

植物病原生物 现代检测技术及应用

邵秀玲 厉艳 邓学农 张成标 陈长法 主编



中国质检出版社
中国标准出版社

植物病原生物现代检测 技术及应用

邵秀玲 厉 艳 邓学农 张成标 陈长法 主编

中国质检出版社
中国标准出版社

北 京

图书在版编目 (CIP) 数据

植物病原生物现代检测技术及应用/邵秀玲等主编. —北京:中国质检出版社,
2015.10

ISBN 978-7-5066-8032-5

I. ①植… II. ①邵… III. ①植物—病原微生物—研究 IV. ①S432

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 205729 号

中国质检出版社
出版发行
中国标准出版社

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号 (100029)

北京市西城区三里河北街 16 号 (100045)

网址: www.spc.net.cn

总编室: (010) 68533533 发行中心: (010) 51780238

读者服务部: (010) 68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 787×1092 1/16 印张 14 字数 286 千字

2015 年 10 月第一版 2015 年 10 月第一次印刷

*

定价 46.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 68510107

编 委 会

主 编 邵秀玲 厉 艳 邓学农 张成标 陈长法

副 主 编 甘琴华 张京宣 王英超 纪 瑛 尼秀媚
孙 铮 唐 静 吴兴海 房保海 吴振兴

编写人员 (按拼音顺序排序)

陈长法	邓学农	房保海	封立平	傅怡宁
甘琴华	顾建锋	胡东青	纪 瑛	姜 华
李明哲	厉 艳	鲁 闽	马维兴	尼秀媚
邵秀玲	栗智平	孙 冬	孙 铮	唐 静
王 简	王英超	王 宇	魏晓棠	吴兴海
吴振兴	徐云峰	余冬冬	张成标	张京宣

植物病原生物是指那些能够引起植物病害的有害生物,其覆盖面广、生物种类跨度大,从世界上最小的生命个体——核酸分子类病毒到更为复杂的蛋白——核酸复合体结构的病毒,从低等的原核生物细菌、植原体到高等真核生物(如线虫、螨虫、寄生种子植物)都被划入植物病原生物的行列。形态多样的结构特点、复杂多变的生理生化特征及要求各异的培养条件都给植物病原生物的检测鉴定工作带来了挑战。传统的检测方法已经不能满足现代农产品质量安全控制发展的要求,而分离培养、形态观察、生理生化、选择培养基、酶联免疫等检测病原菌、病毒的手段具有灵敏度低、特异性差、费时费工等明显缺点,在实际检测过程中逐步暴露出很大的局限性,已不能满足现代检测的需要。

近年来,随着生命、环境、新材料等科学的发展,以及生物学、信息学、计算机技术的引入,融合诸多学科所长的多种综合型、交叉型现代生物检测技术在植物病原生物检测领域逐渐崭露头角并得以应用。有害生物的防控是关系到农业生产及生态环境安全乃至国计民生的重大问题,据联合国粮农组织报道,全世界 5 种重要作物——稻、麦、棉、玉米和甘蔗,每年因有害生物造成的经济损失达 2000 亿美元以上。植物病原生物现代检测技术作为保障农作物质量安全的重要现代技术支撑,在农产品生产、重大流行病害疫情的控制和预警以及进出口农产品贸易中发挥着越来越重要的作用,其研究和发展是备受全世界关注和重视的全球性研究课题。为了进一步推广现代生物检测技术的应用,提高我国植物病原生物检测技术的现代化水平,本书编写人员从应用现状和技术特点入手,对新世纪以来,国际上逐步兴起或具有开展“潜力”的新技术进行了系统的梳理和筛选。全书共十一章,以“噬菌体展示技术”“基质辅助激光解吸离子—飞行时间质谱技术”“高效液相色谱技术”“生物传感技术”等为代表的十多种检测技术凝结了现代生物学、现代物理学、化学的发展结晶,这些简单、快速、灵敏、特异性强、高通量的新型经典技术将在书中以“精品”的形式呈现给读者。

