/L) 各 2 μ l, 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h, 之后加入 2 U/ μ l DNA 酶 2 μ l 温育 10 min. 反应产物以 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯化.

1.2.3 光交联反应. RNA 与嘌呤霉素修饰的 DNA 接头(puromycin-oligonucleotides linker) 连接. 800 μ l 连接体系中含 3 μ mol/L 模板 RNA 48 μ l, 7.5 μ mol/L Linker 60 μ l, 100 mmol/L KCl 24 μ l, 20 mmol/L 的 Hepes (pH 7.5) 16 μ l, 1 mmol/L EDTA (pH 8.0) 16 μ l, 1 mmol/L 亚精胺 8 μ l, 采用 365 nm 的紫外照射 15 min, 使 RNA 分子与 Linker 连接, 乙醇沉淀法回收连接产物.

1.2.4 体外翻译. 将上述连接产物加入兔网织红细胞体外翻译体系, 其中兔网织红细胞 35 μ l, 去亮氨酸的氨基酸混合液 0.5 μ l, 去甲硫氨酸的氨基酸混合液 0.5 μ l, 40 U/ μ l RNA 酶抑制剂 1 μ l, 以 DEPC 水补足至总体积 50 μ l, 30 $^{\circ}$ C 温育 1 h. 之后加入 2.5 mol/L KCl 10 μ l, 1 mol/L MgCl₂ 3 μ l, -20 $^{\circ}$ C 过夜. 翻译产物与 10 倍体积的结合缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10 mmol/L EDTA, 1 mol/L NaCl, 0.1% Triton X-100) 混匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 3~4 min, 5 000 r/min 离心 10 min 取上清, 加入少量 Oligo- (dT) 纤维素 (2~4 mg), 室温振摇 1~2 h, 离心取沉淀, 以稀释 1 倍的缓冲液洗涤, 加 50 μ l 双蒸水振摇 1 h 释放融合肽 (peptide-mRNA fusion).

1.2.5 反转录. 融合肽与下游引物 1 μ l 混匀, 65 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 放置冰上. 转入 20 μ l 反转录体系中, 其中含 5 $\times$ cDNA 合成缓冲液 4 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ l, 40 U/ μ l RNA 酶抑制剂 1 μ l, 10 U/ μ l AMV 反转录酶 3 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 获得 mRNA-cDNA- 肽的融合体.

1.2.6 融合肽与 TS mRNA 的顺式因子(TS30 RNA) 结合. 先将生物素标记的 TS30 RNA 固定于

Streptavidin 琼脂糖凝胶载体上, 然后加入 400 μ l 结合缓冲液(10 mmol/L Hepes pH 7.5, 0.5 mmol/L EDTA, 100 mmol/L KCl, 1 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L DTT, 0.01% Nonidet P-40, 50 mg/L 酵母 tRNA), 将纯化的融合肽与其一起温育 2 h. 缓冲液

洗涤 5 ~ 6 遍后, 加入洗脱液(无酵母 tRNA) 及 1 g/L RNA 酶 A、1 g/L 蛋白酶 K 各 1 μ l, 洗脱 1 h, 获得第一循环的 DNA 库.

1.2.7 PCR, 按上述步骤进入下一循环.

整个研究过程图见图 2.

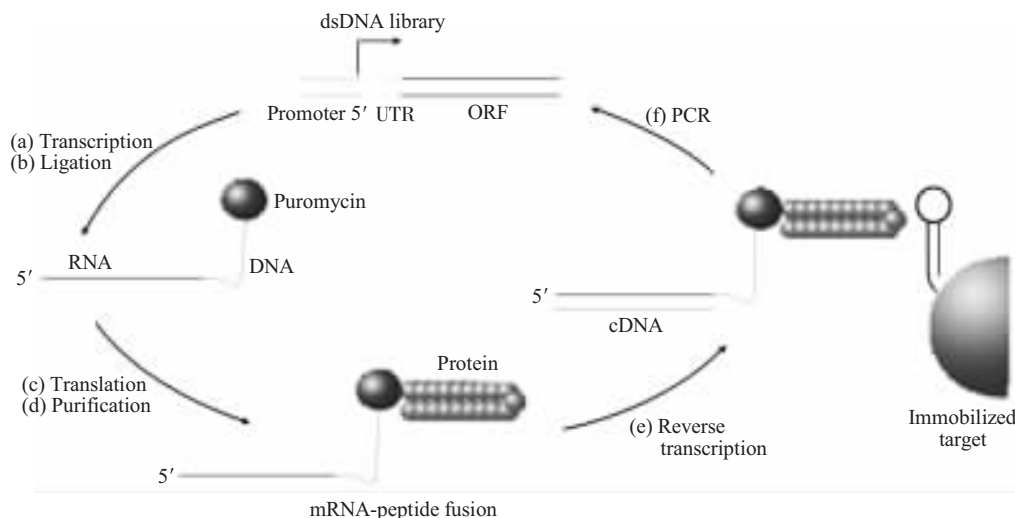


Fig. 2 A typical mRNA display selection cycle^[3]

