

復旦大學

本科毕业论文



论文题目：基于点击化学策略的 VPg 蛋白与 mRNA 连接方法的研究

姓名：吕熙 学号：20300700004

院系：生命科学学院

专业：生物科学（强基计划）

指导教师：林金钟 职称：教授

单位：复旦大学生命科学学院

完成日期：2024 年 5 月 13 日

基于点击化学策略的 VPg 蛋白与 mRNA 连接方法的研究

完成人

吕熙

指导小组成员

林金钟 教授

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
一、 前 言.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 立题依据.....	3
1.3 主要研究内容.....	3
二、 材料与amp;方法.....	5
2.1 实验材料.....	5
2.1.1 载体和宿主菌.....	5
2.1.2 实验所用序列.....	5
2.2 实验试剂.....	6
2.3 主要实验仪器.....	7
2.4 主要实验耗材.....	8
2.5 主要试剂配置方法.....	9
2.6 实验方法.....	13
三、 研究结果.....	17
3.1 ULP1 蛋白酶的原核表达与纯化.....	17
3.2 mjTyrRS 的原核表达与纯化.....	18
3.3 mjTyrRS 的活性检测.....	20
四、 讨 论.....	22
参考文献.....	24
致 谢.....	26

摘要

蛋白质的翻译过程是生物体内最重要的生命活动之一，蛋白质翻译的调控机制一直以来是研究的热点。翻译起始是翻译过程的重要一环，翻译起始的具体机制在不同生物中不尽相同。VPg 是一种非帽依赖的翻译起始元件，全称为 Virus protein genome linked，是一段连接在部分病毒 RNA 5'末端的非结构蛋白。它具有包括起始翻译在内的多种功能，具有较高的研究价值。但目前的研究主要关注于 VPg 本身，对于 VPg-RNA 整体的研究较少，这可能是由于没有一种合适的连接方法来实现两者间的连接。

本研究将初步探索使用点击化学策略实现 VPg 与 RNA 间的准确连接的可能性。根据点击化学的基本特点，我们需要将叠氮基或炔基分别引入 VPg 或 RNA 中。本研究将使用一对改造后的氨酰 tRNA 合成酶和 tRNA 对，使得终止密码子 TAG 变为编码带有叠氮基的酪氨酸的密码子。再结合针对 VPg 序列的改造，即可实现在 VPg 特定位点引入叠氮基团。

本研究成功实现了关键酶 mjTyrRS 的表达与纯化，并检验了其活性，为后续将非天然氨基酸引入 VPg，进而实现利用点击化学策略实现 VPg-RNA 准确连接做好了铺垫，也为未来针对 VPg-RNA 整体的研究打下了基础。

关键词：翻译起始，点击化学，VPg，氨酰 tRNA 合成酶，非天然氨基酸

Abstract

Protein translation is one of the most important activities in organisms, and the regulatory mechanism of protein translation has always been a hot research topic. Translation initiation is an important part of protein translation, and the specific mechanism of translation initiation varies in different organisms. VPg is a non-cap-dependent translation initiation element, which is called Virus protein genome linked, and it is a piece of non-structural protein attached to the 5' end of some viral RNA. It has a variety of functions including initiation of translation and is of high research value. However, current studies have mainly focused on VPg itself, and there are fewer studies on VPg-RNA as a whole, which may be due to the lack of a suitable linkage method to realize the connection between the two.

In this study, we will preliminarily explore the possibility of using click chemistry strategies to realize accurate ligation between VPg and RNA. According to the basic features of click chemistry, we need to introduce azide or alkyne groups into VPg or RNA, respectively. In this study, we will use a pair of modified aminoacyl tRNA synthetase and tRNA pairs, so that the termination codon TAG is changed into a codon encoding a tyrosine with an azide group. Combined with modifications targeting the VPg sequence, the introduction of an azido group at a VPg-specific site can be achieved. In this study, the expression and purification of the key enzyme mjTyrRS were successfully achieved and its activity was examined, which paved the way for the subsequent introduction of non-natural amino acids into VPg, and thus the realization of the accurate ligation of VPg-RNAs using the click chemistry strategy, as well as laying the foundation for future research on VPg-RNAs as a whole.

Keywords: Translation initiation, Click chemistry, VPg, Aminoacyl tRNA synthetase, Unnatural amino acids

一、前言

1.1 研究背景

生命活动的正常进行离不开细胞，不计其数的生化反应复杂而又精巧地共同容纳于这小小的细胞中。蛋白质翻译过程当属其中最为重要的生化反应之一，它将遗传信息从 RNA 传递至蛋白质，使得细胞通过蛋白质得以实现大多数生命活动所需的功能。经典的蛋白质翻译过程包括起始、延伸、终止和核糖体循环等关键步骤，而翻译起始（translation initiation）无疑在其中发挥着至关重要的作用。一般而言，翻译起始过程主要包括形成起始复合物和识别起始密码子这两大事件^[1]。典型的真核翻译起始过程始于一个三元复合物（ternary complex, TC）的形成，包含真核起始因子 2（eukaryotic initiation factor 2, eIF2）、携带甲硫氨酸的 tRNA 和 GTP^[2]。之后，TC 在其他因子的帮助下与 40S 核糖体亚基结合，形成 43S 预起始复合物（pre-initiation complex, PIC）^[3]。在帽识别蛋白 eIF4E 等因子的作用下，PIC 募集于 5'端的 m⁷G 帽结构上，形成 mRNA-43S 复合物^[4]，从而使得 43S PIC 得以沿着 mRNA 寻找起始密码子，进而开启转录^[5]。2020 年，Venki 等人解析了人 48S 翻译起始复合物的结构。48S 翻译起始复合物即上述 RNA 5'末端帽子复合物招募 43S 起始复合物后形成的复合物^[6]。他们的工作进一步揭示了帽依赖（cap-dependent）翻译起始过程的具体细节，有利于人们更加全面地理解翻译起始过程。

除了上述的帽依赖起始过程，在一些细胞和病毒中也存在非帽依赖（cap-independent）翻译起始过程。内部核糖体进入位点（IRES）是一个典型的非帽依赖的翻译起始元件。IRES 是位于 RNA 内部的一段序列，其结构和大小多种多样。IRES 既不需要 RNA 5'末端帽子也不需要游离的 RNA 5'末端来将核糖体募集到 mRNA 上，而可以凭借自身从 RNA 内部募集核糖体^[7]。除此之外，IRES 对于起始因子的需求也不一致，例如在 *Dicistroviridae* 中，其 IRES 不需要任何起始因子^[8]，而在甲型肝炎病毒中，其 IRES 则需要经典翻译起始所需的全部因子才能完成翻译起始^[9]。除了 IRES 外，还有非帽依赖的翻译元件（Cap independent translation elements, CITEs）、m6A 修饰和核糖体分流等非经典的翻译起始过程^[7]。

理解这些非经典的翻译起始过程将有利于人们理解癌症、早期发育和细胞应激条件下的基因表达过程。

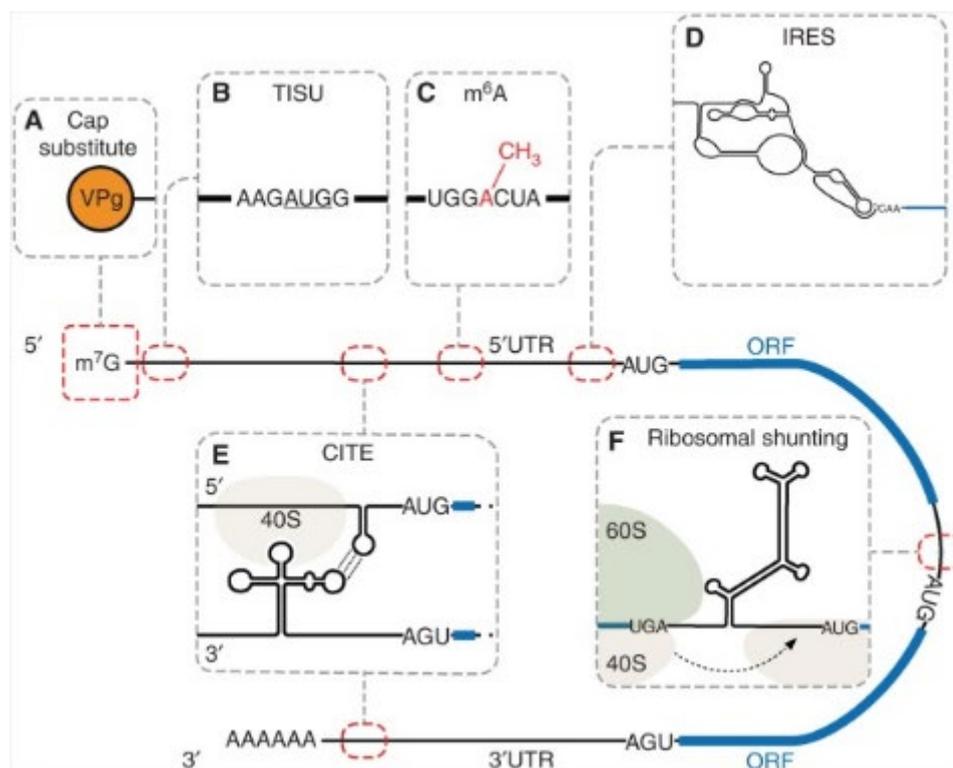


图 1-1-1. 几种非帽依赖的翻译起始机制^[7]

