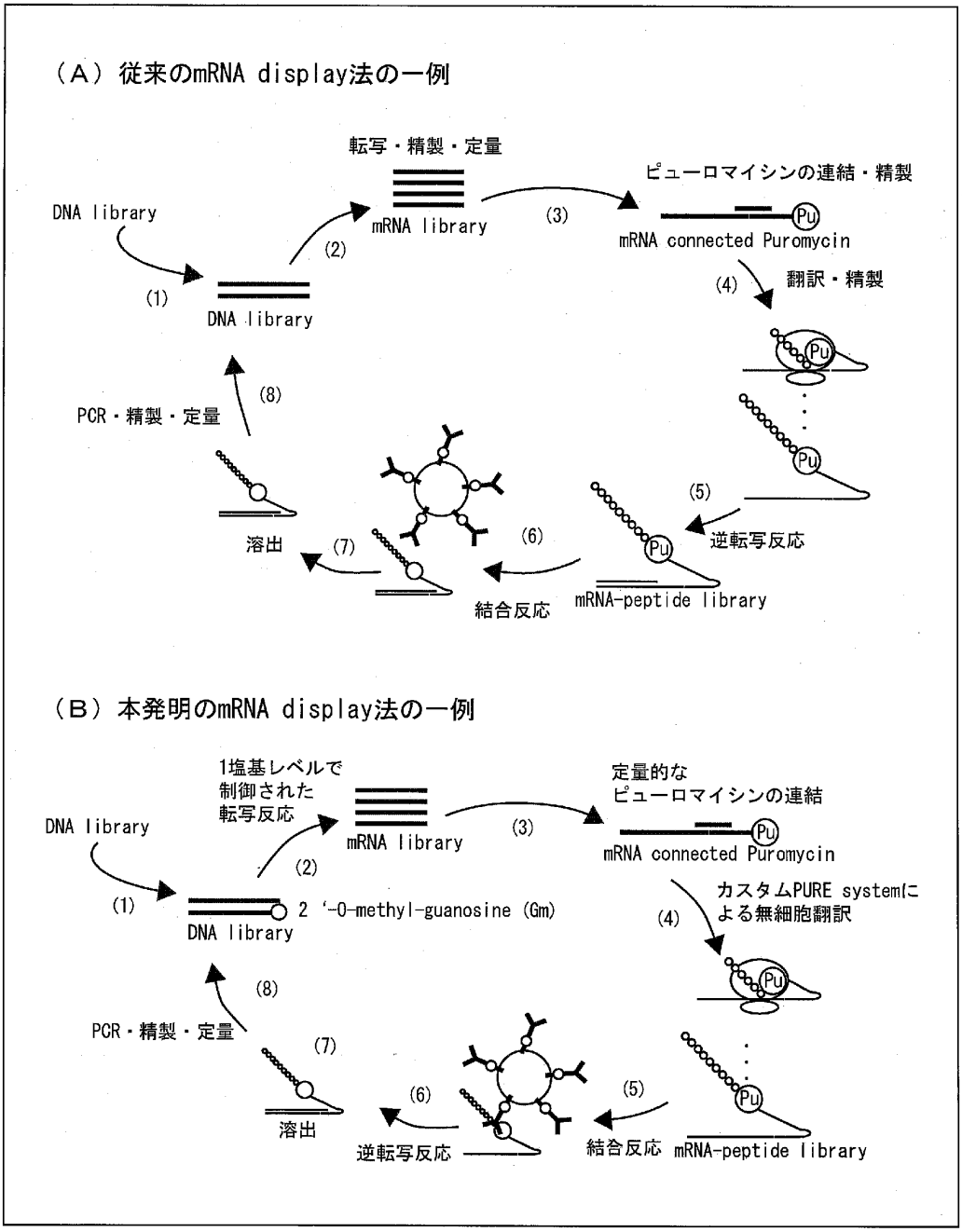
[図1]

図 1


（A）従来のmRNA display法の一例
転写・精製・定量
ピューロマイシンの連結・精製
DNA library
mRNA library
mRNA connected Puromycin
(1)
(2)
(3)
(4)
翻訳・精製
DNA library
Pu
PCR・精製・定量
(8)
(5)
逆転写反応
溶出
(7)
(6)
mRNA-peptide library
結合反応
（B）本発明のmRNA display法の一例
1塩基レベルで
制御された
転写反応
定量的な
ピューロマイシンの連結
DNA library
mRNA library
mRNA connected Puromycin
(1)
(2)
(3)
2 '-O-methyl-guanosine (Gm)
DNA library
カスタムPURE systemに
よる無細胞翻訳
(4)
Pu
(8)
PCR・精製・定量
(7)
(6)
(5)
溶出
逆転写反応
結合反応
mRNA-peptide library

