

mRNA展示技术*

张万巧 王建 贺福初**

(北京放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要 mRNA展示技术是一种新兴的体外筛选多肽和蛋白质的有力工具. 在筛选过程中, mRNA与其编码的多肽或蛋白质共价结合, 形成mRNA-蛋白质融合体, 能在大容量的多肽文库($10^{13} \sim 10^{15}$)中筛选具有特定生物学功能的多肽和蛋白质. 目前, mRNA展示技术主要应用于各种靶分子的多肽和蛋白质适体的发现以及蛋白质相互作用机制的阐明和分析. 由于其自身的巨大发展潜力, mRNA展示技术具有更为广阔的应用前景.

关键词 体外展示技术, mRNA展示技术, mRNA-蛋白质融合体

学科分类号 Q331

伴随着后基因组时代的来临, 对核酸、多肽和蛋白质等生物学大分子的功能和相互作用的研究, 逐渐成为生命科学界研究的主流. 在过去的10年中, 展示技术已经成为多肽和蛋白质配体发现和体内相互作用研究方面的基本工具. 展示技术可以分为体内展示技术和体外展示技术两类. 体内展示技术有噬菌体展示技术和酵母双杂交技术, 体外展示技术有核糖体展示技术、mRNA展示技术和DNA展示技术等.

作为体内展示技术, 噬菌体展示技术主要运用在发现新的多肽和蛋白质适体上, 而酵母双杂交技术则主要运用在体内蛋白质相互作用分析上, 它们都在各自的应用中发挥着巨大的功效. 但它们在实验过程中都不可避免地需要一个体内步骤, 因而有了某些应用上的限制. 在噬菌体展示技术中, 由于在构建文库和筛选时都涉及到细胞转染, 文库容量受转染效率的影响被限制在 $10^9 \sim 10^{10}$, 降低了文库筛选效率. 类似的, 酵母双杂交实验需要将文库引入到酵母中, 把文库容量限制在 $10^6 \sim 10^7$. 另外, 在双杂交系统中所检测的相互作用必须发生在核内, 限制了对结合强度、适合的结合作用和对生化条件的控制. 而且相互作用的蛋白质对酵母细胞有毒性的也得不到检测, 产生大量假阴性结果.

新兴的体外展示技术(*in vitro display*), 如核糖体和mRNA展示技术, 就克服了体内筛选技术的许多限制. 由于完全不依赖细胞, 没有转染步骤,

减少了因表达差异而产生的偏性, 文库的多样性和筛选效率得到了极大提高, 其正常产生的文库容量都超过 10^{12} , 显示出诱人的应用前景. 目前, 体外展示技术已成为可用于分离具有特定化学或生化特性的多肽和蛋白质的最好方法. 关于体外展示技术的研究也是当前研究的热点之一.

1 mRNA展示技术的原理及优势

1.1 mRNA展示技术

mRNA体外展示技术又称为mRNA-蛋白质融合体展示技术, 是一种新兴的体外多肽筛选技术. 可以运用于生物分子配体的发现和相互作用分析. 其基本方法是: 化学合成编码多肽库的DNA库, 并对DNA进行特殊加工, 在5'端添加T7聚合酶启动子、翻译增强子、翻译起始密码子等序列; 在3'端添加亲和纯化标签. 在体外利用T7RNA聚合酶将DNA转录成RNA, 把RNA的3'端和带有嘌呤霉素的连接子结合, 带有嘌呤霉素连接子的诱饵RNA和RNA文库在无细胞系翻译体系中共翻译, 通过嘌呤霉素的作用, mRNA与其所翻译的蛋白质结合起来形成mRNA-蛋白质融合体. 从而实现

*国家高技术研究发展计划(2002-BA711A11, 2004-BA711A19), 北京市科技计划资助项目(H030230280920).

**通讯联系人.

Tel: 010-80727777-1304, E-mail: zhangwq119@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-03-30, 接受日期: 2006-04-29

了基因型 (mRNA) 和表型 (蛋白质) 的结合^[1,2]. 一般利用翻译蛋白所带的亲和标签, 用亲和层析技术将 mRNA- 蛋白质融合体纯化出来, 并对 mRNA 进行反转录, 生成 cDNA-mRNA- 蛋白质融合体. 采用 ELISA、磁珠法等, 将筛选的靶物质固定化于固相载体上, 含有目标蛋白的 cDNA-mRNA- 蛋白质融

合体就能通过与固相载体上的靶物质特异性结合而得到分离. 通过洗脱液将猎物 cDNA-mRNA- 蛋白质融合体洗脱下来, 加酶分解得到 cDNA, 将其进行 PCR, 所得产物进入下一轮循环. 经过多次循环, 目标蛋白及其编码的基因序列最终得到富集和分离 (图 1).