VPg 同样是一种非帽依赖的翻译起始元件, 全称为 Virus protein genome linked, 是一段连接在 RNA 5'末端的非结构蛋白。这一蛋白多出现在正义 RNA 病毒中, 如 *Secoviridae* 和 *Potyviridae* 家族中的病毒^[10]。此外, 不同病毒中的 VPg 的大小具有显著差异, 从 2 kDa 至 24 kDa 不等, 它们还具有较高的异源性^[11], 这使得 VPg 在不同病毒中的作用产生了差异。VPg 可以与 RNA 聚合酶等相互结合, 在病毒基因组的复制中发挥作用; VPg 可以与蛋白的部分结构蛋白发生相互作用, 从而影响病毒的组装与成熟过程^[12]; VPg 可以发挥类似 RNA 5'端帽子的作用, 通过与 eIF4E 结合并招募其他细胞因子, 进而形成翻译起始复合物, 起始翻译过程^[13], 例如杯状病毒的 VPg 可以起到替代帽子的作用, 在病毒蛋白翻译中起着至关重要的作用^[14]。值得注意的是, VPg 会与 IRES 同时出现在病毒的基因组中, 例如, 小核糖核酸病毒使用病毒基因组 5' UTR 内的 IRES 而不是 VPg 来启动病毒蛋白翻译^[15]。

VPg 以共价方式连接在病毒 RNA 上, 在小核糖核酸病毒中, 病毒通过 RNA 复制酶将两个尿苷酸连接在 VPg 的第三个酪氨酸残基的羟基上^[16], 这种连接方

式在体外较难精准复现。在 2019 年 Katherine 等人的研究中，他们利用 GMPS 使 RNA 5'末端产生吡啶基二硫键，再利用二硫键交换化学反应将 VPg 上唯一半胱氨酸的硫醇基团与 RNA 上 5'末端的吡啶基二硫键进行连接，进而实现 VPg 与 RNA 的偶联^[17]。但这种方式对于序列的要求较高，需要对 VPg 的序列进行筛选，且连接效率相对不高。因此，找到一种更加通用且精确的连接方式将有利于针对 VPg-RNA 复合物的研究的开展。

1.2 立题依据

点击化学是由美国诺贝尔化学奖获得者 K. Barry Sharpless 提出的一类反应。由于其优良特性，其已被用在药物开发和生物医用材料等的诸多领域中^[18]。叠氮-炔环加成是点击化学中的重要门类，它通过叠氮基团与炔基间的反应将两个分子共价连接起来，对其他基团无明显影响。如果能将 VPg 与 RNA 之间的连接替换为叠氮-炔环加成所形成的共价键，这将大幅提升连接反应发生的可控性。另外，通过控制相应基团插入 VPg 中的位点，更可以提升连接位点的精确性。

就目前而言，已有商业化合成的 4-叠氮基-L-苯丙氨酸与 γ -[(炔丙基)-亚氨基]-ATP 钠盐可供使用。对于如何将非天然氨基酸引入蛋白质，也有学者对此进行了尝试，并给出了相应的方案^[19]。通过改造氨酰 tRNA 合成酶和 tRNA，可以将原本属于终止密码子的 TAG 转换为一个可用于编码非天然氨基酸的密码子。这使得本研究的开展具备较高的可行性。

1.3 主要研究内容

首先需要借助原核表达系统获取相应的突变氨酰 tRNA 合成酶-mjTyrRS，由于设计的序列中，目的蛋白的 N 端带有 SUMO 标签，因此首先还需进行工具酶 ULP1 的原核表达与纯化，然后进行 mjTyrRS 的原核表达、纯化及标签去除。之后，根据 Howard 等人所给出的方法，对获得 mjTyrRS 进行活性检测，从而初步地探索研究方案的可行性^[20]。

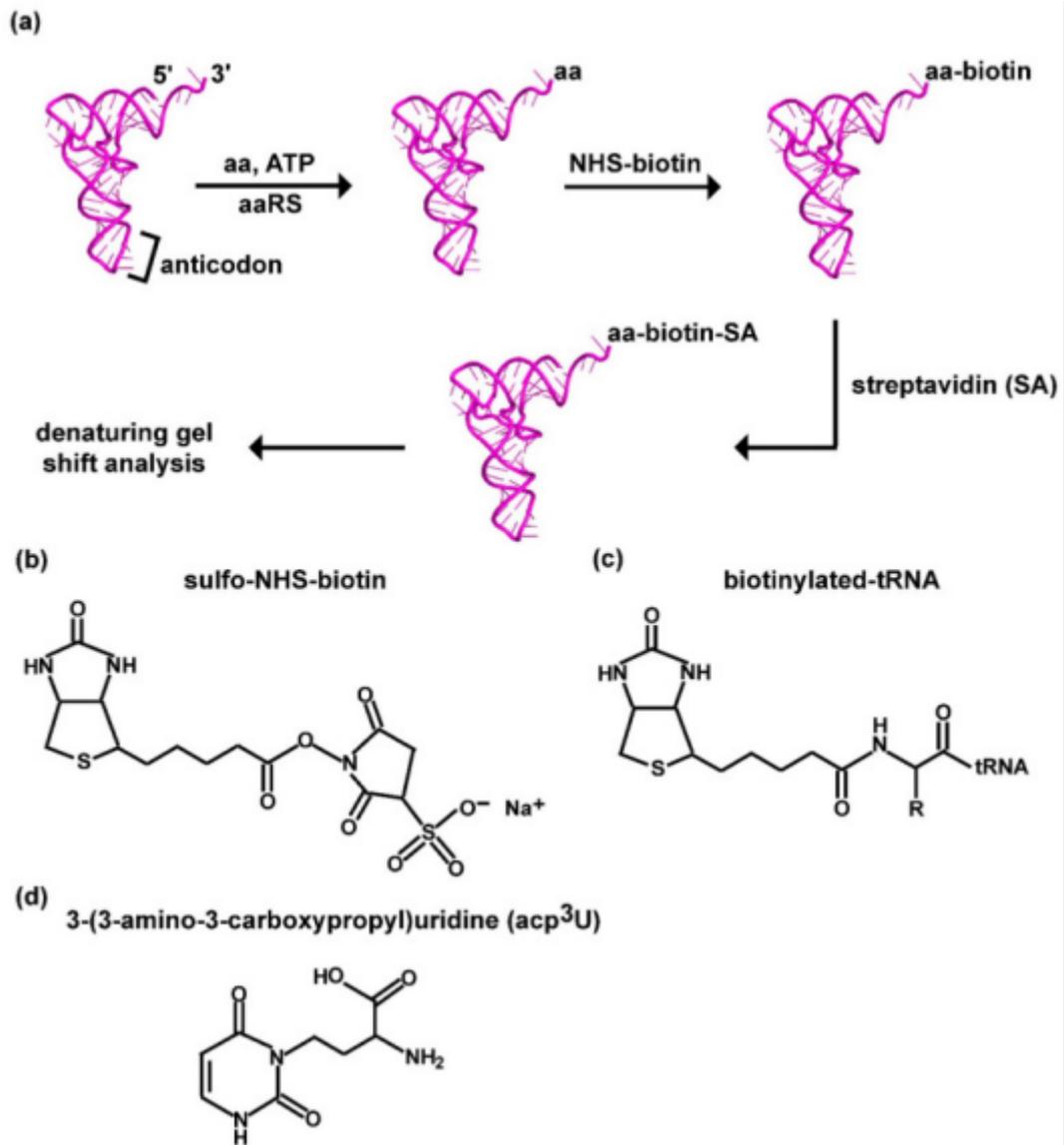


图 1-3-1. 一种基于生物素-SA 偶联的 tRNA 氨酰化的无标记检测方法^[20]

