中国科学 C 辑: 生命科学
2007 年 第 37 卷 第 4 期: 410~415
http://www.scichina.com

《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

胸苷酸合成酶 mRNA 亲和多肽的鉴定及其对翻译过程的抑制作用

阎 松[①②] 牛荣丽[②] 王 征[②] 林秀坤[②*]

(① 大连交通大学 环境与化学工程学院, 大连 116028; ② 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)

摘要 胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, TS)是催化生物体内胸苷酸合成所必需的酶, 多年来一直作为肿瘤化疗的靶点. 研究表明, TS 是一种 RNA 结合蛋白, 可以与其自身 mRNA 的 2 个位点结合, 使 mRNA 翻译受阻. 本文以 mRNA 体外展示技术进行了由大容量多肽库(>10^{13})中筛选胸苷酸合成酶 mRNA 亲和多肽的研究, 对随机库进行了 12 轮循环的选择及扩增. 结果表明, 与初始库相比, 经选择循环之后, 碱性氨基酸及芳香族的苯丙氨酸含量明显增加, 它们在 TS RNA 与蛋白质的相互作用中扮演着重要角色. 按其理化特性对每一随机位点的氨基酸进行分类, 并与初始库比较, 发现位点 1, 12, 17 和 18 具有明显的带正电荷的特性, 表明碱性侧链参与了与 RNA 的结合. 二级结构预测表明, 随着筛选的进行, 与 TS mRNA 亲和的多肽显示出明显的螺旋倾向, 而且形成螺旋的区域富含碱性氨基酸. 凝胶迁移及体外翻译实验证实, 选择循环之后的多肽能够与 TS mRNA 高度亲和, 并能抑制 TS mRNA 的翻译. 本研究表明 mRNA 体外展示方法得到的亲和多肽可以用作新的 TS RNA 的翻译抑制剂, 并有可能成为一类新型的抗肿瘤药物.

关键词 胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, TS) mRNA 体外展示 筛选 亲和多肽

胸苷酸合成酶是一种叶酸依赖性酶, 能催化生物体内的 2′-脱氧尿苷-5′-一磷酸(2′-deoxyuridine-5′-monophosphate, dUMP)甲基化形成 2′-脱氧胸苷-5′-一磷酸(2′-deoxythymidine-5'-monophosphate, dTMP)[1], 后者进一步在细胞内代谢为脱氧胸苷三磷酸(dTTP), dTTP为DNA合成所必需的前体物质. 因这一反应是细胞内dTMP的唯一来源, 多年来TS一直是肿瘤化学治疗的重要靶点[2,3].

除具催化活性外, TS还是一种RNA结合蛋白[4]. 已鉴定了TS mRNA分子上能够与TS结合的 2 个顺式作用因子. 一个是mRNA分子 5′端包含起始密码AUG的 30 核苷酸序列, 另一个为TS编码区 480~550 区间的70个核苷酸序列[5]. TS与自身mRNA的相互作用可使mRNA翻译受阻. 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)、叶酸类似物ZD1694(Tomudex)等化疗药物可与TS蛋白结合, 结合后的复合物不能与TS mRNA作用, 上述负反馈调控机制丧失, 导致体内TS的表达升高. 这种翻译自调控模型是肿瘤细胞产生抗药性的重要分子机制之一[6].

mRNA展示技术是一种大容量文库的体外筛选方法(>10^{13})[7], 这一方法的基本原理是借助一种蛋白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)与蛋白表型(多肽)的结合.

收稿日期: 2005-12-05; 接受日期: 2006-12-20
国家自然科学基金项目(批准号: 30472043)和山东省科技厅项目(批准号: 2004C07)资助
* 联系人, E-mail: linxiukun@yahoo.com

本研究建立了mRNA体外展示的筛选方法[8], 对肽库产生及筛选步骤进行了分析. 为获得TS mRNA亲和多肽, 进行了 12 个循环的选择扩增, 对测序结果进行了分析和结构预测, 并以凝胶迁移及TS mRNA体外翻译抑制实验证实了亲和多肽的功能.