本书是在山东出入境检验检疫局植物检疫科学研究的基础上,汇聚了近年来科研人员的研究成果而成,主要涵盖了《免疫荧光及实时荧光 PCR 技术在鉴定多种检



疫性粮食、花卉病原细菌工作中的应用》《新型变性高效液相色谱技术(DHPLC)快速检测植物病原的研究》《重要检疫性植物细菌的 LAMP 检测筛选技术研究》《噬菌体展示技术耦联表面等离子体谐振生物传感技术高通量快速检测植物病原细菌的研究》《关键中毒菌唐菖蒲伯克霍尔德氏菌及其生物毒素检验鉴定体系的建立》《进口非植物产品携带外来杂草风险评估及检疫监管体系的建立》《基于 SELEX 技术的进境种子中丁香假单胞菌分子检测平台的构建及应用》、国家自然科学基金项目《拉曼光谱技术在植物病原菌检验检疫中的应用》及“十二五”科技支撑项目《植物检疫性昆虫、线虫与杂草 DNA 条形码检测技术研究与应用》等十多项省部级科研项目的主要技术,为更详细地介绍相关技术的发展进程或特点,内容可能会涉及某些仪器的公司或品牌,旨在便于读者更直观地了解仪器的技术特点,而非出于商业目的。

本书是由从事植物检疫鉴定研究一线的工作人员结合自己的实践经验编写而成,适用于高校、科研院所中从事植物保护、植物检疫工作的研究人员及相关仪器开发人员参考和教学使用,希望该书能为读者的研究工作带来一些新知识、新理念的同时提供有益的借鉴。

由于成书时间不长,编者都是利用业余时间辛勤笔耕,加上编写人员水平有限,书中难免有错误和不妥之处,希望读者批评和指正。

编 者

2015 年 7 月于青岛

目 录

CONTENTS

第一章 噬菌体展示技术	001
第一节 噬菌体展示技术的原理	001
一、噬菌体展示技术的基本原理	001
二、噬菌体展示载体的主要类型	003
三、噬菌体抗体库类型	005
四、噬菌体展示技术的优势	005
第二节 噬菌体展示技术的建立	006
一、噬菌体展示技术的建立过程	006
二、噬菌体展示载体的构建	007
三、噬菌体文库的筛选	010
四、大容量抗体库的构建策略	012
五、抗体片段的选择	012
六、抗原的选择	013
第三节 噬菌体展示技术在植物病原生物鉴定中的应用	013
一、噬菌体展示技术在植物病原细菌检测中的应用	013
二、噬菌体展示技术在植物病毒检测中的应用	014
三、噬菌体展示技术在植物病原真菌检测中的应用	015
四、噬菌体展示技术在植物检疫领域的研究与应用	015
五、噬菌体展示技术的应用前景及展望	015
参考文献	017
第二章 环介导等温扩增技术	021
第一节 环介导等温扩增技术的原理	021
一、环介导等温扩增技术概述	021
二、环介导等温扩增技术的改进与深化	025
第二节 环介导等温扩增技术在植物病原生物鉴定中的应用	026
一、环介导等温扩增技术在植物病毒检测中的应用	026



二、环介导等温扩增技术在植物病原真菌检测中的应用	027
三、环介导等温扩增技术在植物病原细菌检测中的应用	027
四、环介导等温扩增技术在植物检疫领域的研究与应用	028
参考文献	029
第三章 基因芯片技术	032
第一节 基因芯片的原理	032
一、基本原理	032
二、基因芯片的种类和实验过程	033
三、基因芯片的数据处理方法	034
第二节 基因芯片技术的应用	038
一、基因芯片技术在植物病原生物鉴定中的应用	038
二、基因芯片技术在植物检疫领域中的研究与应用	039
三、基因芯片技术在其他领域中的应用	040
第三节 问题与展望	044
参考文献	045
第四章 DNA 条形码技术	049
第一节 DNA 条形码技术的原理	049
一、DNA 条形码概述	049
二、DNA 条形码的产生和原理	049
三、DNA 条形码与 DNA 分类	050
四、DNA 条形码基因片段的选择	051
第二节 DNA 条形码技术的建立	051
一、DNA 条形码基因序列的使用	051
二、DNA 条形码的相关争论	053
第三节 DNA 条形码技术在植物病原生物鉴定中的应用	056
一、DNA 条形码技术在植物病原细菌鉴定中的应用	056
二、DNA 条形码技术在植物病毒鉴定中的应用	057
三、DNA 条形码技术在植物病原真菌鉴定中的应用	057
四、DNA 条形码技术在植物寄生线虫鉴定中的应用	058
五、DNA 条形码技术在螨虫及昆虫鉴定中的应用	059
六、DNA 条形码技术在植物检疫领域中的研究与应用	060
七、DNA 条形码技术在检验检疫领域的研究与应用	061
第四节 DNA 条形码技术的不足及展望	065
一、DNA 条形码存在的问题	065