二、材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 载体和宿主菌

(1) 载体主要有 pET28a, 内含 ULP1 序列, 具有 Kan 抗性, 由实验室成员提供; pLin1k, 内含 mjTyrRS 序列, 由 pBR322 改造而来, 具有 Amp 抗性, 由实验室成员提供。

(2) 所用宿主菌主要有 DH5 α 感受态细胞, 购买于唯地生物; BL21(DE3)star 感受态细胞, 由实验室成员制备提供。

2.1.2 实验所用序列

(1) tRNA-Tyr- CUA :

5'-CCGGCGGTAGTTCAGCAGGGCAGAACGGCGGACTCTAAATCCGCAT
GGCGCTGGTTCAAATCCGGCCCCGGACCA-3'

(2) mjTyrRS:

5'-ATGGACGAGTTCGAAATGATTAAACGCAACACCAGCGAAATTATCTC
TGAAGAAGAGCTGCGCGAGGTGCTGAAGAAAGACGAGAAGAGCGCGACT
ATTGGCTTTGAGCCGTCCGGTAAAATTCACCTGGGTCACTACCTGCAAATC
AAGAAGATGATTGATCTGCAAAACGCTGGTTTTGACATCATTATCCTGCTGG
CGGACCTGCACGCCTACCTGAATCAAAGGGCGAGCTGGATGAGATTTCGC
AAGATCGGCGACTACAATAAGAAAGTCTTCGAAGCCATGGGTTTGAAGGC
TAAATACGTCTACGGTAGCAATTTTCAGCTGGATAAGGATTACACGTTGAAT
GTGTACCGTCTGGCGCTGAAAACCACGCTGAAACGCGCCCGTCGTTCCATG
GAGCTGATTGCGCGCGAGGATGAGAATCCAAAAGTTGCTGAGGTTATTTAC
CCTATTATGCAAGTTAATCCGTTGCACTACCAGGGTGTTGATGTTGCCGTCG
GTGGTATGGAGCAACGCAAATTCACATGCTGGCACGTGAACTGCTGCCG
AAAAAGGTTGTCTGTATTCATAATCCGGTCCTGACCGGCCTGGATGGCGAG
GGTAAAATGAGCAGCAGCAAGGGTAACTTTATTGCAGTTGACGATAGCCCG
GAAGAAATCCGTGCGAAGATCAAGAAAGCGTACTGCCCGGCAGGCGTGGT
TGAGGGTAACCCGATCATGGAAATCGCCAAGTATTTTCTGGAATACCCACT
GACGATTAAGCGCCCGGAGAAATTTGGCGGCGACCTGACCGTCAACAGCT

ACGAGGAGCTGGAAAGCTTGTTTAAGAACAAAGAACTGCATCCGATGCGC
 CTGAAAAACGCCGTGGCGGAAGAGCTGATTAAGATTCTGGAACCAATTCG
 CAAACGTCTGTAA-3'

2.2 实验试剂

表 2-2 主要实验所用试剂

试剂名称	来源
NaCl	SIGMA
MgCl ₂	SIGMA
NH ₄ OAc	SIGMA
NaOAc	SIGMA
HEPES	SIGMA
尿素	SIGMA
硼酸	SIGMA
TEMED	SIGMA
β-Me	SIGMA
SDS	BBI
甘氨酸	BBI
KCl	BBI
IPTG	BBI
Tris	BBI
DTT	BBI
DEPC	BBI
溴酚蓝	BBI
BSA	BBI
EDTA-2Na · 2H ₂ O	BBI
氨苄青霉素	BBI
APS	国药集团化学试剂有限公司
浓盐酸	国药集团化学试剂有限公司
KOH	国药集团化学试剂有限公司
NaOH	国药集团化学试剂有限公司
冰醋酸	国药集团化学试剂有限公司
咪唑	生工

卡那霉素	生工
甘油	生工
Acryl/Bis 40% Solution (19:1)	生工
Acryl/Bis 40% Solution (29:1)	生工
2, 2, 2-三氯乙醇	阿拉丁
无水乙醇	Macklin
N ₃ -Tyrosine	Macklin
二甲苯青 FF	Solarbio
sulfo-NHS-biotin	APExBIO
Streptavidin	APExBIO
6x DNA 上样缓冲液	APExBIO
2x 蛋白上样缓冲液	APExBIO
2x RNA 上样缓冲液	APExBIO
Gel-Red 核酸染料	碧云天
T7 体外转录试剂盒	NEB
LB 预混粉末	BD
质粒小提试剂盒	Tiagen

2.3 主要实验仪器

表 2-3 主要实验仪器

仪器名称	规格	来源
移液器	1 mL/200 μ L/20 μ L/2.5 μ L	Eppendorf
离心机	Centrifuge 5430R	Eppendorf
离心机	Centrifuge 5810R	Eppendorf
离心机	Centrifuge 5424	Eppendorf
PCR 仪	Mastercycler [®] nexus	Eppendorf
摇床	zqwy-200s	知楚仪器
摇床	zqzy-cs8	知楚仪器
高速落地离心机	Sorvall lynx 6000 centrifuge	Thermo
分光光度计	NanoDrop [™] One	Thermo
4 $^{\circ}$ C 医用冷藏箱	HYC-118	海尔
-20 $^{\circ}$ C 低温保存箱	DW-25L262	海尔
-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱	DW-86L828J	海尔

-80℃ 超低温冰箱	DW-86W420J	海尔
生化培养箱	Incubator IN110	Memmert
水平电泳槽	HE-120	Tanon
迷你离心机	Corning MicroCentrifuge	Corning
涡旋混合器	Corning Vortex	Corning
水浴锅	LSE water Bath 6L	Corning
磁力搅拌器	6798-410D	Corning
数显干浴加热器	6876-SB	Corning
低速轨道式摇床	6781-FP	Corning
蛋白纯化系统	ÄKTA Pure 25M	GE Healthcare
Ni 亲和层析柱	HisTrap 5 mL	GE Healthcare
凝胶过滤层析柱	HiLoad™16/600 Superdex 75pg	GE Healthcare
层析柜	MPR-1411-PC	Panasonic
高压灭菌锅	MLS-3781L-PC	Panasonic
pH 计	FE-28	Mettler Toledo
电子天平	SQP	Sartorius
超纯水仪	i-Pure Pro2	NeoLab
精密蠕动泵	BT100-2J	Longer
高压细胞破碎仪	UH-06	永联生物
便携式负压机	801A	JIAD
ChemiDoc™ 成像系统	ChemiDoc™ Touch ImagingSystem	Bio-Red
梯度胶生成仪	485 型	Bio-Red
电泳仪电源	PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Red

2.4 主要实验耗材

表 2-4 主要实验耗材

耗材名称	来源
1.5 mL EP 管	Axygen
200 µL PCR 管	Axygen
20 µL/200 µL/1000 µL 枪头	Axygen

15 mL/50 mL 离心管	Corning
10 kDa 超滤离心管	Millipore
0.22 μ M 注射器滤头	Millipore
0.22 μ M 滤膜	Durapore
手套	施睿康
10 mL/50 mL 移液管	Sorfa
铝箔	克林莱
口罩	Medicom
注射器	KDL

2.5 主要试剂配置方法

(1) LB 液体培养基和 LB 固体培养基

准确称取 25.0 g LB 预混粉末 (包含 10.0 g 胰蛋白胨、5.0 g 酵母提取物和 10.0 g 氯化钠) 于锥形瓶中, 加入 1 L 去离子水后混匀并封口, 使用高压灭菌锅于 121°C 灭菌 20 min 后, 冷却, 即得到无抗性的 LB 液体培养基。

准确称取 2.5 g LB 预混粉末和 1.5 g 的琼脂粉于锥形瓶中, 加入 100 mL 去离子水后混匀并封口, 使用高压灭菌锅于 121°C 灭菌 20 min 后, 冷却, 即得到无抗性的 LB 固体培养基。使用前将 LB 固体培养基置于微波炉中加热融化, 以 1:1000 的比例加入对应的抗生素, 分装至培养皿中, 冷却凝固后即得到对应抗性的培养平板。

(2) 50 mg/mL 卡那霉素溶液和 100 mg/mL 氨苄青霉素溶液

准确称取 0.5 g 的卡那霉素, 加入 ddH₂O 定容至 10 mL, 使用 0.22 μ M 注射器滤头进行过滤, 即得到 50 mg/mL 卡那霉素溶液, 分装并保存于 -20°C, 使用时以 1:1000 的比例加入。