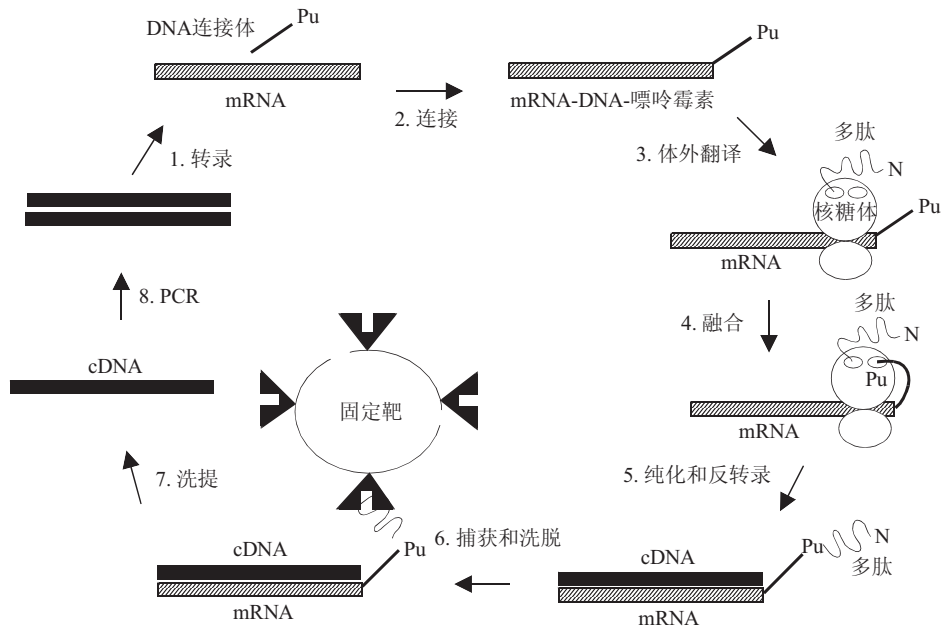


Fig. 1 Iterative selection using mRNA display^[3]

图 1 mRNA 展示技术体外筛选循环流程^[3]

1.2 mRNA-蛋白质融合体形成原理

嘌呤霉素是一种分子量小、化学性质稳定的氨酰 tRNA 类似物^[4] (图 2). 当 3' 端带有嘌呤霉素连接子的 mRNA 在体外翻译系统中完成翻译时, 嘌呤霉素模拟 tRNA 末端的氨酰基结构, 进入核糖体的 A 位点, 抑制了蛋白质的翻译, 在新生肽链和嘌呤霉素的 O - 甲基酪氨酸之间形成稳定的酰胺键, 使 mRNA 的 3' 端与多肽的羧基端共价结合起来 (图 3).

1.3 mRNA 展示技术的优势

作为一种体外展示技术, mRNA 具有多肽库容量大、筛选效率高、操作简便等共同特点. 在一般情况下, mRNA 展示技术允许的文库容量是噬菌体展示技术的 10 000 倍, 是酵母展示或者双杂交、三杂交系统的 10⁶ 倍, 是克隆筛选实验的 10⁹ 倍^[5]. 相对于核糖体展示技术, mRNA 展示技术可以说是核糖体展示技术的改进版. 在核糖体展示技术中, 先对编码蛋白的 DNA 进行特殊的加工与修饰, 去掉 3' 端的终止密码子, 使核糖体翻译到 mRNA 末端时, 由于缺乏终止密码而停留在

mRNA 的 3' 末端不脱离, 从而形成 mRNA- 核糖体 - 蛋白质三元复合体^[6]. 核糖体展示技术的缺点就在于 mRNA- 核糖体 - 蛋白质的三元复合体缺乏稳定性. mRNA 展示技术去掉了核糖体, 将 mRNA 与其编码的蛋白质通过嘌呤霉素直接连接到一起, 形成一个更简单更坚固的系统.