1　材料与方法

1.1　主要试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTP、RNA 酶抑制剂、AMV 反转录酶、兔网织红细胞体外翻译试剂盒 (L4960)及 pGEM-Luc 质粒购于 Promega 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(#1394)、Oligo-(dT)纤维素为 Ambion 公司生产, 生物素标记的琼脂糖凝胶为 Invitrogen 生物技术公司产品, pMD18-T 载体由大连 TakaRa 公司生产, 同位素 α-^{32}P-dCTP 是福瑞公司产品, 含 TS cDNA 全序列的质粒 pcEHTS 由耶鲁大学 Edward Chu 博士实验室赠予.

1.2　PCR 扩增

(1) 编码多肽库的 DNA 库: 由哈佛大学 Hughes 医学协会提供, 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(下画线示 T7 启动子; 黑斜体示编码 21 个氨基酸残基的随机区; 黑体示 His-tag 序列).

(2) DNA 库扩增引物: 上游引物为 5′-TTCTAA-TACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAAT TACA-3′, 下游引物为 5′-ATAGCCGGTGATGATGA-TGATGATGATGGC-3′.

(3) PCR 反应总体积 25 μL, 其中含 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, $MgCl_2$(25 mmol/L) 2.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL, Taq 酶(5 U/ μL) 0.25 μL, 引物(40 ng/μL) 1 μL, 模板 DNA(即 DNA 库, 50 ng/μL) 1 μL. 反应条为: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 25 个循环; 72℃延伸 10 min. 胶回收纯化 PCR 产物.

1.3　体外转录

采用 T7 RNA 聚合酶, 以上述 DNA 库为模板, 利用体外转录试剂盒, 获得 RNA 库. 反应产物以 6%变性丙烯酰胺胶进行纯化.

1.4　光交联反应

(1) 嘌呤霉素寡核苷酸结构: 5′补骨脂素(psoralen)-TAGCCGGTG AAA AAA AAA AAA AAA-$(PEG)_2$-ACC-嘌呤霉素-3′.

(2) RNA 与嘌呤霉素修饰的 DNA 接头(puromycin-oligonucleotides linker)连接. 800 μL 连接体系中含 3 μmol/L 模板 RNA 48 μL, 7.5 μmol/L linker 60 μL, 100 mmol/L KCl 24 μL, 20 mmol/L 的 Hepes (pH 7.5) 16 μL, 1 mmol/L EDTA (pH 8.0) 16 μL, 1 mmol/L 亚精胺 8 μL. 将 1.5 mL 离心管置于 80℃水浴 5 min, 室温放置 15 min, 以 365 nm 的紫外照射 15 min, 乙醇沉淀法回收产物.

1.5　体外翻译及 mRNA 蛋白质融合体的分离

将上述连接产物加入 50 μL 兔网织红细胞体外翻译体系, 30℃温育 1 h. 之后加入 2.5 mol/L KCl 10 μL, 1 mol/L $MgCl_2$ 3 μL, –20℃过夜. 翻译产物与 10 倍体积的结合缓冲液(100 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0), 10 mmol/L EDTA, 1 mol/L NaCl, 0.1% Triton X-100)混匀, 65℃水浴 3~4 min, 10000 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 2 次, 加 50 μL ddH_2O 室温振摇 1 h 释放融合肽.

1.6　cDNA/mRNA 蛋白质融合体生成

通过反转录获得 cDNA/mRNA 蛋白质融合体. 乙醇沉淀法回收融合产物, 转入 20 μL 反转录体系中, 其中含下游引物 200 ng , 5×cDNA 合成缓冲液 4 μL, dNTP(2.5 mmol/L)4 μL, RNA 酶抑制剂(40 U/μL)1 μL, AMV 反转录酶(10 U/μL) 3 μL, 37℃反应 1 h.

1.7　与固定化 TS30 RNA 结合及亲和肽的分离

(1) 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′.