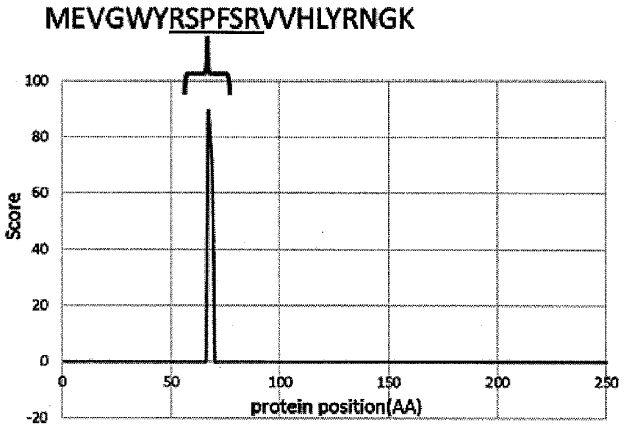
[図2]

図 2

(A)

Rank	Sequence	Position	Score
1	K S P F S R L T	68	63.646
2	R S P F N R _ T	68	12.659
3	Y S S P F N R K	67	8.382
4	H R S P F N R K	67	1.947
5	I S E Y K L R L	103	0.789
6	K S P F S R L T	68	0.252
7	S P F S R L T C	69	0.252
8	Y R S P F N R K	67	0.163
9	K S P F S R L T	68	0.126
10	S P F S R L T S	69	0.126

(B)

