

噬菌体展示载体的构建

吴国球, 沈子龙^①

(中国药科大学生物技术中心, 南京 210009)

摘要 目的 构建适宜噬菌体展示的载体系统。方法 利用 pCOM B₃的 LacZ 强启动子, Pelb 引导序列, 包膜蛋白 III 基因, 用 N HeI-XbaI 双酶切, 切除一个克隆位点; 同时设计一对引物, 用 PET-28(a)⁺ 作模板扩增 550 bp 片段, 插入 XhoI-SpeI 位点之间, 扩增质粒后用限制性内切酶, PCR, DNA 测序等方法作鉴定。结果 切除了 272 bp N HeI-XbaI 片段, 插入片段后酶切鉴定显示: XhoI SpeI 单酶切, XbaI NheI 无酶切; 所构质粒用 XhoI+ SpeI 双酶切及 PCR 扩增均可见 550 bp 片段; 测序结果正确。结论 成功构建了一种高拷贝、稳定、多用途, 易于操作的噬菌体展示载体。

关键词 噬菌体展示; 构建; 载体

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2002)06-0529-04

噬菌体展示文库在新药开发领域, 尤其在全人源化单克隆抗体方面为扩展生物多样性提供了强大的研究工具^[1]。它能容纳超过上百万个单个分子的克隆, 因此又称全套基因库, 可以通过受体与配体, 抗原与抗体相结合的特性, 从中筛选出目的基因克隆, 使目的基因能在很短的时间内(数周)高效克隆, 筛选和表达^[2]。文库的大小是决定生物多样性的关键。因此构建一种高拷贝、稳定、多用途、易于操作的载体具有十分重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

pCOM B₃质粒, XL1-blue 菌株(东南大学基础医学院张建琼博士惠赠), PET-28(a)⁺ 质粒, JM109 菌株(本实验室保存), 限制性内切酶 NheI XbaI SacI SpeI XhoI(MBI) T4 连接酶, 琼脂糖, EDTA, DNA 回收试剂盒等(上海生工), LB, SOC 按常规方法配制, PCR 仪(AmpGene4800), 电泳仪(北京六一仪器厂)。

引物:

P1 5'-GGCTCGAGGCCAAC T C T A G T A T G G C C C -3'

下划线为 XhoI 酶切位点

P2 5'-GGACTAGTCTAACCAAGCACTTCAGTGGGAA-3'

下划线为 SpeI 酶切位点(大连宝生物工程公司合成)

1.2 方法

1.2.1 pCOM B₃ 的扩增 含 pCOM B₃ 的 XL1-blue

接种于四环素(50 mg/L) 氨苄青(100 mg/L) 双抗平板, 37℃过夜培养, 挑单个菌落, 接种 10 ml 的 LB 液体增菌培养液, 37℃ 6 h, 摆至 OD₆₀₀ 为 0.36, 按常规方法抽提质粒: 按每毫升菌液 100 μl 液(50 mmol/L Glucose, 25 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA), 200 μl II 液(0.24 mmol/L NaOH 100 μl, 5% SDS 100 μl), 150 μl III 液(3 mmol/L KAc, 2.5 mmol/L HAc) 混匀, 12000 r/min 5 min, 吸取上清液, 等体积酚: 氯仿抽提一次, 上清液加两倍体积的无水乙醇, 4℃放置 10 min, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀挥干后, 加无菌水 20 μl, -20℃保存备用。

1.2.2 片段切除及剩余片段的连接 pCOM B₃ 10 μl, 加 10× buffer 4 μl, 去离子水 34 μl, NheI, XbaI 各 1.0 μl, 37℃ 酶切 2 h, 回收片段, 20 μl 水溶, 取 5 μl 加 10× ligation 1 μl, 去离子水 3.5 μl, T4 连接酶 0.5 μl, 16℃ 连接过夜。

1.2.3 感受态细胞制备及转化 XL1-blue 单菌落接种于 100 ml LB(含氨苄青 100 mg/L), 37℃ 摆至 OD₆₀₀ 为 0.4, 8000 r/min 2 min 收集菌液, 按每毫升菌液加 0.5 mol/L CaCl₂ 100 μl, 冰上放置 30 min, 8000 r/min 20 min, 弃上清, 沉淀用相同浓度 CaCl₂ 悬浮菌液, 100 μl 分装, 加 10% 甘油, -70℃ 保存。取连接液 5 μl, 加入 100 μl 感受态细胞, 冰上放置 30 min, 42℃ 热激 90 s, 加入预热 SOC 1 ml, 37℃ 摆 45 min, 涂布于四环素(50 mg/L) 氨苄青(100 mg/L) 双