(2) 将生物素标记的 TS30 RNA(5 μmol/L)固定于 Streptavidin 琼脂糖凝胶载体上, 25℃振摇 1 h, 然后在 400 μL 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 μg/mL 酵母 tRNA)中洗涤并重悬浮, 加入 20 μL 反转录翻译产物, 室温振荡 2 h, 离心取沉淀, 100 μL 洗脱液(无酵母

tRNA)清洗 5~6 遍, 加入 RNA 酶 A(1 mg/mL)、蛋白酶 K (1 mg/mL)各 1 μL, 37℃振荡洗脱 1 h 释放结合分子, 获得的 cDNA 产物可用于下一循环的 PCR 扩增.

1.8 PCR 产物的克隆和测序

将 PCR 扩增产物纯化并克隆到 pMD18-T 载体上, 转化 *E. coli* DH5α, 进行蓝白斑筛选, 随机挑取阳性转化子由上海英骏生物技术有限公司进行序列测定.

1.9 RNA-蛋白结合实验

(1) 质粒 pcEHTS 以 *Hind* Ⅲ酶切线性化, SP6 RNA聚合酶体外转录, 得到人TS mRNA (TS1-1524)的全序列[5].

(2) RNA-蛋白结合实验, 即凝胶迁移实验(electrophoretic gel mobility shift assay, EMSA)[9]. 将融合肽以RNA酶消化, 获得的多肽(2 μg)(第 8 轮, 第 12 轮循环筛选多肽)与 ^{32}P标记的TS mRNA(2 fmol)室温孵育 15 min, 反应混合液总体积 30 μL, 包含 10 mmol/L Hepes (pH 7.4), 40 mmol/L KCl, 3 mmol/L $MgCl_2$, 1 μL RNA酶抑制剂, 250 mmol/L 2-巯基乙醇, 5%甘油. 未标记的酵母tRNA在加入 12 轮循环多肽前与标记的探针混匀. 反应结束以 4%非变性丙烯酰胺胶(丙烯酰胺:甲叉丙烯酰胺, 60:1)检测, 放射自显影观察.

1.10 TS mRNA 的翻译抑制

TS mRNA 的翻译抑制使用兔网织红细胞体外翻译体系. 反应混合液(总体积 20 μL)中包含兔网织红细胞(14 μL), 氨基酸(0.4 μL), RNA 酶抑制剂(0.4 μL)及不同剂量(10, 50, 100 ng)的第 12 轮循环的多肽, 30℃与全长 TS mRNA 孵育 1 h. 翻译产物以 SDS-PAGE 胶检测, 放射自显影观察.

TS mRNA 亲和多肽的筛选过程如图 1 所示.

2 结果与讨论

2.1 肽库产生及 TS mRNA 亲和多肽的筛选

编码多肽库的 DNA 库是通过 PCR 扩增构建的一双链 DNA 序列(图 2), 包含编码 21 个氨基酸残基的随机区. 5′引物具 T7 启动子, 烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)翻译增强子, 起始密码子; 3′引物有 His_6 tag, 以及嘌呤霉素 linker 的互补序列.

