

文章编号: 1004-0374(2010)08-0823-08

## 体外展示技术研究进展

卢明锋<sup>1, 2\*</sup>

(1 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; 2 山东理工大学生命科学院, 淄博 255091)

**摘要:** 该文系统阐述了核糖体展示、mRNA 展示及DNA 展示等体外展示技术的实验原理, 并对近年来各种体外展示技术所取得的进展进行了全面的回顾和总结。

**关键词:** 核糖体展示; mRNA 展示; DNA 展示

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A

### Advance in study on *in vitro* display technology

LU Ming-feng<sup>1, 2\*</sup>

(1 School of Life Sciences, Shandong Normal University, Ji'nan 250014, China; 2 School of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo 255091, China)

**Abstract:** This paper describes the principle of *in vitro* display technology such as ribosome display, mRNA display, DNA display and reviews in detail the advance in study on *in vitro* display technology in recent years.

**Key words:** ribosome display; mRNA display; DNA display

要想在实验室里模拟自然进化进行定向加速进化, 就必须像自然界中的细胞那样想办法将基因型与表型连接在一起。为实现上述目的, 20 世纪 80 年代以来多种体内展示技术, 如噬菌体展示<sup>[1]</sup>、细胞表面展示<sup>[2, 3]</sup>及质粒展示等相继发展起来, 并取得了巨大的成功<sup>[4]</sup>。但这些展示技术都需要借助活细胞的生命活动才能实现全部的流程, 所以不可避免地存在以下几个缺点<sup>[5]</sup>: 受转染效率的限制, 这类文库的库容 $<10^{10}$ ; 对不同于细胞环境条件下的选择无能为力; 不适于具有细胞毒性蛋白质的筛选; 不能用于对细胞存活有重要影响的蛋白质的筛选。由于完全采用无细胞系统进行体外蛋白质合成, 90 年代末发展起来的体外展示技术, 如核糖体展示(ribosome display)、mRNA 展示(mRNA display)和 DNA 展示(DNA display)有望克服以上难题成为新一代的展示技术。

### 1 核糖体展示(ribosome display)

#### 1.1 传统的核糖体展示

1982 年, Korman 等<sup>[6]</sup>利用免疫沉淀技术从细

胞中成功分离到了“核糖体-多肽-mRNA”三元复合物上的 mRNA。Kawasaki<sup>[7]</sup>于 1989 年提出可以应用相似的原理利用无细胞系统进行随机肽库筛选的专利。Ellinglon 和 Szostak<sup>[8]</sup>、Tuerk 和 Gold<sup>[9]</sup>于 1990 年建立了 SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)技术。1994 年, Mattheakis 等<sup>[10]</sup>在上述工作的基础上首次建立了实用化的多聚核糖体展示技术(polysome display)。随后的研究表明, 不论是在体内还是体外条件下, 核糖体上的新生多肽的折叠与翻译都是同步进行的<sup>[11]</sup>, 核糖体自身或核糖体 RNA、分子伴侣等都参与了新生多肽的折叠, 新生多肽的正确折叠无需与核糖体解离<sup>[12]</sup>。Lippert 等<sup>[13]</sup>、Hanes 和 Plückthun<sup>[14]</sup>分别在多聚核糖体展示技术的基础上, 通过调整 mRNA 与核糖体的比例至 1:1 使体外翻译产物中主要是单核糖体复合物, 并通过在无细胞体系中添加

收稿日期: 2009-12-16; 修回日期: 2009-12-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870520)

\*通讯作者 Tel: 0533-2780271; E-mail: lumingfeng4659@sina.com.cn

分子伴侣和蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)以确保产生正确折叠的蛋白质,核糖体展示技术宣告正式建立。

核糖体展示技术的原理如图1所示:首先通过PCR扩增用于核糖体展示技术的DNA文库。然后在无细胞翻译系统中进行偶连的转录和翻译。由于在蛋白质编码区缺乏终止密码子,释放因子EF因不能与核糖体结合,造成翻译过程减速并使核糖体停留在mRNA的3'-末端形成“肽-核糖体-mRNA”(peptide-ribosome-mRNA, PRM)复合物,然后用相应的抗原、配体或酶的底物对此核糖体展示的蛋白文库进行亲和筛选并通过RT-PCR获得下一轮展示的模板,所得DNA进入下一轮富集,部分DNA可通过克隆进行测序分析。