抗平板,同时设阴性对照,37℃过夜,随机挑选单菌落扩大培养,抽提质粒,分别用NheI,XbaI,SacI,SpeI酶切检查,0.8%琼脂糖100v/50mA电泳40min,EB染色,观察结果 阳性质粒命名为Pa⁺

1.2.4 插入片段的制备

1.2.4.1 插入片段的扩增 PET-28(a)⁺质粒抽提后,取1μl加10×buffer 3μl,P1 3μl(50 pmol),P2 3μl(50 pmol),Taq酶0.5μl,dNTP 1μl,加D₂O至30μl,加一滴矿物油,94℃变性5 min后执行94℃变性1 min,45℃退火1 min,72℃延伸1 min循环程序,25个循环后72℃延伸10 min,同时设阴、阳性对照。PCR产物用1.2%琼脂糖电泳检查,切下550 bp条带。每100 mg琼脂糖加400 μl Binding buffer,50℃放置2 min,转移至离心柱,8000 r/min 1 min,弃废液后加Wash solution 450 ml,8000 r/min 1 min,弃废液,重复一次,12000 r/min,开盖离心1 min,在柱中央加20 μl D₂O,12000 r/min 2 min,-20℃保存。

1.2.4.2 酶切 取“1.2.3”酶切鉴定阳性质粒及550 bp PCR回收片段各10 μl分别加10×buffer 2 μl,D₂O 7 μl,SpeI 1 μl,37℃酶切4 h,65℃20 min灭活;补加10×buffer 2.3 μl,XhoI 1 μl 37℃继续酶切4 h,1.5%琼脂糖电泳,按“1.2.4.1”方法回收相应片段。

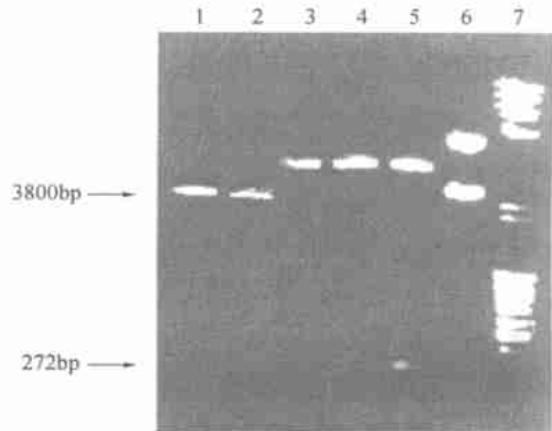
1.2.4.3 连接及转化 取回收片段各4 μl加T4 ligase 1 μl,10×T4 ligation 1 μl,16℃连接过夜,全量转化XL1-Blue感受态细胞,42℃热激后涂布于氨苄、四环素双抗平板,37℃过夜。挑单菌落接种于双抗LB,37℃6 h,抽提质粒,1.5%琼脂糖电泳检查。

1.2.5 PCR及酶切位点检查 取质粒1 μl,加引物P1,P2各3 μl,Taq酶0.5 μl,dNTP 1 μl,10×buffer 2 μl,补加D₂O至20 μl,1滴矿物油,按“1.2.4.1”PCR程序25个循环,1.2%琼脂糖电泳观察结果。取PCR阳性质粒5 μl,加入10×buffer 1 μl,D₂O 3 μl,SpeI 1 μl,37℃酶切4 h,65℃20 min灭活;补加10×buffer 1.1 μl,XhoI 1 μl 37℃继续酶切4 h,1.5%琼脂糖电泳,EB染色,观察结果。阳性质粒命名为Pa⁺。

1.2.6 载体测序 测序引物为5'-TTACTCGCTGCCAACCAG-3',引物距XhoI位点尚有20个碱基,采用ABI PRISM 377 DNA Sequencer测序。

2 结果

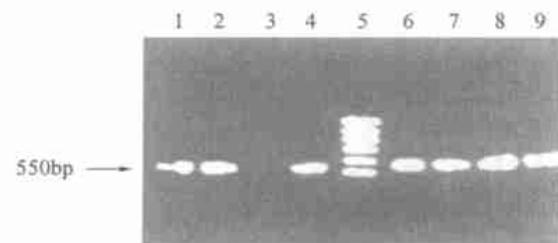
1) 第二个克隆位点的切除 pCOMB用NheI-XbaI双酶切,可见272 bp条带,切除上述片段后,将剩余大片段回收自连后转化并抽提质粒,分别用NheI,XbaI,SpeI,XhoI酶切检查,结果显示:XbaI,NheI无酶切,SpeI,XhoI可见单酶切条带,酶切位点正确(图1)



1, 2 NheI, XbaI separately analysis; 3, 4 SpeI, XhoI separately analysis; 5 NheI-XbaI analysis; 6 pCOMB3; 7 λ phage DNA A/Hind III+ 1 Kb DNA Ladder.