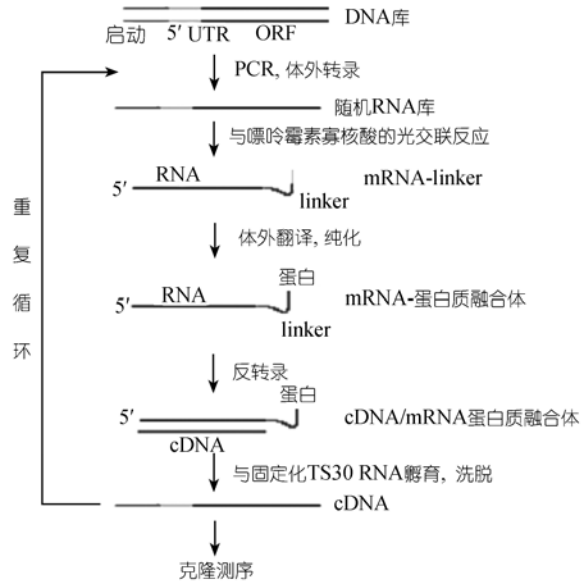

图 1 TS mRNA 亲和多肽的筛选过程

DNA 库由 T7 RNA 聚合酶体外转录为 mRNA, 然后寡核苷酸 linker 通过光交联反应连接到 RNA 的 3′端, linker 具有 Oligo-dA, 2 个聚乙二醇及 dAdCdC-嘌呤霉素序列. mRNA-linker 复合物经体外翻译, 通过嘌呤霉素使 mRNA 与其编码产生的多肽连接, 形成 mRNA-蛋白质融合体. mRNA 展示肽由 Oligo-dT 纤维素纯化, 经反转录产生稳定的 cDNA/mRNA 蛋白质模板用于之后的扩增. 这样 DNA 库通过体外转录和翻译形成了包含 10^{13} 不同序列的展示肽库.

以TS30 RNA作为亲和多肽筛选的靶物质, 它是人TS mRNA 5′上游的蛋白结合位点, 位于nt 81~110, 是包含起始密码子的 30 核苷酸序列, 具有稳定的颈环结构[5]. mRNA展示库与固定化的TS30 RNA孵育, 洗去非特异结合的物质, 然后加酶洗脱得到cDNA, 作为下一循环的DNA库.

图 2 用于 mRNA 展示的 DNA 库

5′到 3′, 依次为 T7 启动子, TMV 翻译增强子, 起始密码子, 随机区序列, 6 个 His 的 tag, linker 杂交序列

2.2　筛选多肽的序列分析

经过 12 个循环的选择和扩增, 随机选取第 12 轮(12th round, R12)及初始库(round zero, R0)的各 30 个克隆进行测序, 根据 DNA 序列得出肽的序列, 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 30 个筛选多肽的每种氨基酸含量与初始库的含量作一比较(图 3), 可以看出, 初始DNA库中, 还含有一定比例的终止密码子(Z, 1.7%), 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含量明显增加, 精氨酸、组氨酸及赖氨酸含量分别比初始肽库增加了 79%, 70%和 17%, 而且其中 2/3 的序列含有碱性氨基酸对(数据未列出), 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 27%和 42%. 碱性氨基酸尤其是精氨酸在mRNA与蛋白质结合中的重要作用多有报道 [10]. Voeller等人 [11] 合成了一系列 17-mer的多肽, 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 个亲和多肽中有 5 个多肽分子至少含有一个精氨酸残基, 突变分析表明亲和多肽位点 14 和 43 中的精氨酸是与人TS mRNA结合所必需的. Sidiqi等人 [12]研究了poly (C)结合蛋白 1 第三KH 区段RNA结合区的结构, 发现RNA结合区的裂隙边缘具碱性侧链, 是极性、带电的. 他们认为, 碱性侧链为寡核苷酸的停靠提供了静电引力, 并与寡核苷酸具特异性的相互作用. 这与本研究结果一致. 与初始肽库相比, 苯丙氨酸的含量增加了 77%(图 3). 一般认为位于蛋白表面的芳香族残基能够通过与RNA的疏水作用, 来稳定蛋白与核酸的复合物 [13]. RBP 16 的RNP1 基元中发现了 2 个苯丙氨酸, 在RBP 16 与gRNAs的结合中具有重要作用 [14]. 筛选多肽中碱性氨基酸及芳香族氨基酸的含量增加, 必然在其与TS mRNA的结合中具有重要作用.