(a) A library of dsDNA sequences is transcribed to generate mRNA. (b) The mRNA is ligated to a puromycin oligonucleotide and used to program an *in vitro* translation reaction. (c) cDNA synthesis is performed. (d, e) The DNA/mRNA-protein fusion is sieved using the target of interest. (f) PCR is used to regenerate the full-length DNA construct.

1.2.8 RNA-蛋白质结合实验. 将融合肽以 RNA 酶消化, 获得的多肽分子与 ^{32}P 标记的 TS RNA 室温孵育 15 min, 反应混合液总体积 30 μ l, 包含 10 mmol/L Hepes(pH7.4), 40 mmol/L KCl, 3 mmol/L $MgCl_2$, 1 μ l RNA 酶抑制剂, 250 mmol/L 2- 巯基乙醇, 5% 甘油. 以 4% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 放射自显影观察.

1.2.9 PCR 产物的克隆和测序. 利用胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物中的约 200 bp 片段, 克隆到 pMD 18-T 载体上, 转化 *E. coli* TOP10 F', 进行蓝白斑筛选, 以菌落 PCR 检测阳性结果, 随机挑取阳性转化子由上海博亚生物技术有限公司进行序列测定.

2 结果与讨论

2.1 随机 DNA 库的构建

设计编码多肽库的 DNA 库时考虑了以下几个重要因素: a. 5' 端具 T7 启动子, 使得可用 T7 RNA 聚合酶体外合成大量 mRNA 库, 由 GGG 核

苷酸帮助起始转录; b. 具有 TMV 翻译增强序列 (tobacco mosaic virus translation enhancer sequence); c. 以 AUG 密码子 (开放阅读框的开始) 起始蛋白质合成; d. 具编码 21 个氨基酸残基的随机序列, 以保证文库的容量; e. 加了 His-tag, 可以通过亲和层析纯化融合肽.

蛋白质库通常由化学合成的 DNA 来编码, 其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 是部分随机的. 终止密码子能引起蛋白质合成提前终止, 是长开放阅读框化学合成的重要障碍. 完全随机序列库使用 NNN 编码, 含一定比例的终止密码子, 影响翻译效率. NNG/C 密码子可减少终止码 TAA、TAG、TGA 在随机核苷酸序列中出现的频率, 并为哺乳动物翻译系统的 20 种氨基酸提供了所需的密码子^[6]. 我们即采用了 NNG/C 密码子编码随机区. 同时, 开放阅读框的 3' 端需包含一定核苷酸长度的稳定区域, 这一序列是 PCR 扩增及嘌呤霉素寡核苷酸与 mRNA 模板连接所需要的. 设计时要确保这段序列不含终止密码子和二级结构, 以免干扰引

物结合. 按以上原则构建好的随机库转录产生的 mRNA 模板, 即可通过体外翻译展示其编码的蛋白质库.

2.2 融合肽的生成

要提高 mRNA-蛋白质融合体的生成效率需提高 mRNA 与 Linker 的连接效率. Roberts 等^[1]的研究表明, Linker 的长度和序列对融合肽的生成能产生影响, 具有 19~30 个寡核苷酸的 Linker, 其结合效率差别很小, 长度大于 40 小于 16 个寡核苷酸的 Linker 结合效率明显降低, 说明 Linker 可能不是绕过而是由编码位点直接穿过核糖体的 A 位点到达肽酰转移酶中心. 影响连接效率的另一因素是 Linker 的骨架成分. 与氨酰 tRNA 分子 3' 端 (5' rCrCrA-amino acid) 的核糖序列相比, 一般 Linker 的 3' 端嘌呤霉素附近有 ACC 的脱氧核糖骨架 (5' dAdCdCP) 来提高连接效率^[1]. Kurz 等^[7]以光交联 (photo-crosslinked) 方法使 mRNA 与 Linker 连接, 发现含有几个三乙二醇 (triethyleneglycol, TEG) 的 Linker 能有效提高融合肽的产率. 本实验设计的 Linker, 含有 27 个寡核苷酸, 其 5' 端与 mRNA 的 3' 端有 9 个碱基的互补序列, 具有多聚腺苷酸, 为用 Oligo(dT) 纤维素纯化融合肽提供方便, 并在嘌呤霉素的 5' 端添加了聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 及 ACC 的脱氧核糖骨架来增加连接效率. 我们在实验中发现, mRNA 模板与嘌呤霉素寡核苷酸的纯化也非常重要, 因为高浓度的盐溶液会干扰连接, 进而影响融合肽生成.