对于 100 mg/mL 氨苄青霉素溶液, 准确称取 1.0 g 的氨苄青霉素后, 其余步骤与上述卡那霉素溶液的配置一致。

(3) 1 M IPTG 溶液

准确称取 2.38 g IPTG 固体, 加入 ddH₂O 定容至 10 mL, 使用 0.22 μ M 注射器滤头进行过滤, 即得到 1 M IPTG 溶液, 分装并保存于 -20°C。

(4) 1 M Tris-Cl 溶液, pH 7.5

准确称取 121.1 g Tris 固体，加入 800 mL ddH₂O 溶解，在 pH 计的辅助下，使用盐酸调节溶液 pH 至 7.5，过程中注意保持溶液温度相对稳定，最后加入 ddH₂O 定容至 1 L，使用 0.22 μM 滤膜进行过滤，即得到所需溶液。

(5) 1 M Tris-Cl 溶液，pH 8.0

准确称取 121.1 g Tris 固体，加入 800 mL ddH₂O 溶解，在 pH 计的辅助下，使用盐酸调节溶液 pH 至 8.0，过程中注意保持溶液温度相对稳定，最后加入 ddH₂O 定容至 1 L，使用 0.22 μM 滤膜进行过滤，即得到所需溶液。

(6) 4 M NaCl 溶液

准确称取 233.8 g NaCl 固体，加入 ddH₂O 定容至 1 L，使用 0.22 μM 滤膜进行过滤，即得到 4 M NaCl 溶液。

(7) 4 M 咪唑溶液

准确称取 272.3 g 咪唑固体，加入 ddH₂O 定容至 1 L，使用 0.22 μM 滤膜进行过滤，即得到 4 M 咪唑溶液。

(8) 1 M DTT 溶液

准确称取 1.55 g DTT 固体，加入 ddH₂O 定容至 10 mL，使用 0.22 μM 注射器滤头进行过滤，即得到 1 M DTT 溶液，分装并保存于-20°C。

(9) 0.5 M HEPES-KOH 溶液，pH 7.8

准确称取 119.2 g HEPES 固体，加入 800 mL ddH₂O 溶解，在 pH 计的辅助下，使用 KOH 溶液调节溶液 pH 至 7.8，过程中注意保持溶液温度相对稳定，最后加入 ddH₂O 定容至 1 L，使用 0.22 μM 滤膜进行过滤，即得到所需溶液。

(10) 3 M KCl 溶液

准确称取 223.7 g KCl 固体，加入 ddH₂O 定容至 1 L，使用 0.22 μM 滤膜进行过滤，即得到 3 M KCl 溶液。

(11) 1 M MgCl₂ 溶液

准确称取 95.2 g MgCl₂ 固体，加入 ddH₂O 定容至 1 L，使用 0.22 μM 滤膜进行过滤，即得到 1 M MgCl₂ 溶液。

(12) 5 M NH₄OAc 溶液

准确称取 19.3 g NH₄OAc 固体，加入 ddH₂O 定容至 50 mL，使用 0.22 μM 注射器滤头进行过滤，即得到 5 M NH₄OAc 溶液，分装并保存于-20°C。

(13) 3 M NaOAc 溶液, pH 5.2

准确称取 12.3 g NaOAc 固体, 加入适量 ddH₂O 溶解, 在 pH 计的辅助下, 使用冰醋酸调节溶液 pH 至 5.2, 过程中注意保持溶液温度相对稳定, 最后加入 ddH₂O 定容至 50 mL, 使用 0.22 μM 注射器滤头进行过滤, 即得到所需溶液, 分装并保存于 -20°C。

(14) 0.5 M EDTA 溶液, pH 8.0

准确称取 186.1 g EDTA-2Na • 2H₂O 固体, 加入 800 mL ddH₂O 溶解, 在 pH 计的辅助下, 使用 NaOH 调节溶液 pH 至 8.0, 过程中注意保持溶液温度相对稳定, 最后加入 ddH₂O 定容至 1 L, 使用 0.22 μM 滤膜进行过滤, 即得到所需溶液。

(15) DEPC 水

准确量取 1 L ddH₂O, 置于带盖玻璃瓶中, 加入 1 mL DEPC, 磁力搅拌过夜, 旋松瓶盖半圈, 使用高压灭菌锅于 121°C 灭菌 20 min 后, 冷却, 封口保存, 即得到 DEPC 水。

(16) 50x TAE

准确称取 242.2 g Tris 固体和 37.2 g EDTA-2Na • 2H₂O 固体, 加入适量 ddH₂O 溶解, 加入 57.1 mL 冰醋酸, 充分搅拌, 最后加入 ddH₂O 定容至 1 L, 使用 0.22 μM 滤膜进行过滤, 即得到 50x TAE, 使用时可加入 ddH₂O 稀释至 1x。

(17) 5x TBE

准确称取 54 g Tris 固体和 27.5 g 硼酸固体, 加入适量 ddH₂O 溶解, 加入 20 mL 0.5 M EDTA 溶液, pH 8.0, 充分搅拌, 最后加入 ddH₂O 定容至 1 L, 使用 0.22 μM 滤膜进行过滤, 即得到 5x TBE, 使用时可加入 ddH₂O 稀释至 1x 或 0.5x。

(18) 5x SDS-PAGE 电泳缓冲液

准确称取 15.1 g Tris 固体、94 g 甘氨酸和 5 g SDS 固体, 加入适量 ddH₂O 溶解充分搅拌, 最后加入 ddH₂O 定容至 1 L, 使用 0.22 μM 滤膜进行过滤, 即得到 5x SDS-PAGE 电泳缓冲液, 使用时可加入 ddH₂O 稀释至 1x。

(19) His Buffer A 和 His Buffer B

按照下表配置 His Buffer A 及 His Buffer B, 使用 0.22 μM 滤膜进行过滤, 即得到所需溶液, 可用于 Ni 亲和层析柱。

表 2-5-1 His buffer A 的配方

组成成分	Final Conc	Stock Conc	Volume
Tris-Cl, pH 7.5	50 mM	1 M	50 mL
NaCl	500 mM	4 M	125 mL
咪唑	20 mM	4 M	5 mL
ddH ₂ O		定容至 1 L	

表 2-5-2 His buffer B 的配方

组成成分	Final Conc	Stock Conc	Volume
Tris-Cl, pH 7.5	50 mM	1 M	25 mL
NaCl	500 mM	4 M	62.5 mL
咪唑	500 mM	4 M	62.5 mL
ddH ₂ O		定容至 500 mL	

(20) GF Buffer for ULP1

按照下表配置 GF Buffer for ULP1, 使用 0.22 μM 滤膜进行过滤, 即得到所需溶液, 可用于凝胶过滤层析柱。

表 2-5-3 GF Buffer for ULP1 的配方

组成成分	Final Conc	Stock Conc	Volume
Tris-Cl, pH 8.0	20 mM	1 M	20 mL
NaCl	200 mM	4 M	50 mL
甘油	10%	-	100 mL
ddH ₂ O		定容至 1 L	
β-Me		使用前加入终浓度为 2 mM 的 β-Me	

(21) GF Buffer for mjTyrRS

按照下表配置 GF Buffer for mjTyrRS, 使用 0.22 μM 滤膜进行过滤, 即得到所需溶液, 可用于凝胶过滤层析柱。

表 2-5-4 GF Buffer for mjTyrRS 的配方

组成成分	Final Conc	Stock Conc	Volume
HEPES-KOH, pH 7.8	50 mM	0.5 M	100 mL
KCl	100 mM	3 M	33.3 mL

MgCl ₂	10 mM	1 M	10 mL
ddH ₂ O		定容至 1 L	
β-Me		使用前加入终浓度为 2 mM 的 β-Me	

2.6 实验方法

(1) DNA 琼脂糖凝胶电泳

称取 0.5 g 琼脂糖于锥形瓶中，加入 50 mL 1x TAE，使用微波炉进行加热溶解。琼脂糖完全溶解后，取出锥形瓶，稍稍冷却，加入 5 μL Gel-Red 核酸染料，摇晃混匀，倒入制胶模具，插上梳齿，待其完全凝固即得到 1%的琼脂糖凝胶。

向 DNA 样品中加入 1/5 体积的 6x DNA 上样缓冲液，混匀后上于胶孔中，根据需要设置电压和时间。

(2) T7 体外转录

按照下表进行反应体系的配置，将体系于 37°C 孵育 3 h，加入 1 μL DNase I 消化 30 min，后续使用 Urea-PAGE 进行检测。

表 2-6-1 T7 体外转录的配方

组成成分	Final Conc	Stock Conc	Volume
Transcription Buffer	1x	10x	2 μL
NTPs Mix	7.5 mM	25 mM	6 μL
T7 mix	1x	10x	2 μL
DNA Template	10%	-	2 μL
DEPC 水		补齐至 20 μL	