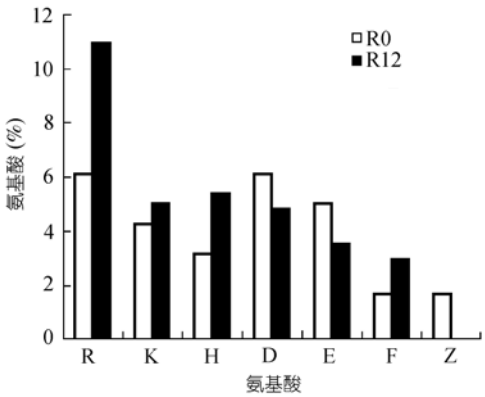

图 3　筛选多肽(R12)氨基酸组份与初始库(R0)的比较

Z 为终止密码子

对筛选多肽的氨基酸序列进行分析, 发现第 12 位的精氨酸占 53%, 18 位组氨酸占 30%, 在第 13 位很多序列都是甘氨酸(23%), 而位点 1, 7 和 15 分别有 20%的精氨酸、缬氨酸和丝氨酸(图 4).

20%	20%	53%	23%	20%	30%
R	V	R	G	S	H
1	7	12	13	15	18

图 4　筛选多肽中具 20%以上某种氨基酸的位点

为明确某一位点是否需要特定的氨基酸侧链, 我们根据理化特性将每一位点的氨基酸按极性氨基酸、非极性氨基酸、碱性氨基酸及酸性氨基酸进行分类, 并与初始库(R0, 14%碱性, 11%酸性, 38%非极性, 36%极性氨基酸)进行比较. 氨基酸在位点 1, 3, 7, 12, 13, 15, 17 和 18 的分布与初始库差别很大(图 5). 在这些位点, 1 种或 2 种氨基酸支配了某类氨基酸所占的比例, 说明这些位点需要特定的而不是普通的氨基酸侧链. 位点 3, 7 显示了非极性倾向(H>50%), 而 13, 15 则表现出极性趋势 (P>50%), 位点 1, 12, 17 和 18 具有明显的带正电荷的特点, 说明了碱性氨基酸在RNA-蛋白相互作用中的重要性.

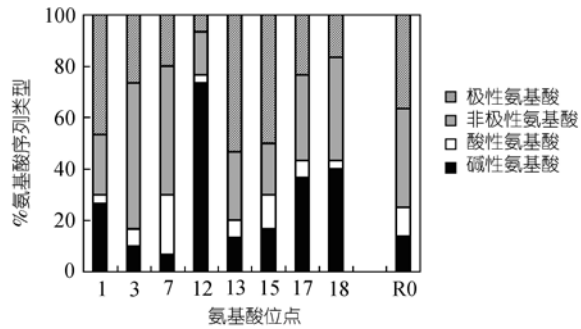

图 5　每一随机位点各类氨基酸所占比例

极性氨基酸(GNQSTCY), 非极性氨基酸(AVLIMFWP), 酸性氨基酸(DE), 碱性氨基酸(HRK). R0 为初始库的氨基酸分布

先前的研究表明蛋白质与核酸之间存在特异性与非特异性的相互作用. 前者为氨基酸侧链与核酸碱基功能基团之间的相互作用, 而非特异性的作用通常在核酸与氨基酸糖基及磷酸盐骨架间发生 [15]. 在我们的研究中, 虽然第 12 轮循环的筛选多肽具有一些特点, 但是并未找到特异性的序列, 可能在TS mRNA与多肽的相互作用中存在着非特异性的因素.

2.3 二级结构预测

为进一步研究筛选多肽的特性，利用PredictProtein蛋白质结构预测服务器对测得的多肽序列进行了二级结构预测. 与初始肽库相比，第 12 轮循环的筛选多肽具有明显的螺旋倾向，初始库中，只有 1/10 的序列具有螺旋结构(>50%的残基折叠形成螺旋)，第 12 轮时，这一数值上升到近 1/3，而且形成螺旋的区域富含碱性氨基酸(图 6)，可能是筛选多肽的结构特性影响着库的序列组成. RNA-蛋白相互作用中，β片层是特定RNA识别的主要结构 [16]，α-螺旋在RNA结合中的作用也有报道 [17]. 应进一步合成具α-螺旋结构的多肽，以确定对RNA结合至关重要的氨基酸残基及多肽-RNA的相互作用特点.