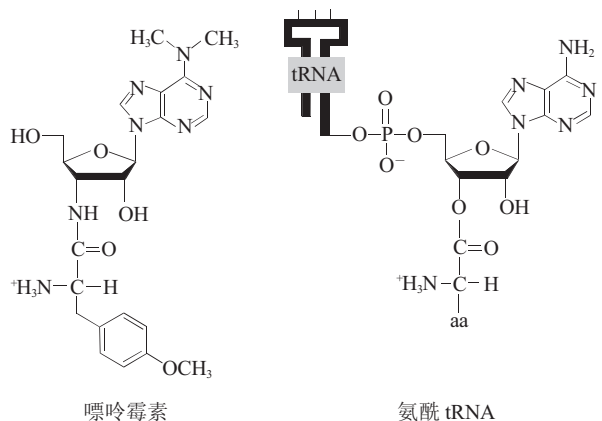


Fig. 2 Puromycin versus aminoacyl-tRNA^[2]

图 2 嘌呤霉素和氨酰 tRNA 结构对照^[2]

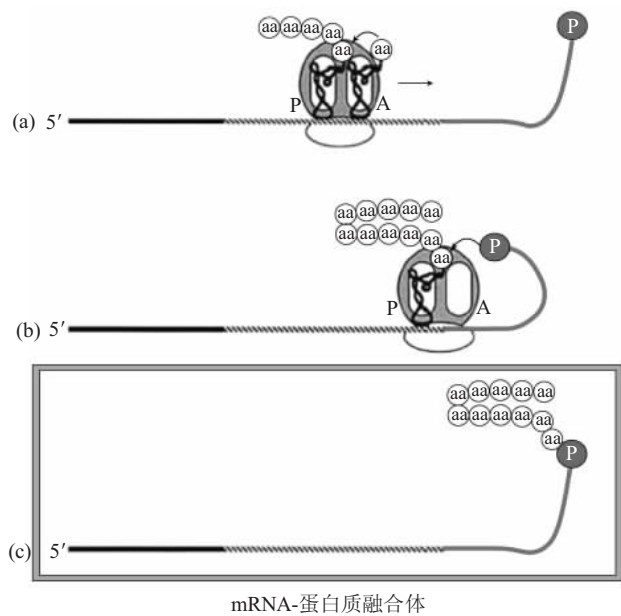


Fig. 3 Proposed mechanism for RNA-peptide fusion formation on the ribosome^[1]

图3 mRNA-蛋白质融合体形成机制^[1]

(a) 核糖体以 mRNA 为模板起始蛋白质的合成, 核糖体向 mRNA 的末端(3'端)转移。(b) 核糖体到达 RNA 开放阅读框的末端时, 翻译在 RNA/DNA 结合处停止。嘌呤霉素进入核糖体的 A 位点并与新生多肽结合。(c) 通过亲和色谱法纯化得到的 mRNA-蛋白质融合体。

2 mRNA 展示技术的发展

早在 1997 年, 就有关于 mRNA 展示技术的最原始报道文章^[12], 通过几年的研究改进, 2000~2001 年间达到实验体系的最优化^[7,8]。成熟的 mRNA 展示体系能完成对容量 $>10^{13}$ 文库的筛选。正常情况下, 输入 mRNA 模板的 10%~40% 能形成融合产物, 每毫升翻译反应物可包含 $>5 \times 10^{13}$ mRNA-蛋白质融合分子^[9]。

由于 mRNA-蛋白质融合体的形成率和稳定性是影响 mRNA 展示效率的关键因素, 对 mRNA 展示技术的改进主要围绕连接子 (linker) 的改造展开。mRNA 与嘌呤霉素的结合方法有: 利用固相支持物 CPG (controlled pore glass) 的夹板结合、光交联结合和单链酶连结合。每种结合方式都有各自不同的连接子。在夹板结合中, 嘌呤霉素和 CPG 固相支持物连接形成 CPG-嘌呤霉素, 用以合成 3'端带有嘌呤霉素的寡聚脱氧核苷酸连接子^[1]。此 DNA 连接子上有核糖体翻译中止序列, 使嘌呤霉素有时间进入核糖体的 A 位点。而在光交联结合中, 带有补骨脂素部分的 DNA 连接子直接通过光交联反应与 mRNA 末端杂交^[9]。前两种方法都因为有杂交的

DNA 双链序列而影响了 mRNA 3'端的稳定性。最新改进的方法——单链酶结合法就是将以前的 DNA 单链连接子换成了聚乙烯连接子, 通过聚乙烯连接子上带有的荧光素, 在 T4 RNA 连接酶作用下使连接子与 RNA 结合, 大大提高了 mRNA 的稳定性, 增加了 mRNA-蛋白质融合体的合成效率^[9]。

mRNA 展示技术的另一项改进是将反转录步骤统一安排融合体纯化和体外筛选之间。这是因为: a. 反转录形成的 cDNA/mRNA 的杂交双链, 避免了 RNA 二级、三级结构对体外筛选的干扰; b. 筛选之后 mRNA 模板量大大减少, 仅为筛选前的 1%, 不足以进行有效的反转录反应^[7]。