RNA 分子与 Linker 经光诱导交联后形成如下结构 (图 3).

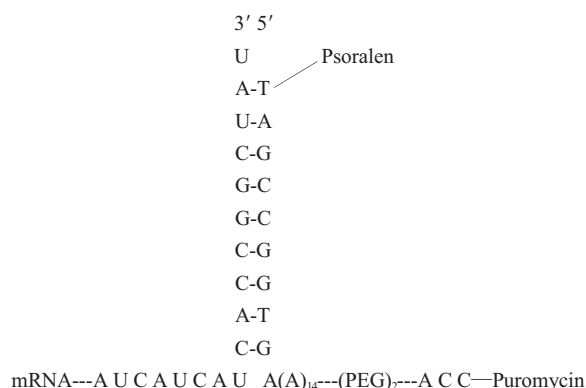


Fig. 3 Structure of mRNA-Linker

正常翻译反应结束后, 只有少量体外合成的蛋白质能转化成 mRNA-蛋白质融合体的形式. 以 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 发现翻译后加入

适量的 Mg^{2+} 和 K^+ 并以低温孵育 ($-20^{\circ}C$) 12~24 h, 能使融合肽的产率提高近 50%. 不同的 mRNA 模板需优化浓度, 一般 Mg^{2+} 的终浓度为 50~100 mmol/L, K^+ 为 0.3~0.6 mol/L. 融合产物以 Oligo-(dT) 纤维素进行纯化, 通过 RT-PCR 检测结果.

2.3 以固定化靶 RNA 筛选功能肽

大多数以融合系统筛选的实验, 都要尽量避免干扰结合的 RNA 二级或三级结构, 因此, 在筛选步骤前需通过反转录得到 cDNA/mRNA 的杂交融合产物. 而且, 有效的 RT 反应依赖于模板的使用量, 筛选之前, 模板量足够使 RT 反应高效进行, 但对融合肽筛选后, mRNA 的量仅为筛选前的 1%, 这么少的模板不能有效进行 RT, 会导致选择循环失败^[8]. 所以, RT 反应要在融合肽纯化之后, 筛选步骤之前进行.

筛选的靶物质 (蛋白质、核酸、或小分子) 通常固定化于固相载体上, 本实验中的 TS30-Bi 与生物素标记的 Streptavidin 琼脂糖凝胶载体结合. 筛选过程中 RNA 与融合肽亲和的特异性问题至关重要, 在与融合肽结合之前加入 100 mg/L 的牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 及 1 g/L 的 tRNA 各 1 μ L 饱和凝胶, 结合之后用缓冲液洗涤至少 6~7 次, 对除去与靶 RNA 亲和较弱或非特异性的结合肽非常重要. 加酶洗脱得到的 cDNA, 经 PCR 扩增, 获得下一循环的 DNA 模板 (图 4).

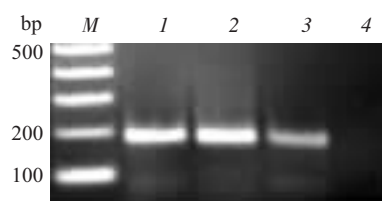


Fig. 4 PCR for amplifying fusion cDNA

M: 100 bp DNA ladder; 1: Positive control, library DNA; 2: PCR for cDNA-mRNA-protein fusion; 3: PCR for amplifying selected cDNA, TS30 was included; 4: Negative agarose gel, no TS30 was included.