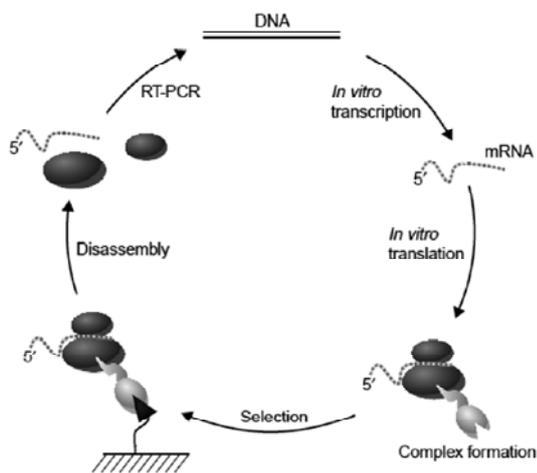


图1 ribosome display 流程图<sup>[15]</sup>

核糖体展示的DNA模板蛋白质编码区后必须有一段至少23~30个氨基酸的间隔区才能确保被展示蛋白质从核糖体上完整地退出,间隔区的长度会影响展示效率<sup>[16-18]</sup>。5'-末端非编码区和3'-末端非编码区添加茎环结构可有效避免mRNA的降解<sup>[10]</sup>,在亲和筛选过程中维持低温和高浓度的Mg<sup>2+</sup>能够防止PRM复合物的解离,添加anti-ssrA寡核苷酸等都能有效地提高核糖体展示的效率<sup>[15]</sup>。对无细胞系统的选择通常是要依据被展示蛋白的来源和性质。Rabbit reticulocyte lysate产生的主要是单核糖体复合物,而*E. coli* S30通常产生的是多聚核糖体复合物。原核无细胞系统在亲和筛选后需要用EDTA除去Mg<sup>2+</sup>使PRM复合物解离,然后才能进行RT-PCR。而真核无细胞系统无须PRM复合物解离,可直接进行*in-situ* RT-PCR。尽管转录和翻译偶联的无细胞体系更加简单高效,并且可以避免mRNA的降解和

阻碍蛋白质合成的二级结构效应的产生,但是非偶联的无细胞体系可以通过分别对转录和翻译步骤进行优化并且可以控制反应体系中mRNA的添加量以取得最佳实验效果<sup>[19]</sup>。2007年Zahnd等<sup>[20]</sup>与He和Taussig<sup>[21]</sup>分别就应用这两种无细胞体系进行的核糖体展示技术的操作步骤进行了标准化的整理和规范,这必将有利于核糖体展示技术的推广和运用,使之成为当之无愧的下一代展示技术。

## 1.2 附加强相互作用的高级核糖体展示(advanced ribosome-display with strengthened association, ARISA)

传统的核糖体展示是非共价连接,形成的PRM复合物不够稳定,筛选条件严格受限。由于每轮筛选后能够回收到的mRNA产量不是很高,所以常造成文库多样性的损失。自2002年以来,Taira实验室先后发展了三种方法来弥补传统的核糖体展示的不足。这三种方法都是基于引入额外的RNA-protein相互作用使PRM复合物间的联系得到增强,希望通过形成更加稳定的PRM复合物能够增加mRNA的回收率,进而提高核糖体展示的筛选效率。尽管这些方法大多数还处于理论验证阶段,但有些已经得到实际应用并取得了良好的实验结果。相信在这些技术不断改进的基础上一定能够成为传统核糖体展示的有益补充。

### 1.2.1 核糖体失活展示系统(ribosome-inactivation display system, RIDS)

RIDS的特点是在传统核糖体展示的基础上,通过在文库DNA模板上随机肽库编码区的下游插入了一个RTA(ricin A chain)基因,经体外转录后得到mRNA,随后在兔网织红细胞裂解系统(rabbit reticulocyte lysate)中进行体外翻译。由于RTA是真核生物核糖体大亚基的特异性抑制物,折叠后的RTA立即发挥其活性,催化真核生物核糖体大亚基上23S-28SrRNA毗邻GAGAtetra-loop的一个保守腺苷的N-糖苷键的水解。这样的一个单点脱嘌呤会改变延长因子的结合位点,使蛋白质的合成受到抑制,因为核糖体失活所以释放因子也不能与之结合,于是核糖体停在mRNA的终止密码子之前并形成极其稳定的PRM复合物(图2)。由于RIDS形成的PRM复合物即使在常温下也非常稳定,而且无需添加Mg<sup>2+</sup>和anti-ssrA寡核苷酸等特殊条件,所以RIDS更适合那些需要在特殊条件下进行亲和筛选的功能蛋白的体外选择实验。Zhou等<sup>[18]</sup>不但证明了RIDS用于体外选择的可行性,而且在2007年制定

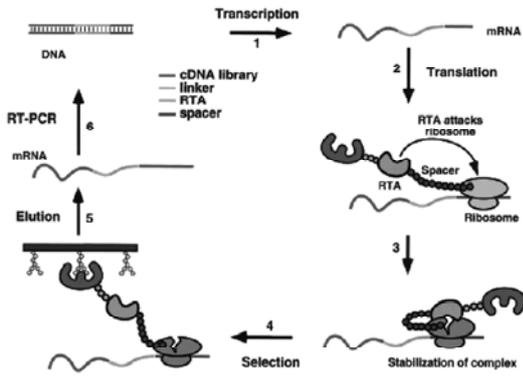


图2 RIDS体外筛选功能蛋白示意图<sup>[18]</sup>

了标准化的RIDS 操作程序<sup>[22]</sup>。

### 1.2.2 附加 TAR-TAT 相互作用的核糖体展示

艾滋病毒(HIV)的TAR (trans-activator responsive) 区段能与病毒编码的TAT (trans-activator) 蛋白特异性结合调节病毒基因组的复制。2002年Fujita等<sup>[23]</sup>提出在被展示蛋白编码区的上游引入TAR下游引入TAT的办法可获得了更加稳定的PRM复合物。实验结果表明,多个串联的TAT适体和TAT衍生物间结合确实获得了超强的RNA-protein间相互作用,其表观 $K_d$ 低于16 pmol/L。但多个串联的TAT适体和TAT衍生物之间可能通过反式相互作用形成复杂的RNA-protein网络使之失去实际价值。2005年,Inoue等<sup>[24]</sup>改用TAT蛋白49~86残基组成的TAT蛋白衍生物及 $K_d$ 降低了近200倍的一个新TAT适体间的强相互作用使核糖体展示中mRNA的回收率有了一定的提高。