3 mRNA 展示技术的应用

mRNA 展示技术主要应用于发现 RNA、小分子、蛋白质等新的蛋白质配体和阐明蛋白质与药物在细胞中的相互作用机制。其他可能的特殊运用有自组装蛋白质芯片、非天然氨基酸的文库构建和多肽的化学修饰。

3.1 通过 mRNA 展示技术发现新的配体

当前利用 mRNA 展示筛选新的具有指定特征的多肽或蛋白质的方法已经相当完备, 与 RNA、小分子和蛋白质结合的序列都能得到分离。经筛选到的适体亲和力强、特异性高。

在 RNA 适体的筛选中, 现在已能完成对容量 $>9 \times 10^{12}$ 的初始文库的筛选。被筛选到的多肽都与 RNA 以高亲和力结合 ($K_d = 0.5 \sim 5.0$ nmol/L) 且大部分被证明与野生型序列相比有相当或更高的特异性^[10]。Keefe 和 Szostak^[11]通过对 ATP 结合蛋白质的筛选来分离与生命产生前的远古蛋白同源的现代蛋白质。他们利用 mRNA 展示技术, 能筛到与 ATP 以高亲和力 ($K_d = 100$ nmol/L) 结合, 并能以 2 000 倍的特异性从其他核苷三磷酸盐中将 ATP 识别出来的克隆。估计其筛选比例能达到 $1/10^{12}$, 几乎与结合 ATP 的 RNA 的筛选相当。Roberts 实验室^[12]利用 mRNA 展示筛选 G 蛋白调控因子, 筛到的蛋白质除具有上述特点外, 还表现出与 G 蛋白调控 (GPR) 模序高度保守位点的差异, 显示了调控机制的复杂性。

3.2 利用 mRNA 展示技术进行特异性和相互作用分析

mRNA 展示技术也被用来进行包含已知抗原决定簇序列的筛选。Baggio 等^[13]利用两个随机文库

来研究与 c-myc 抗体 (9E10) 和牛胰岛素结合的多肽的特异性. mRNA 展示文库由 cDNA 文库转录而来, 使 mRNA 展示技术具有分离生物学相关的相互作用对的潜力. Hammond 实验室^[14]利用随机引物从几个不同的人类组织中构建 mRNA 展示文库, 这种方法产生的文库含有多种不同长度的序列. 通过对抗凋亡蛋白 Bcl-X_L 的筛选, 分离了多于 20 个的不同蛋白质, 包括已知的相互作用蛋白质, Bim、Bax 和 BCL2L12. 细胞文库还可以用作发现与感兴趣的药物相互作用的蛋白质或受体. McPherson 等^[15]用免疫抑制药物 FK506 作为细胞文库的靶标来进行筛选, 结果分离到了已知的相互作用蛋白 FKBP, 并定义了 FKBP 与 FK506 相互作用所必需的区域. 最近, 日本 Yanagawa 实验室又研究出一项 mRNA 展示的新应用, 利用 mRNA 展示技术筛选 DNA 结合蛋白, 用以分析 DNA 和蛋白质的相互作用. 因为转录因子几乎都与 DNA 结合形成异源二聚体, 此项新应用在转录因子复合体的筛选上将大有所为^[16].

3.3 mRNA 展示技术的一些特殊应用

把 mRNA 展示技术中的 mRNA-蛋白质融合体运用到高通量筛选技术蛋白质芯片技术中, 形成了一门新技术——自组装蛋白质芯片技术. 其原理是, 利用标准的 DNA 芯片上的 DNA 序列, 通过碱基互补配对作用与 mRNA-蛋白质融合体上的 RNA 杂交, 从而将 DNA 芯片转换成蛋白质芯片^[17]. 另一特殊应用是建立包含非天然氨基酸残基的 mRNA 展示文库^[18]. 含有体内步骤的体内展示技术, 如噬菌体展示和酵母双杂交技术只能利用 20 种天然氨基酸形成展示蛋白质. mRNA 展示技术不依赖活体细胞, 再结合提供非天然氨基酸的 tRNA 抑制物技术或通过四基密码子 (four-base codon) 介导就能成功构建包含非天然氨基酸的文库, 大大增加了展示文库的化学复杂性, 使得发现高亲和力、高特异性、高稳定性的配体分子更为容易^[19].