2.4 8 个循环筛选结果

2.4.1 mRNA 体外展示获得的多肽可以与 TS RNA 结合. 经过 8 个循环, 将获得的融合多肽以 RNA 酶消化, 降解融合多肽上的 RNA, 胶迁移分析发现, 最初的多肽与 TS RNA 的结合非常微弱以至检测不出 (图 5-2). 8 个循环之后获得的多肽分子, 与 TS mRNA 形成明显的多肽-RNA 复合物 (图 5-3). 说明以 mRNA 体外展示技术获得的多肽分子, 可

以与 TS RNA 结合，而且其与 TS RNA 的亲和力与初始多肽相比大大提高。

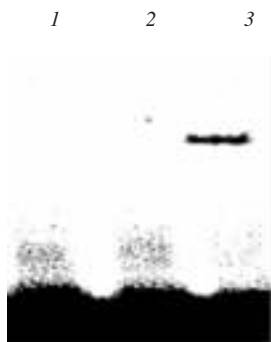


Fig. 5 Selected peptides bind TS mRNA *in vitro*
1: No peptide was included; 2: Using library peptides directly; 3: 8th round selected peptides.

2.4.2 测序结果.8 个循环之后，将筛选后的 PCR 产物与初始随机库的 PCR 产物进行测序，各测了 20 个克隆，根据 DNA 序列得出肽的序列，其中 21 个氨基酸的随机区序列见表 1，因其中(XYZ)₁₈ 为完全随机序列，故以下仅对这 18 个序列加以分析。

将每种氨基酸的含量与初始库的含量作一比较(图 6)，可以看出，初始 DNA 库中，还含有一定比例的终止密码子(Z, 1.4%)，经过选择，含终止子的多肽逐渐被筛掉. 选择循环之后碱性氨基酸中的精氨酸及组氨酸含量明显增加，分别比初始库增加了 72%和 82%，而且其中有一半序列含有碱性氨基酸对(表 1)，与之相对的是酸性氨基酸中天冬氨酸和谷氨酸的含量分别下降了 41%和 27%. 碱性氨基酸尤其是精氨酸在 mRNA 与蛋白质结合中的

Table 1 Peptide sequence of random region (21 amino acid)

Random peptide sequence of round 8	Random peptide sequence of round 0
NW(GRKSQSSNYLGLRMRRV R)Y	YW(ZDLMLSVGDKSCVLRVTZ)Y
YW(ALLMCCPLTLCNSNYSQG)N	YW(GFKZDGDGDI LHPRLDLE)Y
NC(AGT PGRPVDMVRMSCTID)Y	NC(YKLPI D LDRMLMHRMEPM)N
NC(HQFWMHPRKV S MQVRVE)N	HC(SZNETLDGYTKITCTIHT)N
NW(RHSILPMHGWR TSHNDSS)N	HW(KAMQRPVPGVEDNADPQLQ)Y
NC(HSDSDNMSHTCVDHSYRR)N	DC(THWHLDESRLTRASANLA)N
DC(VAYDAPSLIVGY YMSCGA)Y	NW(IAYLLHNCEGPEI I N AVN)H
YW(SWAFNVKACNAYCLSLHR)N	YC(DSEMRVTGGKCGVTLIQS)N
NC(KETSWREEPYNGGNLLTD)H	NW(KWIDSAGITDFCKCKTMA)W
NC(TTGREVPNAMKMDDGAYI)N	YW(DFCACAANVQKEHNWIHI)Y
NW(KEKHSDYDR TSKRDRSMH)N	DW(MKPYQMVD RYGI GPEDVN)Y
NW(WYSYLKLFCHAWTMRTTR)N	YW(MAYAEKITPLESRDGNVS)H
NW(NKNVNATPGHIGRTHQTE)H	NC(METAMSNYNRMPTWVGSE)Y
DW(ERTHMFKRNLVQRHDTGH)Y	DC(YGSKEGWIHAFSGSTSNM)N
NC(KVIGNSGFGSEWRLPMRS)Y	NC(WRWYHTKLNSQWADSKDY)Y
NC(EMDRNTTCEFEQVSANVG)N	YW(VGRTANQPAMERMA YMTT)Y
HC(LTLWRKCTDHTVSWSVWI)N	DW(MRIYS DKKZVILVQRSKN)N
HC(LEMQVRRSGKLIICGMRL)H	HW(LRYIRLTTQQNGQCGELV)D
YW(HDCAFSMELRGWETILYG)D	NC(SLRRSVGV DGLHEIVMLN)N
DW(RHIYVYLCRSRPIALPCP)Y	DW(EWVMSYRVALNPLGSSDT)N

The shadow represents the basic amino acid pair.