H C Y P L D E S I L R L V R G E L G A V H
Y W F A W A K S W Q L A K R E G H M G F D
N W S G F Y N L K L N T L K S V R Q V H Y
N W H H A L L S D I V S A L N K S S L W N
N C G T E M F C M D K I N E W R E V Y V D
N W S L I H K K Y L Q Q A K M K Y A R C H
D W T L M K V H V K Q C V R K L E S F T N
H C R F V R R V A G L M F R E R L E D D H
N W R L S H N A V L D D A R V Q Y G V H H

图 6 二级结构预测 12 轮循环的筛选多肽中具有明显α-螺旋结构(>50%残基折叠成螺旋)的肽链(21 个氨基酸残基的随机区)

下画线示形成螺旋的残基；斜体示碱性残基

2.4 体外筛选多肽与 TS mRNA 特异性结合

随机 DNA 库进行了 12 个循环的选择和扩增，将获得的融合多肽以 RNA 酶消化，降解融合肽上的 RNA. 凝胶迁移分析(图 7)发现，初始库的多肽与 TS mRNA 的结合检测不出，而第 8 轮和 12 轮筛选后获得的多肽与同位素标记的 TS mRNA 形成明显的多肽-RNA 复合物，而且随着筛选的进行，筛选多肽与 TS mRNA 的亲和力增加. 为确定 TS mRNA 与多肽结合的特异性，反应混合液中加入了高浓度的酵母 tRNA，结果表明，500 ng 酵母 tRNA 的存在不影响筛选多肽与 TS mRNA 的亲和.

2.5 筛选多肽对 TS mRNA 体外翻译的抑制作用

为明确筛选多肽的生物相关性，进行了体外翻译实验. 以 RNase A 消化 mRNA-蛋白质融合体，获得的 12 轮循环多肽加入全长 TS mRNA 翻译体系中. 如

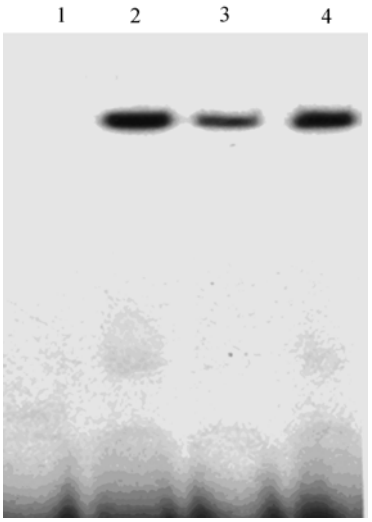

图 7 筛选多肽与 TS mRNA 体外结合

以全长 TS mRNA 作探针进行 EMSA 实验，样品与 TS mRNA 探针共孵育，以 4%非变性丙烯酰胺胶检测. 1: 初始肽; 2: 第 12 轮循环的筛选多肽; 3: 第 8 轮循环的筛选多肽; 4: 第 12 轮循环的筛选多肽+非特异性竞争剂酵母 tRNA (500 ng)

图 8 所示，筛选多肽可以抑制人 TS mRNA 的翻译，而且抑制效果具有剂量依赖性，100 ng 的筛选多肽几乎使 TS mRNA 的翻译受到完全抑制. 而相同剂量的 BSA 对 TS 翻译没有任何抑制效果. 结果表明筛选多肽对 TS mRNA 翻译具有特异性的抑制作用.

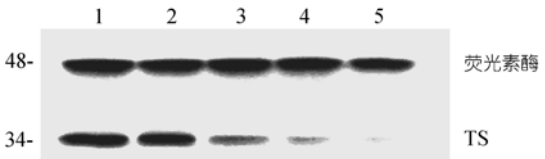

图 8 筛选多肽对 TS mRNA 的翻译抑制

翻译反应中含兔网织红细胞，与 TS mRNA (0.4 pmol) 共孵育. 1: 未加入肽; 2: 加入 BSA(0.1 μg); 3: 加入第 12 轮循环的筛选多肽 (10 ng); 4: 12 轮循环的筛选多肽(50 ng); 5: 12 轮循环的筛选多肽(100 ng). 荧光素酶 mRNA (0.4 pmol) 加入每个反应中共孵育，作为标准内参. 翻译反应 30℃孵育 60 min，蛋白产物以 SDS-PAGE 胶检测，放射自显影观察