### 1.2.3 附加Cv-MSp相互作用的核糖体展示

2003年,Sawata和Taira等<sup>[25]</sup>在DNA模板的T7启动子和SD序列之间插入了一个能形成热稳定二级结构的Cv序列,在表位标签蛋白的下游引入能与Cv特异结合的噬菌体MS2衣壳蛋白二聚体。mRNA与新生肽之间的连接确实得到了增强,即使在保留mRNA上的终止密码子的情况下,PRM复合物的稳定性也不影响后续的亲和筛选。2004年,Sawata等<sup>[26]</sup>以多聚核糖体展示的方式验证了该方法可用于检测蛋白质体外相互作用和体外选择。Wada等<sup>[27]</sup>于2008年将这种后来被称之为高稳定性核糖体展示(highly stabilized ribosome display)的技术应用于从人工肽库(artificial peptide library, APL)中筛选金属结合肽适体,并发现了一个与Co-IR[cobalt (?) complex immobilized on resin]有特殊亲和性的新的金属结合基序,证明了该方法用于肽适体的体外选择的可行性

和可靠性(图3)。“highly stabilized ribosome display”在其他领域的应用值得期待。

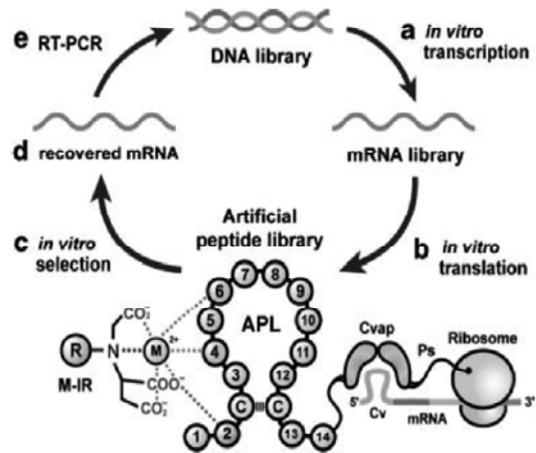


图3 “highly stabilized ribosome display”示意图<sup>[27]</sup>

## 2 mRNA 展示(mRNA display)

### 2.1 基于嘌呤霉素技术的mRNA 展示

1997年Nemoto等<sup>[28]</sup>首先报道了IVV (*in vitro* virus)技术,稍后Robert和Szostak<sup>[29]</sup>也发表了用于蛋白质体外选择的mRNA-肽融合体的文章,mRNA display由此建立.mRNA display的技术流程见图4。DNA文库首先进行体外转录形成mRNA文库,然后通过末端带有嘌呤霉素的寡聚核苷酸连接子上的DNA间隔区与mRNA的3'-端保守序列进行杂交将两者连接在一起。当3'-端带有嘌呤霉素连接子的mRNA在无细胞系统中完成体外翻译时,由于嘌呤霉素是一种相对分子质量小、化学性质稳定的氨酰tRNA类似物,可进入核糖体的A位点,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后形成稳定的mRNA-多肽融合体。利用亲和层析技术将mRNA-蛋白质融合体纯化出来,经RT-PCR形成cDNA-蛋白质融合体,亲和筛选出同靶物质结合的cDNA-蛋白质融合体,经PCR扩增后得到下一轮筛选DNA文库。

最初的mRNA display是采用夹板法(splint)形成mRNA-嘌呤霉素共轭物。由于连接效率较低,最终的mRNA-肽融合体形成率只有1%~10%<sup>[28,29]</sup>。2000年,Kurz等<sup>[30]</sup>在改用带有补骨脂素(psoralen)的DNA连接子直接通过光交联反应与mRNA 3'-末端杂交,mRNA-肽融合体形成率提高到了40%。但这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。2003年, Miyamoto-Sato等<sup>[31]</sup>使用Fluor-PEG Puro (p(dCp)2-T(Fluor)p-PEGp-(dCp)2-puromycin)连接子通过单链酶连接得到了更加稳定和高效的共轭嘌呤 mRNA 模板, mRNA-肽融合体形成率可高达70%, 而且引入荧光素标记后无须再进行放射性标记。先经RT-PCR形成cDNA-蛋白质融合体后再进行亲和筛选, 这不但可以降低亲和筛选过程中mRNA的降解, 而且反转录形成的cDNA/mRNA的杂交双链也避免了RNA二级、三级结构对体外筛选的干扰。2009年, Tabata等<sup>[32]</sup>将mRNA display与微流控(microfluidic)系统结合起来用于单链抗体片段(single-chain Fv, scFv)的体外选择和进化, 获得了每轮体外选择富集 $10^6 \sim 10^8$ 倍的超高富集率, 仅经1~2轮体外选择就从 $\sim 10^{12}$ 天然随机scFv文库中获得了高亲和力和专一性的抗体, 他们还进一步证明该方法同样适合蛋白质-DNA和蛋白质-药物间相互作用的高效体外选择。2009年, Shibui等<sup>[33]</sup>通过对mRNA display富集到目的CDNA-蛋白质融合体后进行适当稀释后进行PCR扩增, PCR扩增产物可直接用于测序和体外翻译, 由此建立了一个完全由体外系统获得scFv的方法。