重要作用多有报道^[9]. Voeller 等^[10]鉴定了人和大肠杆菌 TS 蛋白分子上与 mRNA 结合的区域，发现 6 个亲和肽中有 5 个多肽分子至少含有一个精氨酸残基，将亲和肽 14 和 43 中的保守精氨酸突变为丙氨酸，这些多肽就失去了与人 TS mRNA 结合的能力，说明精氨酸是与 RNA 作用所必需的. Said 等^[11]认为碱性氨基酸侧链的正电荷为寡核苷酸的停靠及与寡核苷酸的特异性作用提供了静电吸引力，因为

寡核苷酸主要受控于带负电的磷酸盐骨架. 与初始肽库相比，苯丙氨酸的含量增多了 75%. Pelletier 等^[12]研究线粒体 Y 盒蛋白 (Y-box protein) RBP 16 的 RNA 结合特性时，在 RBP 16 的 RNP1 基元发现了两个苯丙氨酸，并认为其在与 RNA 的结合中具有一定作用. Burd 等^[13]确认位于蛋白质表面的芳香族氨基酸能够通过 RNA 的疏水作用，来稳定冷休克蛋白与核酸的复合物. 选择肽中碱性氨基酸

及芳香族氨基酸的含量增加, 必然在与 TS RNA 的结合中充当重要角色, 他们很可能是位于蛋白质表面而参与 RNA 结合的. 其他氨基酸如半胱氨酸等含量也发生了变化, 而其在与 TS RNA 亲和中的作用还有待进一步分析. mRNA 体外展示技术筛选胸苷酸合成酶 RNA 亲和肽的研究已进行了 8 轮循环, 但多肽库的容量仍较大, 测的克隆数又较少, 尚不能得到更深入的结果, 还将继续进行若干循环, 通过大量测序得到与 TS mRNA 高度亲和的多肽, 再以突变体分析和信息学等方法研究对 RNA 结合至关重要的氨基酸残基及亲和肽的二级结构特征, 阐明其与 TS mRNA 的相互作用规律, 为获得多肽类 TS RNA 抑制剂奠定基础.

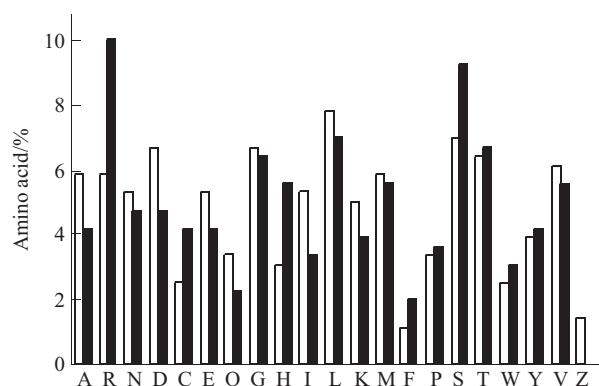


Fig. 6 The amino acid composition in selected sequences (black columns) compared to the composition in the initial random library (white columns)

Z represents the termination codon.

过去 10 年间, 展示技术是进行体外多肽和蛋白质筛选的主要工具, 其方法都是建立在基因型和表型相联系的基础上, 即将可扩增的 DNA 或 RNA 与可选择的蛋白质联系在一起. mRNA 展示技术作为一种大容量文库的体外筛选方法, 已应用于由线性肽库 (libraries of linear peptides)^[3]、限制肽 (constrained peptides) 库^[14]、抗体库^[4]中筛选高亲和性的功能肽, 还用于与特异信号蛋白结合的细胞内多肽^[15]及小分子药物^[16]的鉴定. 以 mRNA 体外展示技术筛选胸苷酸合成酶 RNA 亲和肽的研究, 国内外尚未见报道. 本文首次利用 mRNA 展示技术建立起了筛选与 TS RNA 高度亲和多肽的方法, 并已进行了 8 轮循环, 所得的选择肽可与 TS RNA 亲和, 而测序结果与其他 RNA 蛋白结合实验的结果相类似, 说明此技术的实用性. 成功使用 mRNA 体外展示技术筛选亲和剂的越来越多的相关报道, 使我

们相信这一方法必将有更加广泛的应用.