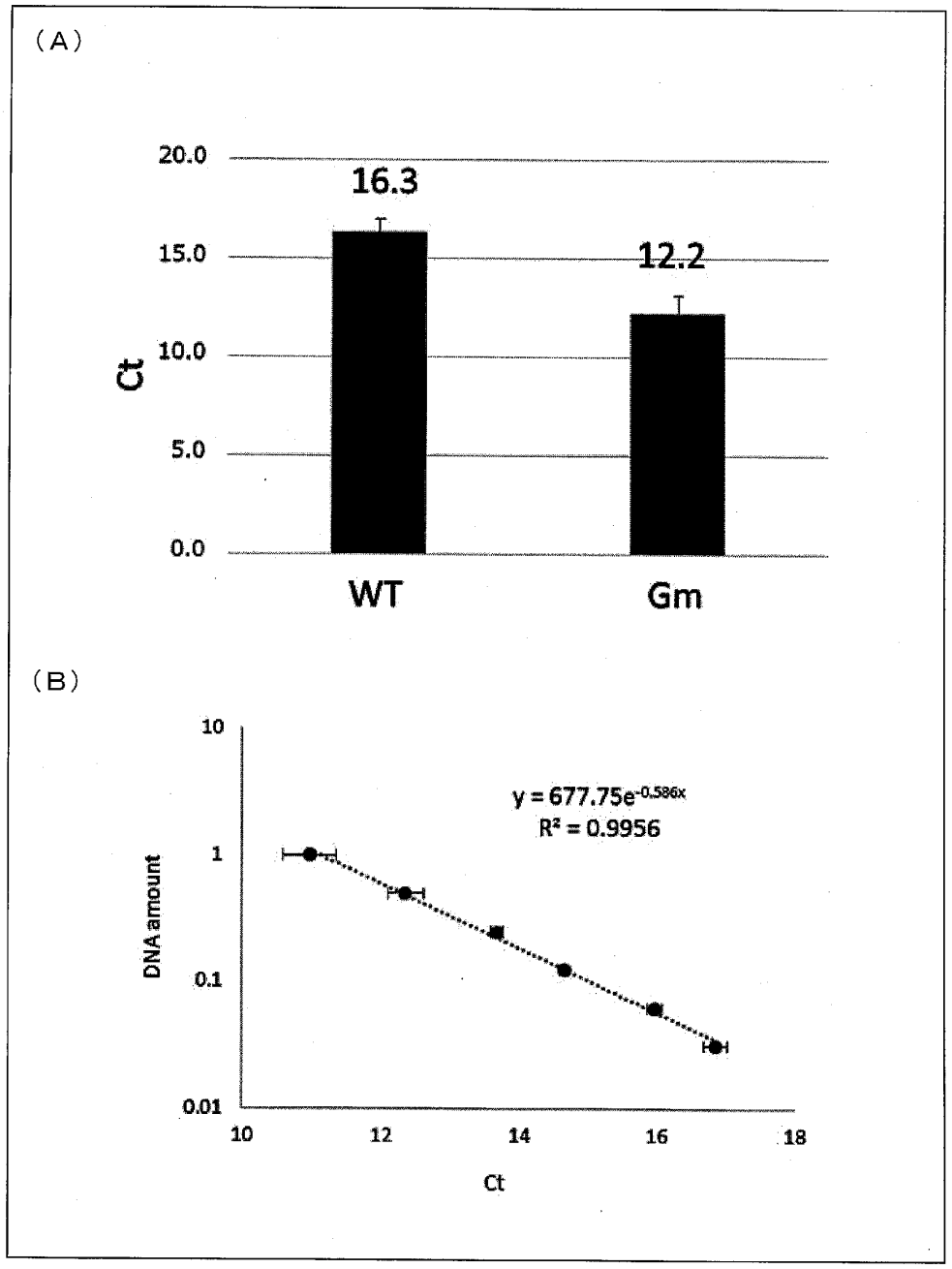


(C)



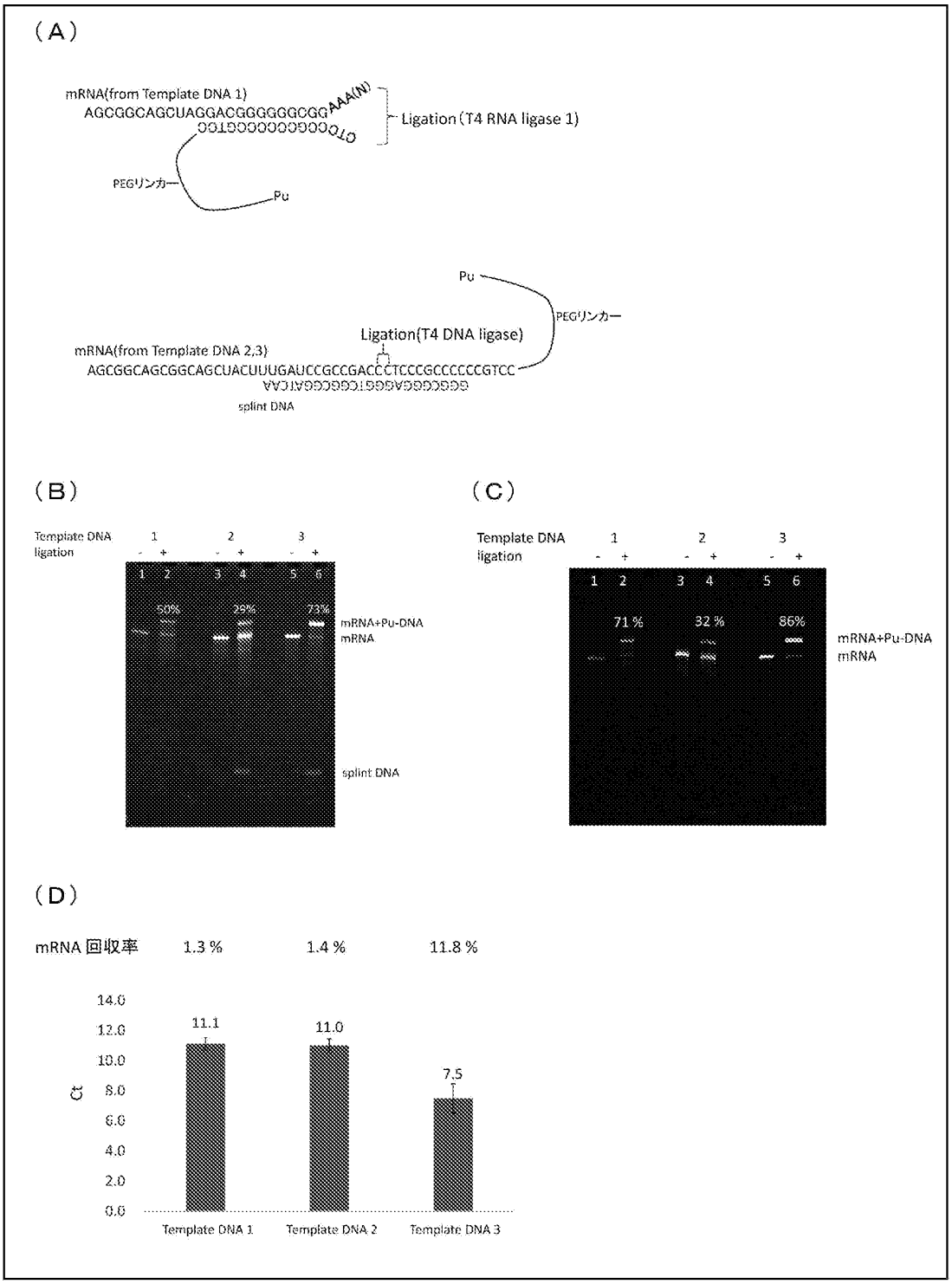
[図3]