## 2.2 基于 suppress tRNA 技术的 N-末端融合 mRNA 展示

虽然已经建立了多种行之有效的体外展示技术如ribosome display、基于嘌呤霉素技术的mRNA展示技术和DNA display技术等, 但这些体外展示技术大部分都是通过将被编码肽蛋白质的C-末端连接在编码mRNA的3'-末端, 所以不适于那些C-末端是其功能所必需的蛋白质的体外进化。2003年, Sawata和Taira<sup>[25]</sup>曾利用编码区N-末端融合表达的MS2衣壳蛋白二聚体与其mRNA5'-末端的Cv序列

间的特异性识别机制将蛋白质的N-末端与mRNA5'-末端连接起来。Doi和Yamagana<sup>[34]</sup>、Yonezawa等<sup>[35]</sup>的“STABLE”技术也可以通过N-末端融合表达的链霉亲和素将蛋白质的N-末端与亲和素标记的DNA模板5'-末端连接起来。由于上述两种方法的表型与基因型是非共价连接, 所以筛选条件受限。2004年, Figueiredo等<sup>[36]</sup>提出的“DARTs”技术的原理是共价连接, 但至今尚未应用于体外选择。2007年, Ueno等<sup>[37]</sup>建立了基于 suppress tRNA技术的N-末端融合mRNA display, 原理如图5所示: 双链DNA文库首先被转录成mRNA。然后, 用酰肼修饰的单链DNA连接子与mRNA编码区的上游序列进行分子杂交, 并用T4 RNA连接酶进行连接。此连接产物的酰肼基团随后与被酰基化到琥珀 suppress tRNA上的苯丙氨酸衍生物的酰基发生化学连接。经修饰后的mRNA在进行体外翻译过程中, 修饰后的氨酰 suppress tRNA倾向于占据紧邻起始密码子下游的琥珀终止子上的核糖体上的A位点, 苯丙氨酸便被掺入到生长中的肽链。由于直接在起始密码子的下游插入了一个终止密码子, 除非 Suppress tRNA携带的氨基酸掺入新生肽链否则翻译过程即告终止, 所以永远不会发生未融合肽与融合肽之间的竞争。于是, 新生肽的N端就与编码它的mRNA连接在了一起。根据被展示肽的性质筛选mRNA-peptide融合文库, 通过RT-PCR获得下一轮筛选的DNA文库。经过多轮筛选后即可通过RT-PCR扩增及测序得到表型分子的遗传型分子序列。

## 2.3 非核糖体肽的 mRNA 展示

非核糖体肽(the nonribosome peptides, NRP)如环孢菌素A、万古霉素和青霉素等代表着一类在临床治疗上有重要意义的资源。NRPs通常会被N-甲基化骨架、D-氨基酸、稀有侧链及糖基化所修饰, 这有利于增强其蛋白酶水解稳定性、对膜的通透能力以及与靶标的亲和性等。NRP通常不是由核糖体合成, 不需要mRNA模板, 而是由复杂的多酶聚合体即非核糖体多肽合成酶(nonribosomal ptide synthetases, NRPs)合成, 试图通过遗传操作NRPs生产新型NRP的难度极大<sup>[38]</sup>。采用mRNA display从mRNA指导的核糖体翻译产生的组合肽库中发现类NRP分子就成为了一个很好的备选方案。众所周知, 核糖体能够耐受含有非天然侧链氨基酸类似物的能力, 可以将多种非标准残基掺入肽链。从药理学的角度看, 做为非天然构件的N-甲基氨基酸(N-