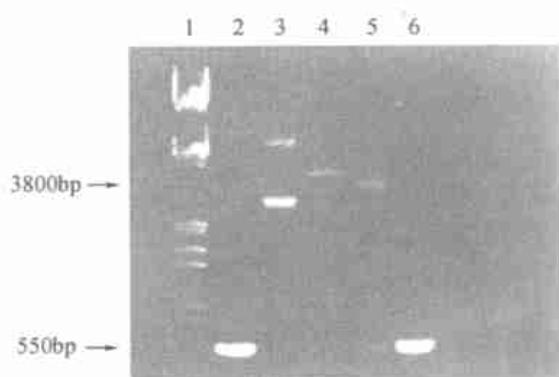
Fig 1. Restriction enzyme analysis of plasmid

2) 片段插入 PET-28(a)⁺作模板 PCR扩增后,可见550 bp条带,回收片段后与相同酶切的Pa载体连接,转化后筛选阳性质粒,1.5%琼脂糖电泳条带出现在Pa之后。随机挑选10个单菌落进行PCR检查,其中9个出现550 bp条带,阳性率90%(图2)。SpeI+XhoI双酶切检查,可见550 bp及3800 bp条带(图3)。Pa⁺质粒送生工测序,结果与预期序列一致(测序结果略)。



1, 2, 4, 6, 7, 8, 9 PCR product; 3 negative result; 5 1 kb Marker

Fig 2. PCR analysis of transformants



E. λ phage DNA /HindIII /Eco RI; 2 PCR product; 3 pCOM B3; 4 Pa⁺; 5 NheI-XbaI analysis of positive plasmid(Pa⁺); 6 PCR analysis of positive plasmid(Pa⁺)

Fig. 3. Restriction enzyme analysis of plasmid

3 讨 论

噬菌体表面呈现技术(Phage display technology)使制备全人源化单克隆抗体成为可能。1989年 Huse 等^[3]首次用 λ 噬菌体建立了小鼠抗体片段的抗体文库,随后又有单链 Fv(ScFv)^[4], Fab 片段^[5]以及双功能抗体文库^[6]的报道。用于抗体表面呈现的噬菌体载体是体现这一技术的关键。目前使用的载体包括 Lerner 实验室以 pBluescript⁺为背景构建了 pCBAKs, pCOMBs, pCOMB_s, Chang, 用 PUC 和 PGC1 构建 pTACP, Winter 实验室以 PUC119 构建的 pCANTAB 等载体, pCOMB_s^[7]是许多实验室广泛采用的载体, 它拷贝数高(> 200 拷贝/细胞), 容易分离, 带有 Ap^r 抗性基因用于筛选, 目的基因表达在 III 基因上游, 用于融合及呈现; 含有 LacZ 强启动子, Pelb 引导序列, 包膜蛋白 III 基因 重链基因克隆位点 XhoI-SpeI, 轻链基因克隆位点 XbaII-SacI。但我们在使用过程中发现, 克隆基因频繁发生缺失, 其原因可能因为此载体含有两个克隆位点, 分别用于克隆重链和轻链基因, 每个位点含有 LacZ 启动子, 核酶结合位点及 Pelb 前导序列。限制酶分析显示, 缺失发生在两个克隆位点之间, 此区域包含两个 81 bp 的重复序列, 即 24–105 bp 和 1037–1118 bp 之间, 质粒在线性化变性后第一个克隆位点的重复序列与第 2 个克隆位点的重复序列发生退火, 从而导致基因缺失。通过切除 272 bp N HeI-XbaI 片段, 即切除第 2 个克隆位点及其 81 bp 的重复序列, 消除了相应的缺失。NheI

(G^{*} CTAGA) 和 XbaI(T^{*} CTAGA) 是同尾酶, 因此用双酶切除 272 bp 片段后, 剩余片段可通过 T4 连结酶自连。

另外, 在操作过程中, 我们还发现由于 Spe I-Xba I 之间仅相差 40 bp, 因此在双酶切后, 由于片段大小无法用普通琼脂糖电泳检查酶切是否完全, 是单酶切还是双酶切, 操作极为不便, 因此插入 550 bp 片段, 可大大简化酶切消化、克隆及电泳分离等 DNA 操作步骤。由于切除了第 2 个克隆位点, 因此构建的载体适用于单链抗体的克隆与表达。