(3) RNA 的乙醇沉淀

对于盐浓度较低的 RNA 溶液，可以加入 1/9 体积的 5 M NH₄OAc 溶液或 3 M NaOAc 溶液，pH 5.2，以促进沉淀的产生。加入 3 倍体积的预冷的无水乙醇，充分混匀后，于 -20°C 保存过夜。

将体系于 12000 rpm 4°C 离心 10 min，弃去上清，加入 0.5 mL 预冷的 70% 乙醇洗涤，12000 rpm 4°C 离心 10 min，弃去上清，加入适量 DEPC 水溶解沉淀。

(4) 质粒 DNA 的转化

向准备好的 DH5α 感受态细胞中加入 1 μL 的质粒 DNA，轻弹混匀后，于冰上静置 30 min。在 42°C 条件下，热激细胞 45 s，迅速将细胞放回冰上。向管内加

入 700 μL 的无抗性 LB 液体培养基，于 37°C 220 rpm 的摇床内孵育 45 min。将细胞于 12000 rpm 离心 1 min，弃去 700 μL 上清后，重悬细胞，涂布在相应抗性的平板上。

(5) 质粒 DNA 的提取

利用天根公司的质粒小提试剂盒进行质粒提取：使用 500 μL 的平衡液 BL 平衡吸附柱，12000 rpm 离心 1 min。取 3 mL 菌液于干净的离心管中，12000 rpm 离心 1 min，弃去上清。向沉淀中加入 250 μL P1 溶液，吹打混匀沉淀。向管中加入 250 μL P2 溶液，温和地上下颠倒 8 次进行混匀。向管中加入 350 μL P3 溶液，温和地上下颠倒 8 次进行混匀，12000 rpm 离心 10 min。将上清转移至吸附柱中，12000 rpm 离心 1 min，弃去液体。向吸附柱中加入 600 μL PW 漂洗液，12000 rpm 离心 1 min，弃去液体，重复此步骤一次。12000 rpm 离心 2 min，开盖室温放置 5 min，使乙醇挥发。将吸附柱放置于干净的离心管内，向柱中心加入 80 μL ddH₂O，室温静置 2 min，12000 rpm 离心 1 min，获得质粒溶液。

(6) 尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Urea-PAGE)

量取 4.5 mL Acryl/Bis 40% Solution (19:1)和 3 mL 5x TBE，并称取 7.2 g 尿素于 50 mL 离心管中，加入 ddH₂O 补齐至 15 mL，使用微波炉微热体系，使尿素完全溶解。使用 0.22 μM 注射器滤头进行过滤，加入 75 μL 10% APS 和 7.5 μL TEMED，迅速将溶液注入制胶夹板中，插上梳齿，待其完全凝固即得到 12% 的尿素-聚丙烯酰胺凝胶，上样前需预电泳 30 min。

向 RNA 样品中加入等体积的 2x RNA 上样缓冲液，混匀后于 95°C 热变性 3 min，冰上冷却。使用注射器吹去胶孔中析出的尿素，即可将样品上于胶孔中，根据需要设置电压和时间。电泳完成后，将凝胶置于 Gel-Red 染液中进行染色，完成后即可使用照胶仪进行观察。

(7) 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

按照下表配置 4% 和 20% 的 SDS-PAGE 凝胶溶液，使用梯度胶制胶器批量配置 4-20% 的 SDS-PAGE 梯度胶。向蛋白样品中加入等体积的 2x 蛋白上样缓冲液，混匀后上于胶孔中，根据需要设置电压和时间。电泳完成后将凝胶置于考马斯亮蓝染液中进行染色，并用去离子水进行脱色，完成后即可进行观察。

表 2-6-2 4% SDS-PAGE 凝胶溶液的配方

组成成分	Final Conc	Stock Conc	Volume
Acryl/Bis Solution (19:1)	4%	30%	9.6 mL
Tris-Cl, pH 8.8	375 mM	1.5 M	18 mL
2, 2, 2-三氯乙醇	0.5%(V/V)	-	0.36 mL
ddH ₂ O	定容至 72 mL		
制胶前加入			
APS	0.05%(W/V)	10%(W/V)	0.36 mL
TEMED	0.05%(W/V)	-	0.036 mL

表 2-6-3 20% SDS-PAGE 凝胶溶液的配方

组成成分	Final Conc	Stock Conc	Volume
Acryl/Bis Solution (19:1)	20%	30%	48 mL
Tris-Cl, pH 8.8	375 mM	1.5 M	18 mL
2, 2, 2-三氯乙醇	0.5%(V/V)	-	0.36 mL
ddH ₂ O	定容至 72 mL		
制胶前加入			
APS	0.05%(W/V)	10%(W/V)	0.36 mL
TEMED	0.05%(W/V)	-	0.036 mL

(8) 目的蛋白的表达与纯化

参照质粒 DNA 的转化步骤，将相应质粒转化至 BL21(DE3)star 细胞中，在对应抗性平板上 37°C 培养过夜。挑取 5 个单克隆菌落于 100 mL 对应抗性 LB 液体培养基中，37°C 220 rpm 的摇床内过夜孵育。将获得的菌液以 1: 100 的比例接种至大体积的对应抗性 LB 液体培养基中，37°C 220 rpm 培养至 OD 值达到 0.6-0.8。将摇床温度设置为 18°C，培养至温度达到设定值。加入 IPTG 溶液至终浓度为 0.5 mM，18°C 220 rpm 培养 18-22h。

收集菌液，6000 rpm 4°C 离心 15 min。弃去上层液体，使用 His buffer A 重悬沉淀，转移至 50 mL 离心管中，4000 rpm 4°C 离心 15 min。弃去上清，使用 200 mL His buffer A 重悬沉淀，以 1: 100 的比例加入蛋白酶抑制剂。预冷高压细胞破碎仪至 4°C，使用高压细胞破碎仪破碎细胞。

收集全部细胞破碎液，18000 rpm 4°C 离心 1 h，收集上清液备用。借助蠕动

泵使用 30 mL His buffer B 冲洗 HisTrap 5 mL 预装柱。之后使用 50 mL His buffer A 平衡 Ni 柱，将收集的上清液上样于 Ni 柱，收集流穿液。将上好样的 Ni 柱装载于 ÄKTA 系统，使用 His buffer A 将基线洗平。使用 His buffer B 进行梯度洗脱（流速 2 mL/min，30 min，His buffer B 浓度百分比 0-100%，每个收集管收集 5 mL 洗脱液）。洗脱完成后，使用 His buffer A 平衡 Ni 柱，根据 ÄKTA 峰图确定需要电泳验证的收集液。

根据 Ni 柱纯化的电泳结果，混合所需的收集液。使用 10 kDa 超滤管将溶液浓缩至小于 5 mL。将凝胶过滤层析柱 HiLoad™16/600 Superdex 75pg 装载于 ÄKTA 系统，使用 GF buffer for ULP1 替换柱中的液体，并将基线洗平。将蛋白溶液通过上样环上于层析柱中，开启收集系统，每管 10 mL。完成后，根据 ÄKTA 峰图确定需要电泳验证的收集液。

最后，使用 10 kDa 超滤管将溶液浓缩至小于 5 mL。使用 NanoDrop 测量溶液浓度。将溶液分装于 PCR 管中，并使用液氮进行速冻，保存于 -80°C。

如有需要，可在 Ni 柱纯化完后，向混合的收集液中加入 100 µL ULP1 用于切割 SUMO 标签，并使用 Ni 柱去除标签和未被切除标签的目的蛋白。

(9) tRNA 的体外氨酰化及其检测

配置以下 30 µL 的反应体系：20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.1 µg/µL BSA, 10 µM tRNA, 20 µM aaRS, 350 µM Amino acid 和 6 mM ATP。将体系置于 37°C 条件下孵育 15 min，完成后进行乙醇沉淀。用 30 µL DEPC 水溶解沉淀，取 15 µL 加入至生物素化反应体系中，总体积为 60 µL（包含终浓度 60 mM HEPES-KOH, pH 8.0 和 15 mM sulfo-NHS-biotin），于 4°C 孵育 1 h，完成后进行两次乙醇沉淀。用 12 µL DEPC 水溶解沉淀，取 1 µL 溶液加入 4 µL 1 mg/mL SA，室温反应 20min，制样，进行尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