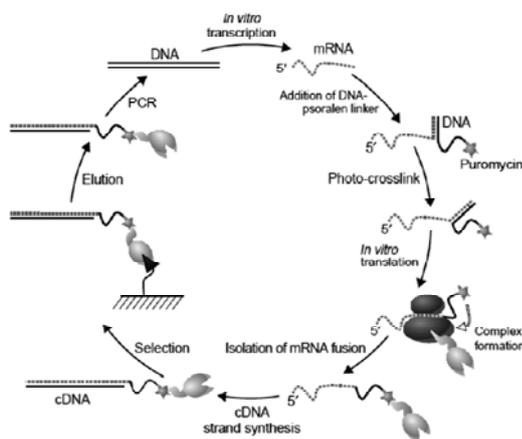


图4 mRNA display 流程图<sup>[15]</sup>

methyl amino acids,  $N^{\text{Me}}$ aa)有着特殊的价值,可以提高蛋白构象的刚性、蛋白酶抗性和跨膜透性<sup>[39]</sup>。采用Suppress tRNA技术最多可以将两个非天然氨基酸掺入到肽链中<sup>[40]</sup>。2008年, Kawakami 等<sup>[41]</sup>引入遗传密码重新编程的概念,结合弹性酶(flexizyme)和PURE(protein synthesis using recombinant element)系统这两种关键技术,成功合成了含有多个  $N^{\text{Me}}$  甲基化氨基酸和非蛋白氨基酸的多肽。Flexizyme系统是一个基于核酶的全新的 tRNA 乙酰化系统,可以将任一氨基酸装载到任一 tRNA 上。PURE 系统是一个全部采用重组元件的体外蛋白质合成系统,其所有组分可根据需要随意调整。实验原理如图 6 所示: Flexizyme 识别  $N^{\text{Me}}$ aa 酯键上的 LG 基团和 tRNA3' - 末端的 3 个保守序列 CCA, 完成 tRNA 的氨乙酰化, 将  $N^{\text{Me}}$ aa 装载到指定的 tRNA 上形成相应的  $N^{\text{Me}}$ aa-tRNA。随后将各种  $N^{\text{Me}}$ aa-tRNAs 添加入 wPURE (*withdraw* protein synthesis using recombinant elements) 系统中, 由于缺少相应的  $^{aa}$ tRNA 合成元件, 在 mRNA 上特定密码子位点即可将相应的  $N^{\text{Me}}$ aa 掺入到新生肽链中。与 Kawakami 采用 Flexizyme 系统合成  $N^{\text{Me}}$ aa-tRNA 的方式不同, 2008年, Subtelny 等<sup>[42]</sup>采用的是 2004年, Merryman 和 Green<sup>[43]</sup>所创造的方法并加以适当改进, 在  $^{aa}$ tRNA 基础上通过三步化学反应合成  $N^{\text{Me}}$ aa-tRNA。两种方法各有所长, 可以彼此互补不足。结合 mRNA display 完全有可能从中得到具有更好生物稳定性和生物利用度的候选肽类药物。遗传密码重新编程更重要意义的还在于, 我们完全可以利用上述两种方法更方便、更经济地合成由任意氨基酸组成的随机肽库, 而无需采用三核苷酸亚磷酸酰胺合成子<sup>[44]</sup>、Multi Line Split DNA Synthesis<sup>[45]</sup> (MLSDS) 或通过调整密码子特定位点碱基组成

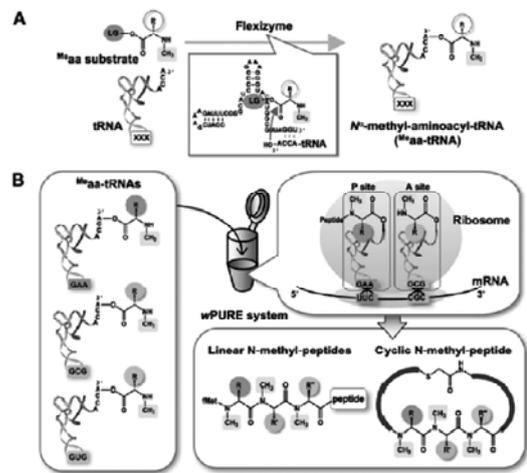


图6 遗传密码重新编程条件下的 mRNA 指导的  $N^{\text{Me}}$  甲基多肽合成示意图<sup>[41]</sup>

的方式来得到仅由几种有限的氨基酸组成蛋白质文库。这对筛选具有新折叠类型的天然蛋白质和研究蛋白质折叠起源问题十分有利。

### 3 DNA展示(DNA display)

#### 3.1 基于体外区隔化(*in vitro compartmentalisation, IVC*)的DNA展示

1998年, Tawfik和Griffiths<sup>[46]</sup>模拟天然细胞用液滴直径 $\sim 2 \mu\text{m}$ 体积 $\sim 5\text{fl}$ 的乳胶囊将底物偶联的编码DNA与表达产物通过IVC形成人工细胞。这种方法仅通过乳胶囊中的小液滴就可将基因型与表型连接在一起, 目前已成功用于DNA甲基转移酶M. HaeIII、限制性内切酶及DNA聚合酶的体外选择和进化<sup>[47]</sup>。1999年, Doi和Yanagawa<sup>[34]</sup>建立的“STABLE”(streptavidin-biotin linkage in emulsions) display通过在IVC形成的w/o乳胶囊中将DNA编码的链霉亲和素融合蛋白与生物素标记的编码DNA分子非共价连接在一起, DNA回收率能够达到95%。2002年, Sepp等<sup>[48]</sup>建立的Microbead display是通过链霉亲和素包被的聚苯乙烯微珠将被展示蛋白质与生物素标记的编码DNA物理连接在IVC形成的乳胶囊中, 单个的微珠用流式细胞仪进行荧光素激活的细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)。尽管FACS的筛选通量可高达 $10^5/\text{s}$ , 但受流式细胞技术的限制只适用于容量 $\sim 10^9$ 文库的选择。由于在同一个微珠可以同时结合上百个基因表达产物, 所以Microbead display非常适合结合性低、专一性高蛋白的筛选。Microbead display最大的优点还在于它不必仅通过与过渡态类似物或酶的