図 3


(A)
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
Ct
16.3
12.2
WT
Gm
(B)
10
1
0.1
0.01
DNA amount
y = 677.75e-0.586x
R² = 0.9956
10
12
14
16
18
Ct

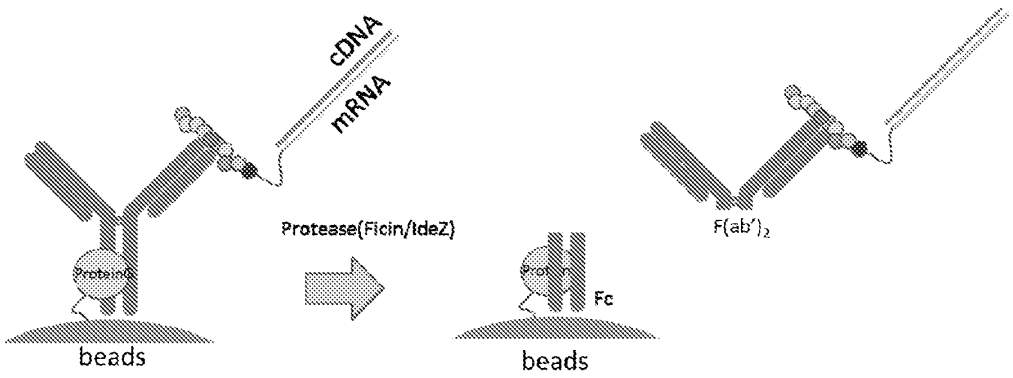
[図4]

図 4


(A)
mRNA(from Template DNA 1)
AGCGGCAGCUAGGACGGGGGGCGGAAA(N)
Ligation (T4 RNA ligase 1)
PEGリンカー
Pu
Pu
PEGリンカー
Ligation(T4 DNA ligase)
mRNA(from Template DNA 2,3)
AGCGGCAGCGGCAGCUACUUUGAUCCGCCGACCCTCCCGCCCCCCGTCC
splint DNA
(B)
Template DNA
ligation
1
2
3
50%
29%
73%
mRNA+Pu-DNA
mRNA
splint DNA
(C)
Template DNA
ligation
71 %
32 %
86%
mRNA+Pu-DNA
mRNA
(D)
mRNA 回収率
1.3 %
1.4 %
11.8 %
Ct
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
11.1
11.0
7.5
Template DNA 1
Template DNA 2
Template DNA 3

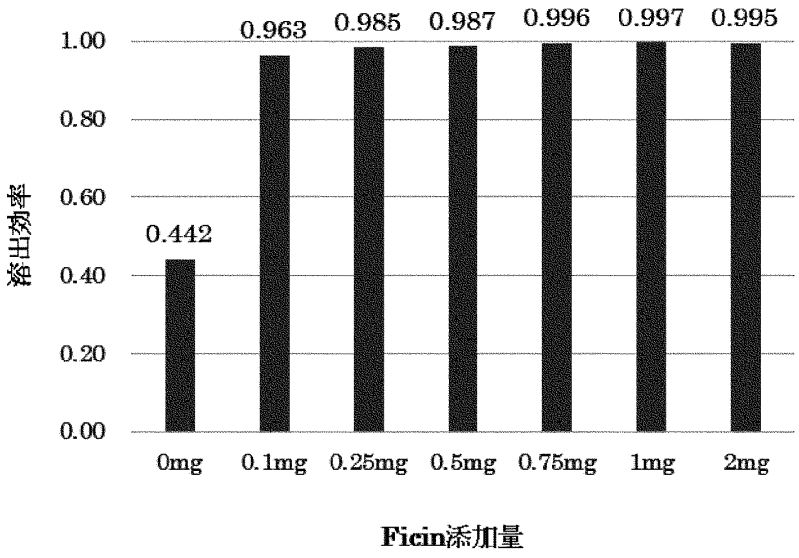
[図5]