三、研究结果

3.1 ULP1 蛋白酶的原核表达与纯化

为了消除蛋白标签 SUMO 对本研究关键的突变氨酰 tRNA 合成酶 mjTyrRS 活性的潜在影响，首先需要获得具有切割 SUMO 标签活性的 ULP1 蛋白酶。从实验室成员处获得带有 ULP1 序列的质粒并测序验证后，依据方法中目的蛋白的表达与纯化步骤，对 2 L 的菌液进行破碎收集并使用 Ni 柱纯化，对纯化结果的 4-20% SDS-PAGE 电泳结果如图 3-1-1 A 所示。ULP1 的预期蛋白大小为 26 kDa 左右，在细胞破碎原液（WCL）对应的泳道中，于 25 kDa 附近可见一颜色较深而宽度较粗的条带，应当是细胞表达的大量 ULP1 蛋白。将原液离心后，该条带主要分布于上清液（S）中。而通过 HisTrap 5 mL 预装柱后，流穿液（FT）中该处条带明显减弱，说明该处大小的蛋白成功滞留在柱中，应当是带有 6x His 标签的 ULP1。之后，根据仪器峰图选择的收集液中，ULP1 的浓度在 1B2 和 1B3 中最高，对应图 3-1-1 B 中峰的后半段，结果基本相吻合。

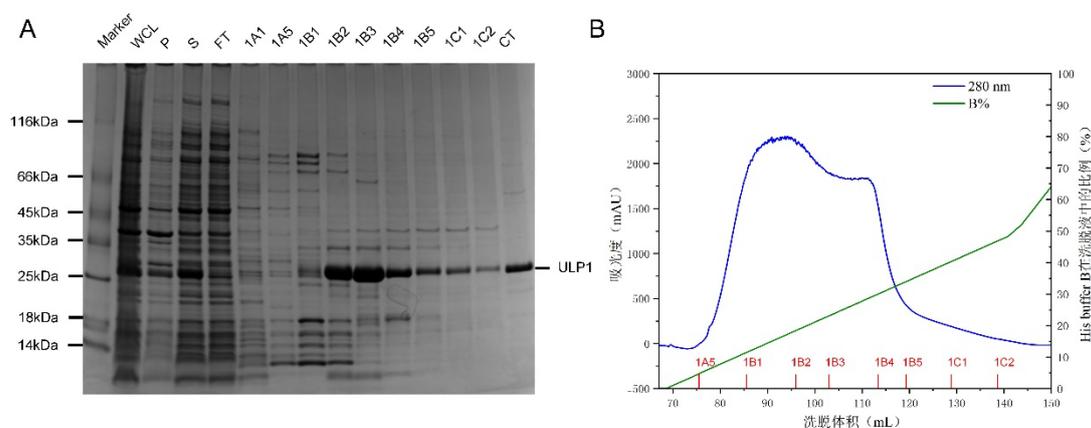


图 3-1-1. ULP1 蛋白酶的 Ni 柱纯化结果

A: Ni 柱纯化后所得收集液的 SDS-PAGE 检测结果, Marker 泳道: Thermo Scientific™ Pierce™ 未染色蛋白分子量标记物#26610; WCL 泳道: 细胞破碎液; P 泳道: 细胞破碎液沉淀重悬液; S 泳道: 细胞破碎液上清液; FT: Ni 柱流穿液; 1A1-1C2: 对应右侧峰图中收集管所收液体; CT: 已被证明有活性的 ULP1

B: 仪器 ÄKTA 在洗脱过程中测得的吸收峰图

将上一步中的 1B2-1C1 的收集液混合，进行进一步的分子筛纯化，对纯化结果的 4-20% SDS-PAGE 电泳结果如图 3-1-2 A 所示。通过 BP 泳道的结果可见，溶液中的 ULP1 含量较高，但仍有少量的较大或较小分子量的蛋白存在于溶液中，

这些蛋白可能是 ULP1 的多聚体、与 Ni 柱非特异性结合的蛋白或细胞自行产生的带有 6xHis 标签的蛋白。之后，根据仪器峰图选择的收集液中，ULP1 的浓度在 1C3 中最高，对应图 3-1-2 B 第二峰的后半段，杂蛋白主要出现于 1B4，对应第一峰，结果基本相吻合。

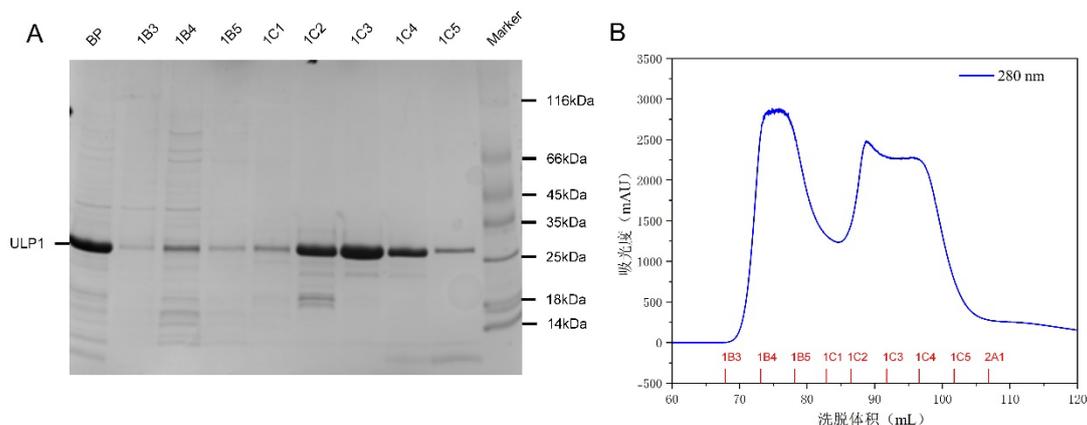


图 3-1-2. ULP1 蛋白酶的分子筛纯化结果

A: 分子筛纯化后所得收集液的 SDS-PAGE 检测结果, BP 泳道: 初始溶液; 1B3-1C5: 对应右侧峰图中收集管所收液体; Marker 泳道: Thermo Scientific™ Pierce™ 未染色蛋白分子量标记物#26610

B: 仪器 ÄKTA 在洗脱过程中测得的吸收峰图

3.2 mjTyrRS 的原核表达与纯化

在获取纯度较高的 ULP1 后，依照类似的流程，对 1 L 表达 mjTyrRS 的菌液进行破碎收集并使用 Ni 柱纯化，对纯化结果的 4-20% SDS-PAGE 电泳结果如图 3-2-1 A 所示。原始 mjTyrRS 约有 306 个氨基酸，大小约为 35 kDa，而所用 SUMO 标签的大小约 19 kDa，因此融合蛋白的大小应在 54 kDa 附近。在细胞破碎原液（WCL）对应的泳道中，在 45 kDa 与 66 kDa 的蛋白 marker 之间有一极为明显的条带，应当是细胞表达的大量 mjTyrRS 蛋白。将原液离心后，该条带主要分布于上清液（S）中。而通过 HisTrap 5 mL 预装柱后，流穿液（FT）中该处条带明显减弱，说明该处大小的蛋白成功滞留在柱中，应当是带有 6x His-SUMO 标签的 mjTyrRS。之后，根据仪器峰图选择的收集液中，mjTyrRS 的浓度在 1C3 和 1C4 中最高，对应图 3-2-1 B 中的单峰，结果互相吻合（主峰中产生的两个次峰，可能是仪器或层析柱在运行时受到了干扰所致）。

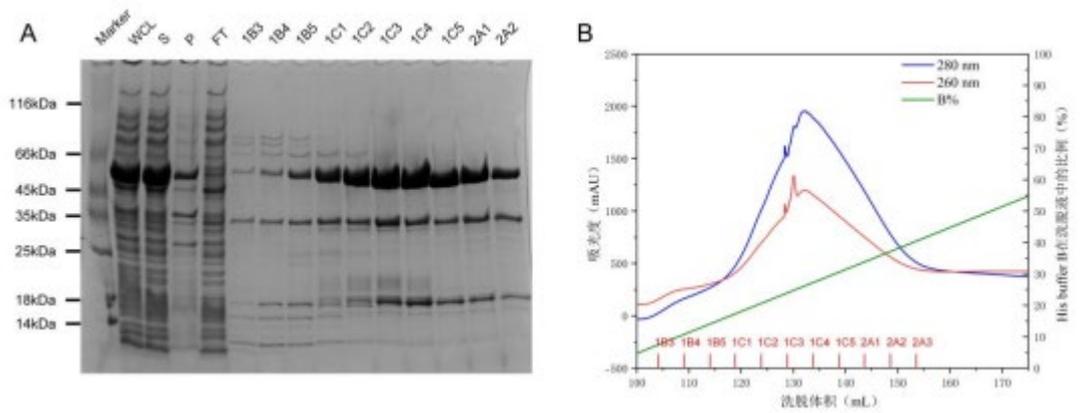


图 3-2-1. mjTyrRS 的 Ni 柱纯化结果

A: Ni 柱纯化后所得收集液的 SDS-PAGE 检测结果, Marker 泳道: Thermo Scientific™ Pierce™ 未染色蛋白分子量标记物#26610; WCL 泳道: 细胞破碎液; S 泳道: 细胞破碎液上清液; P 泳道: 细胞破碎液沉淀重悬液; FT: Ni 柱流穿液; 1B3-2A2: 对应上方峰图中收集管所收液体