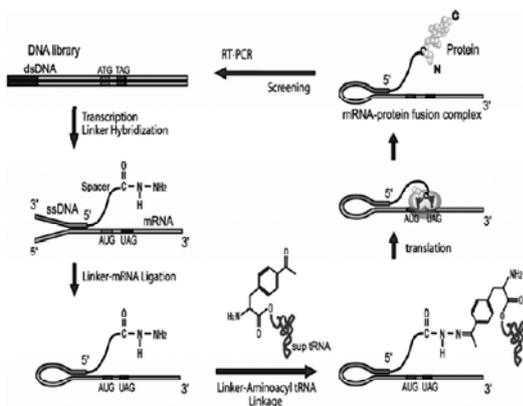


图5 mRNA-肽N-末端融合技术示意图<sup>[37]</sup>

抑制剂结合能力来进行酶的筛选,而可以同时针对酶的底物识别能力、特定产物的形成能力、酶的催化速率和周转率等全部性质进行选择。2003年,Griffiths和Tawfik<sup>[49]</sup>采用Microbead display从一个 $3.4 \times 10^7$ 的磷酸三酯酶突变文库中选择到一个比野生型酶的催化效率高63倍的磷酸三酯酶。2004年,Bertschinger和Neri<sup>[50]</sup>描述了一种共价连接的DNA展示。通过PCR在DNA文库分子的3'-末端引入5'-GGFC-3'(F代表5-荧光素脱氧胞嘧啶)序列,然后与体外转录/翻译混合物共包裹于w/o乳胶囊中。在体外翻译过程中,由于DNA编码的随机多肽N-端融合表达的DNA甲基转移酶M. Hae III可以与5'-GGFC-3'序列上的F形成共价键,所以基因型与表型间是通过共价键连接在一起的。从理论上讲,2004年,Figueiredo等<sup>[36]</sup>通过融合表达的VirD2酶活性将表型和基因型共价连接在一起的DARTs(DNA/protein attachment and recovery tools)展示系统也可采用IVC的形式实现。2009年,Sumida等<sup>[51]</sup>发挥了基于IVC的DNA展示的独特优势,在“STABLE”技术的基础上建立了适用于Fab片段的体外选择的双顺反子DNA展示。与其他体外展示只能应用于scFvs的体外成熟不同,由于无需删除DNA文库模板上的终止密码子,所以可以编码多个开放阅读框,非常适合于寡聚蛋白和异源二聚体Fab片段的体外选择。Yanagawa的实验证明采用热处理作为选择压力能够从一个保守区的疏水核心被随机化的Fab片段文库中选择到了更加稳定的Fab片段的编码基因。

### 3.2 顺式展示技术

基于IVC的DNA display具有与表型相连的基因型是DNA模板所以更加稳定,能够在一些特殊条件下进行选择。但受乳胶囊液滴体积的限制,文库容量最大只能达到 $10^9 \sim 10^{10}$ ,远小于其他体外展示技术 $10^{12} \sim 10^{14}$ 的文库容量<sup>[47]</sup>,这在筛选结果的亲和力和特异性与展示文库的库容成正相关的情况下是非常不利的。而且要形成大小合适的人工细胞往往需要掌握一定的技巧,DNA模板浓度也要随人工细胞的体积进行相应的调整才能实现人工细胞中的单基因分布方式<sup>[52]</sup>。2000年Gerald<sup>[53]</sup>提出利用具有自身模板识别功能的反式作用因子介导分子文库基因型与表型特异性连接的构想,并指导其课题组相继建立了以CIS系统和共价抗体展示技术(covalent antibody display, CAD)为代表的两种新的DNA展示技

术,统称为顺式展示技术。这两种技术均不需IVC,文库容量能够达到 $10^{12}$ ,既弥补了IVC的不足,又保留了DNA展示的优点。在R1等IncB质粒的复制过程中,RepA蛋白与ori区的结合是复制起始的基础。在RepA与ori区之间有一个被称为CIS的顺式作用元件,该元件具有Rho依赖的转录终止子活性,在转录过程中引起RNA聚合酶在DNA模板上的停顿,新生的RepA专一性地结合到CIS区,并立即在CIS的引导下与自身模板DNA的ori区特异性结合,进而实现基因型与表现型之间的特异性连接。2004年,Odegrip等<sup>[54]</sup>利用RepA的顺式活性建立了CIS展示系统,目前该技术已经被英国isogenica公司作为核心技术用于无细胞人工突变等方面的研究。2005年,Reiersen等<sup>[55]</sup>利用P2噬菌体复制起始蛋白P2A的共价顺式活性构建了新的CAD系统,不过其筛选过程效果欠佳,尚待改进。