本载体是丝状噬菌体的突变株, 作为克隆载体, 噬菌体在转染细胞后能够自我复制并翻译出目的蛋白, 在用辅助噬菌体如 VCSM13, M13K07 共同感染后, 噬菌体能自我组装, 形成新的噬菌体。III 基因是噬菌体的包膜蛋白基因, 编码 406 个氨基酸, 其 C 端(P198–S406)镶嵌在噬菌体外壳上, N 端(1–P918)伸出噬菌体的表面特异性地吸附在雄性 *E. coli* 的性菌毛上, 当用目的基因代替 N 端时, 伸出部分带有目的蛋白, 但失去了感染雄性 *E. coli* 的能力。因此只有用辅助噬菌体超感染提供野生型 III 基因分子, 才能组装成具有另一轮感染活力的噬菌体颗粒, 不用辅助噬菌体, 就成了与表达质粒完全相同的表达载体, 因此称双相表达载体。

参 考 文 献

- Courtney BC, Williams KC, Schlageter JJ, et al. A phage display vector with improved stability, applicability and ease of manipulation [J]. *Gene*, 1995, **165**: 139–140.
- Scott JK. Discovering peptide ligands using epitope libraries [J]. *Trends Biochem Sci*, 1992, **17**: 386–390.
- Huse WD, Sastry L, Iverson SA, et al. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda [J]. *Science*, 1989, **246**: 275.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains [J]. *Nature*, 1990, **348**: 552–554.
- Hoogenboom HR. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains [J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**: 4133–4137.
- McGuinness BT. Phage diabody repertoires for selection of large numbers of bispecific antibody fragments [J]. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**: 1149–1154.
- Carlos F, Barbas III, Angray K, et al. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 7978–7982.

Construction of Vector for Phage Display

WU Guo-Qiu, SHEN Zi-Long

Biotechnology Center of China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

ABSTRACT AIM To construct the vector for phage display. METHODS By removing a NheI-XbaI cloning site, pCOMB3 was remained to be a lacZ strong promoter, a PelB lead sequence and a coat protein gene III. In the meanwhile, 550 bp fragment which was amplified by designed two primers and using template of PET-28(a)⁺ was inserted into the sites between XhoI and SpeI. The phagemid was identified by the methods of restrictive enzyme analysis, PCR and DNA sequencing after multiplied. RESULTS A 272bp fragment was deleted by NheI-XbaI. Restrictive enzyme analysis showed that the plasmid was cut by means of single site of either XhoI or SpeI; there were no sites of XbaI or NheI. 550bp fragment was amplified by PCR using template of constructed plasmid; DNA sequence was in accordance with the expected sequence. CONCLUSION A vector with characteristics of high copy number, applicability, ease of manipulation for phage display was successfully construction.

KEY WORDS Construction; Vector; Phage display;

◦ 新成果◦

我国在医药生物技术领域取得系列重大成果

在医药生物技术领域,我国已经步入了国际先进国家的行列,具备了一定的国际竞争能力。

目前我国在以下领域取得了重大成果:一批基因工程药物和疫苗正在从实验室研究向产业化转化,基因工程制药产业已初具规模;人工血液代用品即将进入临床研究;体细胞克隆和遗传病的基因诊断技术达到国际先进水平;B型血友病、恶性肿瘤、梗塞性外周血管等6个基因治疗方案已进入了临床疗效研究;纳米技术开始应用于医药研究;肿瘤免疫治疗、抗血管治疗、组织工程、生物芯片和干细胞等技术上也取得了一系列突破和重要进展。

中国已经开发成功了21种基因工程药物和疫苗,世界上销售额排名前10位的基因工程药物和疫苗,中国已能生产8种。

专家指出,虽然中国医药生物技术发展速度较快,取得一些喜人成就,但也存在着一些不容忽视的问题:中国生物制药企业研究与研发投入太少,使得研发能力很差;上下游技术脱节,成果转化率低等。专家们建议,应发挥社会各方面投资新药的积极性,多渠道增加医药生物技术投入,包括部门和地方政府资金、科技贷款、股票市场、海外基金等。同时还应积极培育风险资本市场,鼓励建立生物技术风险投资基金。

(中创网)