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 [18]、限制肽库 [19]、抗体库 [20]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 [21]及作为v-abl激酶多肽底物的小分子药物 [22]的鉴定. 本文以mRNA体外展示技术进行了TS mRNA亲和肽的筛选研究，并完成了 12 个循环的选择扩增. 虽然筛选多肽的序列多样，但他们具有的一些特性与其他蛋白质的RNA结合区相类似. 而且选择循环之后的多肽能够与TS mRNA高

度亲和, 并能抑制TS mRNA翻译, 说明mRNA体外展示可作为功能肽筛选的有力工具.

鉴定与 TS mRNA 结合的多肽序列, 对了解 TS 蛋白质与 mRNA 的相互作用规律, 获得多肽类 TS RNA 抑制剂, 具有十分重要的意义. 此外这些分子基础研究可为人类肿瘤的临床治疗提供更加特异及有效的方法.

参　考　文　献

1 Carreras C, Santi D V. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. Annu Rev Biochem, 1995, 64: 721—762[DOI]

2 Chu E, Callender M A, Farrell M P, et al. Thymidylate synthase inhibitors as anticancer agents: from bench to bedside. Cancer Chemother Pharmacol, 2003, 52(S1): 80—89[DOI]

3 阎 松, 牛荣丽, Chu Edward, 等. 胸苷酸合成酶表达调控的分子机制. 细胞生物学杂志, 2005, 27: 105—108

4 Chu E, Koeller D M, Casey J L, et al. Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(20): 8977—8981[DOI]

5 Lin X, Parsels L A, Voller D M, et al. Characterization of a *cis*-acting regulatory element in the protein coding region of thymidylate synthase mRNA. Nucleic Acids Res, 2000, 28: 1381—1389[DOI]

6 Schmitz J C, Liu J, Lin X, et al. Translational regulation as a novel mechanism for the development of cellular drug resistance. Cancer Metastasis Rev, 2001, 20(1-2): 33—41[DOI]

7 Takahashi T T, Austin R J, Roberts R W. mRNA display: Ligand discovery, interaction analysis and beyond. Treads Biochem Sci, 2003, 28(3): 159—165[DOI]

8 阎 松, 牛荣丽, 张培军, 等. 运用 mRNA 体外展示技术筛选胸苷酸合成酶 RNA 亲和肽. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(11): 1081—1087

9 Chu E, Voeller D, Koeller D M, et al. Identification of an RNA binding site for human thymidylate synthase. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(2): 517—521 [DOI]

10 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[DOI]

11 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[DOI]

12 Sidiqi M, Wilce J A, Vivian J P, et al. Structure and RNA binding of the third KH domain of poly(C)-binding protein 1. Nucleic Acids Res, 2005, 33(4): 1213—1221 [DOI]

13 Burd C G, Dreyfuss G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. Science, 1994, 265: 615—621[DOI]

14 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[DOI]

15 Draper D E. Protein-RNA recognition. Annu Rev Biochem, 1995, 64: 593—620[DOI]

16 Kenan D J, Query C C, Keene J D. RNA recognition: Towards identifying determinants of specificity. Trends Biochem Sci, 1991, 16(6): 214—220[DOI]

17 Marcos J F, Vilar M, Perez-Paya E, et al. *In vivo* detection, RNA-binding properties and characterization of the RNA-binding domain of the p7 putative movement protein from carnation mottle carmovirus (CarMV). Virology, 1999, 255(2): 354—365[DOI]

18 Barrick J E, Roberts R W. Sequence analysis of an artificial family of RNA-binding peptides. Protein Sci, 2002, 11(11): 2688—2696[DOI]

19 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[DOI]

20 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[DOI]

21 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[DOI]

22 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[DOI]