## 4 小结

尽管公开发表的成功的体外选择实例绝大多数是采用核糖体展示和mRNA展示,但目前还很难预测将来哪一种技术会成为主导。核糖体展示原理简单、文库容量大、技术成熟和易于操作,因而在肽、scFv、配体结合蛋白及酶等多个领域得到广泛应用并取得成功。mRNA展示因采用嘌呤霉素小分子实现了表型与基因型间的共价连接,所以具有很多优势。mRNA展示弥补了核糖体展示形成的PRM复合物稳定性不足的缺点,可在极端条件下进行体外选择。mRNA展示可获得最大的文库容量( $1.4 \times 10^{14}$ ),随机区段也最长,可在108个残基中进行连续80个氨基酸的随机化,在最大限度的探索蛋白质空间方面具有得天独厚的优势<sup>[54]</sup>。不仅如此,mRNA展示在N端展示、非核糖体肽等非天然蛋白质或多肽的体外展示及通过构建天然肽库在蛋白质组水平上研究蛋白质间相互作用关系等方面也有其独到之处<sup>[55]</sup>。但由于mRNA display需要对mRNA及嘌呤霉素-mRNA连接产物进行纯化,作为技术关键的连接子也需进行复杂的化学反应合成,在没有建立相关技术平台的实验室难以开展,所以限制了该技术的推广应用。公平地讲各种体外展示技术各有所长,彼此可以弥补不足,这给各个实验室依据自身实验条件和实验目的合理选择适当的技术体系提供了空间。相信随着各种体外展示技术的进一步成熟与发展,必将在新药研发、酶及抗体的体外

选择等相关领域取得更大的成功。

### [参 考 文 献]

- [1] Smith GP, . Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, 228: 1315-7
- [2] Cull MG, JF, Schatz PJ. Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the lac repressor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(5): 1865-9
- [3] Lee SY, Choi JH, Xu Z, et al. Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol.*, 2003, 21(1): 45-51
- [4] Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, et al. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(9): 1073-8
- [5] Hans LH, Stein V, Griffiths AD, et al. New genotype-phenotype linkages for directed evolution of functional proteins. *Curr Opin Struct Biol.*, 2005, 15(4): 472-8
- [6] Korman AJ, Knudsen PJ, Kaufman JF, et al. cDNA clones for the heavy chain of HLA-DR antigens obtained after immunopurification of polysomes by monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79(6): 1844-8
- [7] Kawasaki GH. Cell-free synthesis and isolation of novel genes and polypeptides. US Patent, 1989, WO 91/05058
- [8] Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, 346(6287): 818-22
- [9] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249(4986): 505-10
- [10] Mattheakis LC, Bhatt RR, Dower WJ. An *in vitro* polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(19): 9022-6
- [11] Fedorov AN, Baldwin TO. Co-translational protein folding. *J Biol Chem*, 1997, 272(52): 32715-8
- [12] Netzer WJ, Hartl FU. Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature*, 1997, 388: 343-9
- [13] He MY, Taussig MJ. Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for *in vitro* display and evolution of antibody combining sites. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 5132-4
- [14] Hanes J, Plückthun A. *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(10): 4937-42
- [15] Amstutz P, Forrer P, Zahnd C, et al. *In vitro* display technologies: novel developments and applications. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 12(4): 400-5
- [16] Schaffitzel C, Hanes J, Jermutus L, et al. Ribosome display: an *in vitro* method for selection and evolution of antibodies from libraries. *J Immunol Methods*, 1999, 231(1): 119-35
- [17] He MY, Taussig MJ. Ribosome display: cell-free protein display technology. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2002, 1(2): 204-12
- [18] Zhou JM, Fujita S, Warashina M, et al. A novel strategy by the action of ricin that connects phenotype and genotype without loss of the diversity of libraries. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(4): 538-43
- [19] He MJ, Khan F. Ribosome display: next-generation display technologies for production of antibodies *in vitro*. *Expert Rev Proteomic*, 2005, 2(3): 421-30
- [20] Zahnd C, Amstutz P, Plückthun A. Ribosome display: selecting and evolving proteins *in vitro* that specifically bind to a target. *Nat Methods*, 2007, 4(3): 269-79
- [21] He MY, Taussig MJ. Eukaryotic ribosome display with *in situ* DNA recovery. *Nat Methods*, 2007, 4(3): 281-8
- [22] Fujita S, Zhou JM, Taira K. *Protein Engineering Protocols* (Methods In Molecular Biology) [M]. New Jersey, USA: Humana Press, 2007: 352: 221-36
- [23] Fujita S, Sawata SY, Taira K, et al. Novel approach for linking genotype to phenotype *in vitro* by exploiting an extremely strong interaction between rna and protein. *J Med Chem*, 2002, 45: 1598-606
- [24] Inoue A, Sawata SY, Taira K, et al. Additional RNA-Protein interactions facilitate *in vitro* selection by ribosome display. *Chem Lett*, 2005, 34(1): 26-7
- [25] Sawata SY, Taira K. Modified peptide selection *in vitro* by introduction of a protein-RNA interaction. *Protein Eng*, 2003, 16(12): 1115-24
- [26] Sawata SY, Suyama E, Taira K. A system based on specific protein-RNA interactions for analysis of target protein-protein interactions *in vitro*: successful selection of membrane-bound Bak-Bcl-xL proteins *in vitro*. *Protein Eng, Des Sel*, 2004, 17(6): 501-8
- [27] Wada A, Sawata SY, Ito Y. Ribosome display selection of a metal-binding motif from an artificial peptide library. *Biotechnol Bioengineering*, 2008, 101(5): 1102-7
- [28] Nemoto N, Miyamoto-Sato E, Hiroshi Y, et al. *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): 405-8
- [29] Roberts RW, Szostak JW. RNA-peptide fusions for the *in vitro* selection of peptides and protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(23): 12297-302
- [30] Kurz M, Gu K, Lohse PA. 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
- [31] Miyamoto-Sato E, Takashima H, Fuse S et al. Highly stable and efficient mRNA templates for mRNA-protein fusions and C-terminally labeled proteins. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(15): e78
- [32] Tabata N, Sakuma Y, Honda Y, et al. Rapid antibody selection by mRNA display on a microfluidic chip. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(8): e64
- [33] Shibui T, Kobayashi T, Kanatani K. A completely *in vitro* system for obtaining scFv using mRNA display, PCR, direct sequencing, and wheat embryo cell-free translation. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(7): 1103-10
- [34] Doi N, Yanagawa H. STABLE: protein-DNA fusion system for screening of combinatorial protein libraries *in vitro*. *FEBS Lett*, 1999, 457(2): 227-30
- [35] Yonezawa M, Doi N, Kawahashi Y, et al. DNA display for *in vitro* selection of diverse peptide libraries. *Nucleic Acids*