参考文献

- 1 Roberts R W, Szostak J W. RNA-peptide fusions for the *in vitro* selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (23): 12297~12302
- 2 Takahashi T T, Austin R J, Roberts R W. mRNA display: ligand discovery, interaction analysis and beyond. *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, **28** (3): 159~165
- 3 Barrick J E, Roberts R W. Sequence analysis of an artificial family of RNA-binding peptides. *Protein Sci*, 2002, **11** (11): 2688~2696
- 4 Xu L, Aha P, Gu K, *et al.* Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display. *Chem Biol*, 2002, **9** (8): 933~942
- 5 Chu E, Callender M A, Farrell M P, *et al.* Thymidylate synthase inhibitors as anticancer agents: from bench to bedside. *Cancer Chemother, Pharmacol*, 2003, Suppl 1: S80~89
- 6 LaBean T H, Kauffman S A. Design of synthetic gene libraries encoding random sequence proteins with desired ensemble characteristics. *Protein Sci*, 1993, **2** (8): 1249~1254
- 7 Kurz M, Gu K, Lohse P A. Psoralen photo-crosslinked mRNA-puromycin conjugates: a novel template for the rapid and facile preparation of mRNA-protein fusions. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28** (18): E83
- 8 Barrick J E, Takahashi T T, Balakin A, *et al.* Selection of RNA-binding peptides using mRNA-peptide fusions. *Methods*, 2001, **23** (3): 287~293
- 9 Ja W W, Roberts R W. *In vitro* selection of state-specific peptide modulators of G protein signaling using mRNA display. *Biochemistry*, 2004, **43** (28): 9265~9275
- 10 Voeller D M, Zajac-Kaye M, Fisher R J, *et al.* The identification of thymidylate synthase peptide domains located in the interface region that bind thymidylate synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Comm*, 2002, **297**: 24~31
- 11 Said T, Bruley H, Lamoureux A, *et al.* An RNA-binding domain in the viral haemorrhagic septicaemia virus nucleoprotein. *J Gen Virol*, 1998, **79** (Pt 1): 47~50
- 12 Pelletier M, Miller M M, Read L K. RNA-binding properties of the mitochondrial Y-box protein RBP16. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28** (5): 1266~1275
- 13 Burd C G, Dreyfuss G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*, 1994, **265** (5172): 615~621
- 14 Baggio R, Burgstaller P, Hale S P, *et al.* Identification of epitope-like consensus motifs using mRNA display. *J Mol Recognit*, 2002, **15** (3): 126~134
- 15 Hammond P W, Alpin J, Rise C E, *et al.* *In vitro* selection and characterization of Bcl-X (L) -binding proteins from a mix of tissue-specific mRNA display libraries. *J Biol Chem*, 2001, **276** (24): 20898~20906
- 16 Cujec T P, Medeiros P F, Hammond P, *et al.* Selection of v-abl tyrosine kinase substrate sequences from randomized peptide and cellular proteomic libraries using mRNA display. *Chem Biol*, 2002, **9** (2): 253~264

Identification of Peptides That Bind With Thymidylate Synthase RNA Using mRNA Display Technique*

YAN Song^{1,2)}, NIU Rong-Li¹⁾, ZHANG Pei-Jun¹⁾, LIN Xiu-Kun^{1,3)**}

¹⁾ Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

²⁾ Graduate School, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;

³⁾ Department of Medicine and Pharmacology, Yale University School of Medicine, New Haven CT 06520, USA)

Abstract Using *in vitro* selection method to isolate nucleic acids, peptides and proteins has been studied intensively in recent years. *In vitro* mRNA display is a new and effective technique for peptides selection, and the rationale of this technique is that a synthetic mRNA with puromycin could covalently link with the protein that it encodes, thus an mRNA-protein fusion is formed. This approach has been used in identification of many functional peptides. The peptides binding with thymidylate synthase RNA were isolated using mRNA display technique from a large peptide library (>10¹³ different sequences). The selection scheme was constructed, and the experimental conditions, including library synthesis, formation of RNA-peptide fusion and RNA immobilization were optimized. Eight cycles have been processed and the results confirmed that the selected peptides could bind with thymidylate synthase mRNA specifically. Compared the amino acid sequences of the selected peptides with those from the initial random library, the basic and aromatic residues in selected peptides were enriched significantly, suggesting these peptide regions may be important in the peptide-TS mRNA interaction. As a novel *in vitro* selection approach, mRNA display technique would be developed as a powerful tool for isolation of functional peptides and proteins that could interact with immobilized targets with high affinity and specificity.

Key words *in vitro* mRNA display, selection, thymidylate synthase, affinity peptides

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30472043).

**Corresponding author. Tel: 86-532-82898916, E-mail: linxiukun@yahoo.com

Received: May 25, 2005 Accepted: June 29, 2005