図 5


cDNA
mRNA
Protease(Ficin/IdeZ)
ProteinA
beads
Fc
beads
F(ab')2

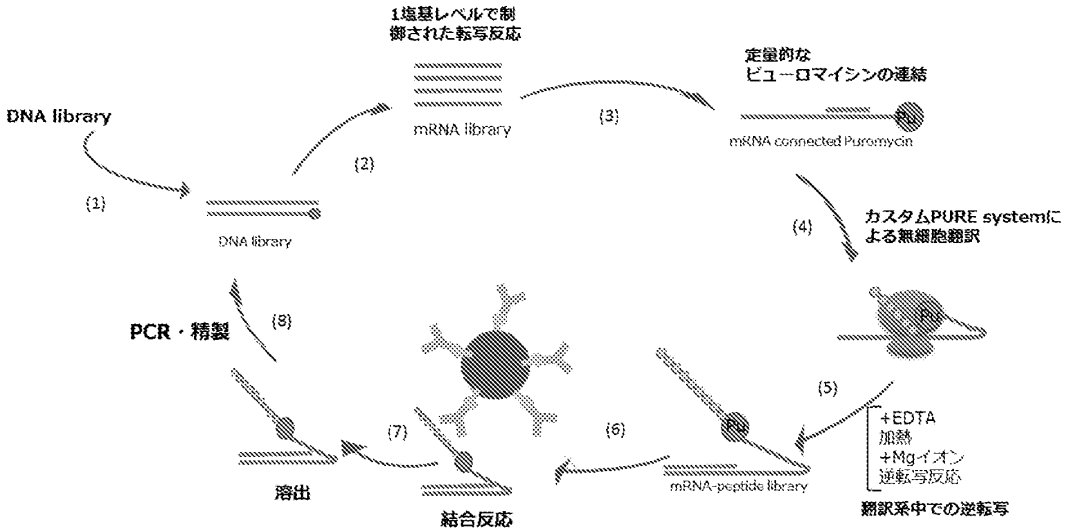
[図6]

図 6


溶出効率
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
0.442
0.963
0.985
0.987
0.996
0.997
0.995
0mg
0.1mg
0.25mg
0.5mg
0.75mg
1mg
2mg
Ficin添加量

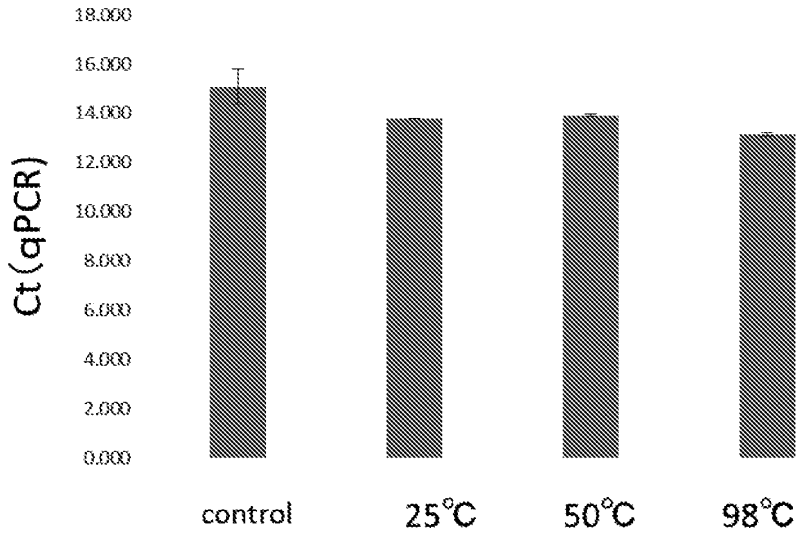
[図7]

図 7


1塩基レベルで制
御された転写反応
定量的な
ピューロマイシンの連結
DNA library
mRNA library
mRNA connected Puromycin
(1)
(2)
(3)
(4)
DNA library
カスタムPURE systemに
よる無細胞翻訳
PCR・精製
(8)
(5)
+EDTA
加熱
+Mgイオン
逆転写反応
(7)
(6)
溶出
結合反応
mRNA-peptide library
翻訳系中での逆転写

[図8]

図 8


18.000
16.000
14.000
12.000
10.000
8.000
6.000
4.000
2.000
0.000
Ct(qPCR)
control
25℃
50℃
98℃