- Res, 2003, 31(19): e118
- [36] Figueiredo P, Roberts RL, Nester EW. DARTs: DNA/protein attachment and recovery tools. *Proteomics*, 2004, 4(10): 3128-40
- [37] Ueno S, Arai H, Suzuki M, et al. An mRNA-protein fusion at N-terminus for evolutionary protein engineering. *Int J Biol Sci*, 2007, 3(6): 365-74
- [38] Baltz RH. Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(12): 1533-40
- [39] Sagan S, Karoyan P, Lequin O, et al. N- and alpha-methylation in biologically active peptides: synthesis, structural and functional aspects. *Curr Med Chem*, 2004, 11(21): 2799-822
- [40] Forster AC, Tan ZP, Nalam MN, et al. Programming peptidomimetic syntheses by translating genetic codes designed de novo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(11): 6353-7
- [41] Kawakami K, Murakami H, Suga H. Messenger RNA-programmed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides. *Chem Biol*, 2008, 15(1): 32-42
- [42] Subtelny AO, Hartman MC, Szostak JW. Ribosomal synthesis of N-methyl peptides. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(19): 6131-6
- [43] Merryman C, Green R. Transformation of aminoacyl tRNAs for the *in vitro* selection of "drug-like" molecules. *Chem Biol*, 2004, 11(4): 575-82
- [44] Kayushin AL, Korosteleva MD, Miroshnikov AI, et al. A convenient approach to the synthesis of trinucleotide phosphoramidites-synthons for the generation of oligonucleotide/peptide libraries. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(19): 3748-55
- [45] Soramoto S, Ueno S. Design of various high quality random libraries for *in vitro* protein evolution. *Genome Informatics*, 2002, 13:527-8
- [46] Tawfik DS, Griffiths AD. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(7): 652-6
- [47] Leemhuis H, Stein V, Griffiths AD, et al. New genotype-phenotype linkages for directed evolution of functional proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 2005, 15(4): 472-8
- [48] Sepp A, Tawfik DS, Griffiths AD. Microbead display by *in vitro* compartmentalization: selection for binding using flow cytometry. *FEBS Lett*, 2002, 532(3): 455-8
- [49] Griffiths AD, Tawfik DS. Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by *in vitro* compartmentalization. *EMBO J*, 2003, 22(1): 24-35
- [50] Bertschinger J, Neri D. Covalent DNA display as a novel tool for directed evolution of proteins *in vitro*. *Protein Eng Des Sel*, 2004, 17(9): 699-707
- [51] Sumida T, Doi N, Yanagawa H. Bicistronic DNA display for *in vitro* selection of Fab fragments. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(22): e147
- [52] Rothe A, Surjadi RN, Powe BE. Novel protein in emulsions using *in vitro* compartmentalization. *Trends Biotechnol*, 2006, 24(12): 587-92
- [53] Gerald KF. *In vitro* display technologies-new tools for drug discovery. *Drug Discov Today*, 2000, 5(6): 253-8
- [54] Odegrip R, Coomber D, Eldridge B, et al. CIS display: *In vitro* selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 2806-10
- [55] Reiersen H, Lobersli I, Loset GA, et al. Covalent antibody display-an *in vitro* antibody-DNA library selection system. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(1): e10
- [56] Keefe AD, Szostak JW. Functional proteins from a random-sequence library. *Nature*, 2001, 410(6829): 715-8
- [57] Valencia CA, Cotton SW, Dong B, et al. mRNA-display-based selections for proteins with desired functions: a protease-substrate case study. *Biotechnol Prog*, 2008, 24(3): 561-9