B: 仪器 ÄKTA 在洗脱过程中测得的吸收峰图

为了避免 SUMO 标签可能存在的对 mjTyrRS 活性的潜在影响, 也为了检验 ULP1 的活性, 使用新纯化的 ULP1 对 1B3-2A2 收集液的混合液进行处理, 并间隔时间取样, 简要测试 ULP1 的活性, 图 3-2-2 展示了 ULP1 酶切的结果。原始的蛋白混合液中, 有三条较为明显的蛋白条带, 分布于 18 kDa、35 kDa 和 45 kDa 附近。

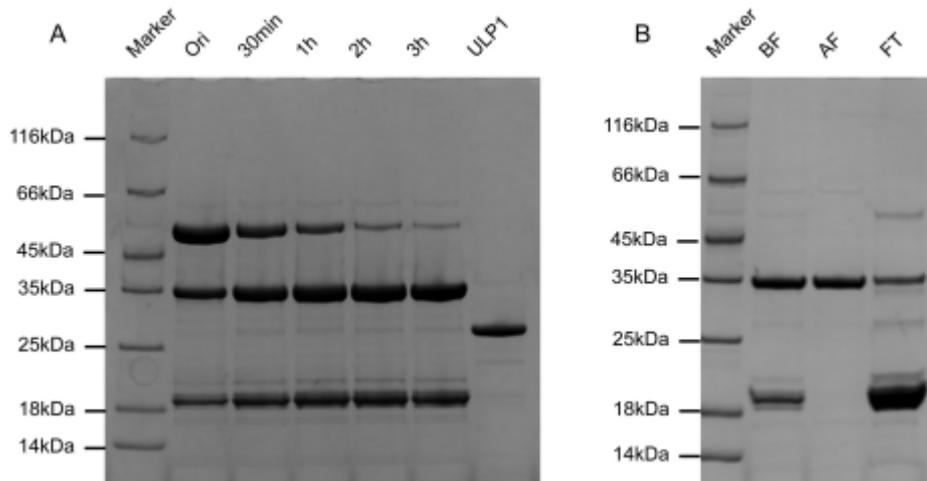


图 3-2-2. 使用 ULP1 切割标签及利用 Ni 柱去除标签的结果

A: ULP1 切割标签的效果检测结果, Marker 泳道: Thermo Scientific™ Pierce™ 未染色蛋白分子量标记物#26610; Ori 泳道: 酶切前溶液; 30min-3h 泳道: 使用 ULP1 酶切 30min、1h、2h 和 3h 后的溶液; ULP1: ULP1 对照

B: 使用 Ni 柱去除标签前后的对比结果, Marker 泳道: Thermo Scientific™ Pierce™ 未染色蛋白分子量标记物#26610; BF: 反挂 Ni 柱前的溶液; AF: 经过 Ni 柱后的溶液; FT: 使用高咪唑溶液洗脱 Ni 柱后的溶液

初步判断，可能是部分融合蛋白在某些因素作用下，标签与目的蛋白连接处提前发生了断裂。18 kDa 附近的应当是切割后的 SUMO 标签、35 kDa 附近的应当是切除标签后的 mjTyrRS，45 kDa 附近的应当是未切除标签的融合蛋白。在图 3-2-2 A 中，随着加入 ULP1 时间的增长，45 kDa 附近的条带逐渐减弱至极少，18 kDa 和 35 kDa 附近的条带则逐渐增加，说明了 ULP1 蛋白酶具备较好的活性。在图 3-2-2 B 中，经过 Ni 柱后的溶液主要剩下了切除标签后的 mjTyrRS，说明标签及未切除标签的融合蛋白留在了 Ni 柱中，Ni 柱后续的洗脱液对应的泳道也证实了这一点。

将上一步中蛋白溶液进行进一步的分子筛纯化，对纯化结果的 4-20% SDS-PAGE 电泳结果如图 3-2-3 A 所示。根据仪器峰图选择的收集液中，ULP1 的浓度在 1B4 中最高，对应图 3-2-3 B 中的单峰，结果互相吻合。

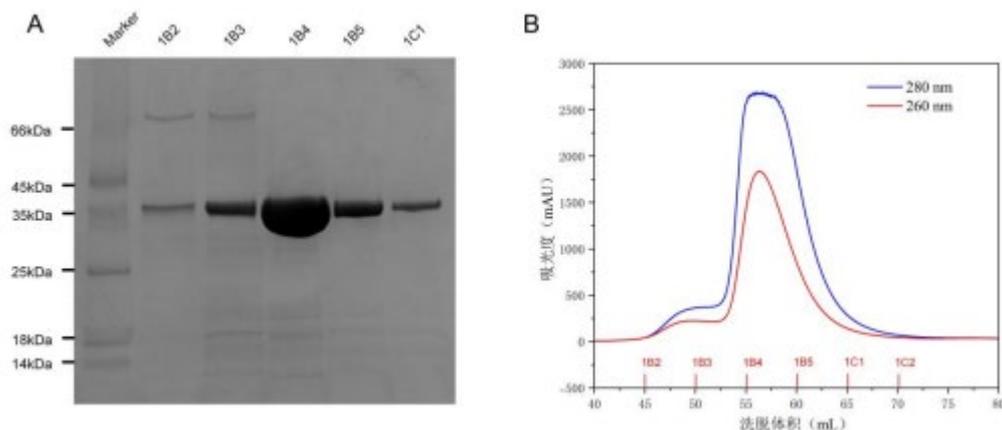


图 3-2-3. mjTyrRS 的分子筛纯化结果

A：分子筛纯化后所得收集液的 SDS-PAGE 检测结果，Marker 泳道：Thermo Scientific™Pierce™ 未染色蛋白分子量标记物#26610；1B2-1C1：对应上方峰图中收集管所收液体

B：仪器 ÄKTA 在洗脱过程中测得的吸收峰图

3.3 mjTyrRS 的活性检测

根据文献中的方法，使用 mjTyrRS 对 tRNA-Tyr-CUA 进行氨酰化后，利用 sulfo-NHS-biotin 对 aa-tRNA 进行生物素化，再使用 Streptavidin 结合 biotin，使得 SA-biotin-aa-tRNA 整体电泳变慢，Urea-PAGE 电泳结果如图 3-3-1 所示。tRNA-Tyr-CUA 的大小为 77 nt，对比 75nt 的 RNA 其电泳较慢。对比未正常加入 mjTyrRS 进行氨酰化的 no RS 泳道，SA-biotin-aa-tRNA 泳道在上游有一明显的条带，说明 mjTyrRS 对 tRNA-Tyr-CUA 成功地进行了氨酰化，而仅加入 SA 的泳道则对比说

明这一条带不是由 SA 单独造成的。

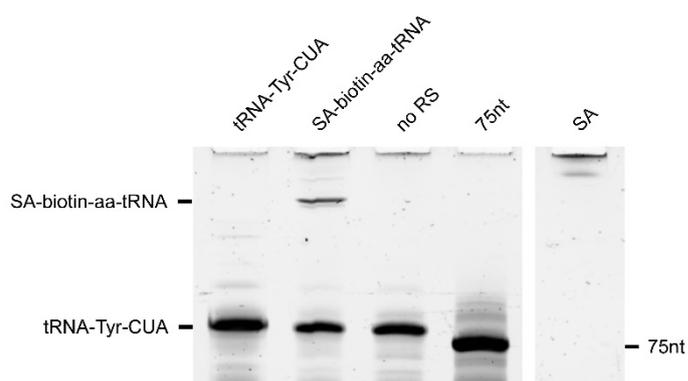


图 3-3-1. mjTyrRS 的氨酰化实验检测结果

tRNA 泳道: 原始 tRNA-Tyr-CUA 对照; SA-biotin-aa-tRNA 泳道: 氨酰化反应后, 利用 sulfo-NHS-biotin 和 Streptavidin 标记 aa-tRNA; no RS 泳道: 未添加 mjTyrRS 的氨酰化反应对照; 75nt 泳道: 已知大小为 75nt 的 RNA 对照; SA 泳道: Streptavidin 对照