4 总结与展望

目前, mRNA 展示技术已经相当成熟, 以其自身的优势从各种展示技术中脱颖而出, 成为体外蛋白质筛选和定向进化的有力工具, 并在多个研究方面得到运用. 通过 mRNA 展示技术筛选到的分子能够成为控制和了解生物学过程的工具, 增加了对分子间相互作用和潜在疾病治疗机制的了解. 可以想象在不远的将来体外展示技术将在生物技术、医

药卫生和蛋白质组学等多个方面得到更广泛的应用. mRNA 体外展示技术还是一项不断发展的技术, 如何进一步增加 mRNA-蛋白质融合体的稳定性, 使 mRNA 在体外翻译系统中的降解达到最小; 如何进一步提高 mRNA-蛋白质融合体的生成效率, 以提供更大容量的文库和简化翻译后修饰的过程, 都是未来的主要研究方向, 如何将该技术标准化自动化以在更多的领域进行推广也是亟待解决的问题.

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 Nemoto N, Miyamoto-Sato E. *In vitro* virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome *in vitro*. *FEBS Lett*, 1997, **414** (2): 405~408
- 3 Hammond P W, Alpin J, Rise C E, *et al.* *In vitro* selection and characterization of Bcl-XL-binding proteins from a mix of tissue-specific mRNA display libraries. *J Biol Chem*, 2001, **276**(24): 20898~20906
- 4 Starck S R, Roberts R W. Puromycin oligonucleotides reveal steric restrictions for ribosome entry and multiple modes of translation inhibition. *RNA*, 2002, **8** (7): 890~903
- 5 Takahashi T T, Austin R J, Roberts R W. mRNA display: ligand discovery, interaction analysis and beyond. *Trends Biochem Sci*, 2003, **28** (3): 159~165
- 6 Schaffitzel C, Hanes J. Ribosome display: an *in vitro* method for selection and evolution of antibodies from libraries. *J Immunol Methods*, 1999, **231** (1~2): 119~135
- 7 Barrick J E, Takahashi T T. Selection of RNA-binding peptides using mRNA-peptide fusions. *Methods*, 2001, **23** (3): 287~293
- 8 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
- 9 Horisawa K, Tateyama S, Ishizaka M. *In vitro* selection of Jun-associated proteins using mRNA display. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32** (21): e169
- 10 Barrick J E, Takahashi T T, Ren J, *et al.* Large libraries reveal diverse solutions to an RNA recognition problem. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (22): 12374~12378
- 11 Keefe A D, Szostak J W. Functional proteins from a random-sequence library. *Nature*, 2001, **410** (6829): 715~718
- 12 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
- 13 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
- 14 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
- 15 McPherson M, Yang Y, Hammond P W, *et al.* Drug receptor identification from multiple tissue using cellular-derived mRNA display libraries. *Chem Biol*, 2002, **9** (6): 691~698
- 16 Tateyama S, Horisawa K, Takashima H, *et al.* Affinity selection of DNA-binding protein complexes using mRNA display. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34** (3): e27
- 17 Weng S, Gu K, Hammond P W, *et al.* Generating addressable protein microarrays with PROfusion covalent mRNA-protein fusion technology. *Proteomics*, 2002, **2**(1): 48~57
- 18 Li S, Millward S, Roberts R W, *et al.* *In vitro* selection of mRNA display containing an unnatural amino acid. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**(34): 9972~9973
- 19 Muranaka N, Hoshida T, Sisido M. Four-base codon mediated mRNA display to construct peptide libraries that contain multiple nonnatural amino acids. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34** (1): e7

mRNA Display Technology*

ZHANG Wan-Qiao, WANG Jian, HE Fu-Chu**

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract mRNA display provides a new powerful tool for *in vitro* selecting of peptides and proteins. In the selecting process, peptides are covalently attached to their own mRNA to form mRNA-protein fusions. These mRNA-protein fusions enable *in vitro* selection of peptide and protein libraries of more than 10^{13} different sequences. The experiment conditions and protocols have been optimized in recent years. The application of mRNA display technology is mainly in the discovery of ligands for many kinds of target molecules and the analysis and mechanism elucidation on interaction between proteins. With its great potential, there will be a wide application foreground in the application of mRNA display.

Key words *in vitro* display technology, mRNA display technology, mRNA-protein fusion

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2002-BA711A11, 2004-BA711A19), Science and Technology Program of Beijing (H030230280920).

**Corresponding author. Tel: 86-10-80727777-1304, E-mail: zhangwq119@yahoo.com.cn

Received: March 30, 2006 Accepted: April 29, 2006