四、讨 论

本研究主要聚焦于探索利用点击化学策略实现 VPg 与 RNA 准确连接的可能方法。VPg 在一些病毒中存在多样的生理功能，但现有的研究主要关注其自身是如何发挥作用的，对于 VPg-RNA 整体的研究还相对较少，这可能是由于构建二者间精确连接的方法不甚成熟。因此如果能够探索出一种足够精准且可行性高的连接方法，将有助于相关整体研究的开展。

目前，本研究已完成原核表达关键酶——突变酪氨酸氨酰 tRNA 合成酶 mjTyrRS 和相关工具酶实现了 mjTyrRS 的获取，并根据相关方法学，对 mjTyrRS 进行了氨酰化能力的功能验证，初步奠定了整体方法论的可行性。但在图 3-3-1 中可见，氨酰化后的 aa-tRNA 仅占较小一部分，一方面可能是由于改造后的氨酰 tRNA 合成酶本身其活性就有所下降，另一方面可能是由于氨酰化反应进行的时间较短，仅有 20 min。这都说明在后续使用 mjTyrRS 时可能需要优先考虑加大使用量并延长反应时间。

由于实验中遇到的各种问题及受限于时间，本研究难以进行更进一步的探索。后续，本研究将使用突变后的荧光素酶基因，接触体外翻译系统，摸索 mjTyrRS 和 tRNA-Tyr-CUA 在具体翻译条件下的最佳工作浓度，并由此翻译在特定位置带有叠氮基团的 VPg。其次，通过在体外转录系统中加入带有炔基的 ATP，实现在 RNA 5'端定向插入炔基，进而获得带有炔基基团的 RNA。最后，依据点击化学的策略，尝试构建 VPg 与 RNA 间的共价连接。

传统的蛋白质改造常使用天然的氨基酸进行，通过 DNA 序列上的改造设计即可完成相应位点氨基酸的增删减改。但近些年随着技术的进步及普及，非天然氨基酸（unnatural amino acids, UAAs）开始显示出其在改变蛋白质性质方面的独特作用^[21]。例如在 2010 年 Nediljko 等人的研究中，他们发现在部分 *Candida antarctica* 突变体中，芳香族氨基酸被氟化，但产生的脂肪酶活性不受影响且酶活寿命得到了延长^[22]。非天然氨基酸将会在未来开发各种新功能酶的过程中，扮演极其重要的角色。本研究所涉及的非天然氨基酸改造方法学，亦有较大的潜力运用在其他蛋白的改造上，为开发生物大分子间的连接方法做出一定的贡献。

总而言之，本研究成功实现了关键酶 mjTyrRS 的表达与纯化，并检验了其活性，为后续将非天然氨基酸引入 VPg，进而实现利用点击化学策略实现 VPg-RNA 准确连接做好了铺垫。

参考文献

- [1] MERRICK W C, PAVITT G D. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells [J]. *Csh Perspect Biol*, 2018, 10(12).
- [2] KAPP L D, LORSCH J R. GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2 [J]. *J Mol Biol*, 2004, 335(4): 923-36.
- [3] PISAREV A V, HELLEN C U T, PESTOVA T V. Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes [J]. *Cell*, 2007, 131(2): 286-99.
- [4] KUMAR P, HELLEN C U T, PESTOVA T V. Toward the mechanism of eIF4F-mediated ribosomal attachment to mammalian capped mRNAs [J]. *Gene Dev*, 2016, 30(13): 1573-88.
- [5] KWAN T, THOMPSON S R. Noncanonical Translation Initiation in Eukaryotes [J]. *Csh Perspect Biol*, 2019, 11(4).
- [6] QUERIDO J B, SOKABE M, KRAATZ S, et al. Structure of a human 48S translational initiation complex [J]. *Science*, 2020, 369(6508): 1220-+.
- [7] KWAN T, THOMPSON S R. Noncanonical Translation Initiation in Eukaryotes [J]. *Csh Perspect Biol*, 2019, 11(4).
- [8] JAN E, KINZY T G, SARNOV P. Divergent tRNA-like element supports initiation, elongation, and termination of protein biosynthesis [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15410-5.
- [9] AVANZINO B C, FUCHS G, FRASER C S. Cellular cap-binding protein, eIF4E, promotes picornavirus genome restructuring and translation [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(36): 9611-6.
- [10] JIANG J, LALIBERTÉ J F. The genome-linked protein VPg of plant viruses - a protein with many partners [J]. *Curr Opin Virol*, 2011, 1(5): 347-54.
- [11] HÉBRARD E, BESSIN Y, MICHON T, et al. Intrinsic disorder in Viral Proteins Genome-Linked: experimental and predictive analyses [J]. *Virol J*, 2009, 6.
- [12] GOODFELLOW I. The genome-linked protein VPg of vertebrate viruses - a multifaceted protein [J]. *Curr Opin Virol*, 2011, 1(5): 355-62.
- [13] GOODFELLOW I, CHAUDHRY Y, GIOLDASI I, et al. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E [J]. *Embo Rep*, 2005,

6(10): 968-72.

- [14] HERBERT T P, BRIERLEY I, BROWN T D K. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation [J]. *J Gen Virol*, 1997, 78: 1033-40.
- [15] FITZGERALD K D, SEMLER B L. Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus [J]. *Bba-Gene Regul Mech*, 2009, 1789(9-10): 518-28.
- [16] SUN Y, GUO Y, LOU Z Y. Formation and working mechanism of the picornavirus VPg uridylylation complex [J]. *Curr Opin Virol*, 2014, 9: 24-30.
- [17] DE OLIVEIRA L C, VOLPON L, RAHARDJO A K, et al. Structural studies of the eIF4E-VPg complex reveal a direct competition for capped RNA: Implications for translation [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(48): 24056-65.
- [18] KIM E, KOO H. Biomedical applications of copper-free click chemistry: in vitro, in vivo, and ex vivo [J]. *Chem Sci*, 2019, 10(34): 7835-51.
- [19] NÖDLING A R, SPEAR L A, WILLIAMS T L, et al. Using genetically incorporated unnatural amino acids to control protein functions in mammalian cells [J]. *Essays Biochem*, 2019, 63(2): 237-66.
- [20] GAMPER H, HOU Y M. A Label-Free Assay for Aminoacylation of tRNA [J]. *Genes-Basel*, 2020, 11(10).
- [21] RAVIKUMAR Y, NADARAJAN S P, YOO T H, et al. Unnatural amino acid mutagenesis-based enzyme engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(8): 462-70.
- [22] BUDISA N, WENGER W, WILTSCHI B. Residue-specific global fluorination of lipase B in [J]. *Mol Biosyst*, 2010, 6(9): 1630-9.

致 谢

回望过去四年的大学时光，我经常感慨时间是过得如此之快。当我问自己为什么当初要选择生物科学这个专业时，我总会想起小时候想成为科学家的梦想，总会想起四季更替中生物世界发生的万千变化，总会想起“二十一世纪是生物的世纪”这句名言。四年的学习让我初步认识到了什么是现实世界的生物学研究，实验室的训练以及毕业设计的开展让我切身参与至一些研究中，我在此过程中也明白了现实与理想之前确实有不小的差距。但人生的意义不就在于挑战和成长吗？即使最终无法获得成功，但这过程也是值得自己铭记一生的。

在毕业设计的开展过程中，首先我想感谢的是林金钟老师。我从大二便开始在林老师的实验室进行科研训练，直至现在，乃至未来。林老师是一位专业能力强、善于沟通并且乐于帮助本科生进行科研训练的好老师。我从与他的沟通中，从他在组会上对其他研究生的指导中，收获了很多关于科学思维的提升，这对我培养自己的科研方法论大有裨益。

其次，我想感谢的是逯国亮老师。逯老师是我最常接触的老师，下到引物设计，上到实验规划，逯老师都能提供快速有效的指导，帮助我高效地解决实验过程中遇到的麻烦。除此之外，在与逯老师的沟通中，我总能感受到他科研思维的活跃，希望我有朝一日也能如此活跃地发现并提出有价值的科学问题。

我还想感谢在实验技术细节方面给予了我许多帮助的李丽师姐、姚静师姐、闫亚杰师姐、谷宇琛师兄、李健师兄、薛钊师兄和郭良伟同学等实验室成员。正是有了一个和谐的实验室，我才不至于付出更多的无用功。

最后，我还想感谢我的父母和弟弟。家人始终是支持我的坚强后盾，每当我状态不佳时，与家人聊聊天总能帮助我从中缓解。希望我在今后的日子里，继续做一个好儿子和好哥哥。

写至此处，已是尾声，未来的挑战即将来到，希望我能以良好的精神和体魄去面对，也希望属于生物的时代快一步到来。