二、传统分类学与 DNA 条形码的关系问题	067
三、DNA 条形码的展望	068
参考文献	068
第五章 焦磷酸测序技术	073
第一节 焦磷酸测序技术的原理	073
一、焦磷酸测序技术简介	073
二、高灵敏度焦磷酸测序反应	074
三、大规模并行焦磷酸测序的实现	075
四、PCR 引物与测序引物的设计对焦磷酸测序结果的影响	076
五、提高焦磷酸测序定量性能的方法	077
六、焦磷酸测序仪的研制	079
七、焦磷酸测序反应模板的制备方法研究	081
八、焦磷酸测序技术的优势	082
第二节 焦磷酸测序技术在植物病原生物鉴定中的应用	083
一、焦磷酸测序技术在植物病原细菌鉴定中的应用	083
二、焦磷酸测序技术在植物病原真菌鉴定中的应用	084
三、焦磷酸测序技术在植物病毒株系鉴定中的应用	084
四、焦磷酸测序技术在植物检疫领域中的应用	084
五、焦磷酸测序技术在其他领域中的应用	085
参考文献	086
第六章 生物传感技术	090
第一节 生物传感技术的原理	090
一、生物传感器的基本概念	090
二、生物传感器的基本组成和工作原理	090
三、生物传感器的分类	092
四、生物传感器的发展阶段	097
五、生物传感器的技术优势	098
第二节 生物传感器技术在植物病原生物鉴定中的应用	098
一、生物传感器在植物病原生物鉴定中的应用	098
二、生物传感技术在植物检疫领域的研究与应用	100
三、生物传感器在其他领域中的应用	100
四、生物传感器的发展趋势和应用前景	102
参考文献	103
第七章 单克隆抗体技术	105
第一节 概述	105

第二节 单克隆抗体技术的原理	106
一、单克隆抗体的概念	106
二、单克隆抗体与多克隆抗体的区别	108
三、杂交瘤技术的诞生	109
四、单克隆抗体的方法原理	110
五、单克隆抗体技术的优缺点	112
第三节 单克隆抗体技术的操作步骤	113
一、单克隆抗体制备的程序	113
二、杂交瘤技术制备单克隆抗体的主要步骤	113
第四节 单克隆抗体技术在植物病原生物鉴定中的应用	127
一、单克隆抗体技术在植物病毒鉴定中的应用及展望	128
二、单克隆抗体技术在植物病原细菌鉴定中的应用及展望	130
三、单克隆抗体技术在植物病原真菌鉴定中的应用及展望	134
四、单克隆抗体技术在植物病原线虫鉴定中的应用及展望	135
五、单克隆抗体技术在螨虫及昆虫鉴定中的应用及展望	136
参考文献	138
第八章 色谱技术	142
第一节 色谱技术的原理	142
一、色谱技术的概念	142
二、色谱技术的种类	143
三、色谱技术的发展	149
第二节 色谱技术在植物病原生物鉴定中的应用	152
一、色谱技术在植物病原细菌鉴定中的应用	152
二、色谱技术在植物病原真菌鉴定中的应用	153
三、新型变性高效液相色谱技术(DHPLC)在植物检疫领域的研究与应用	154
参考文献	154
第九章 基质辅助激光解吸离子-飞行时间质谱技术(MALDI-TOF MS)	
.....	157
第一节 质谱技术的产生和发展	157
一、同位素质谱技术	157
二、快原子轰击质谱技术	158
三、电喷雾质谱技术	158
四、基质辅助激光解吸电离技术	158
五、联用技术	159

第二节 MALDI-TOF MS 的原理与特点	160
一、MALDI-TOF 质谱的构成及工作原理	160
二、MALDI-TOF MS 质谱技术的特点	163
第三节 MALDI-TOF MS 的影响因素	164
一、基质及样品本身	164
二、数据处理及数据库	165
第四节 MALDI-TOF MS 在细菌鉴定中的应用	165
一、质谱用于细菌检测及鉴定的发展历史	165
二、MALDI-TOF MS 技术对细菌鉴定的研究方向	166
三、MALDI-TOF MS 技术在临床微生物鉴定中的应用	167
四、MALDI-TOF MS 技术在植物细菌鉴定方面的应用	173
五、MALDI-TOF MS 技术在植物检疫领域的研究与应用	174
参考文献	174
第十章 光谱技术	181
第一节 光谱技术的原理	181
一、光谱技术的概念	181
二、近红外光谱技术	181
三、拉曼光谱技术	187
四、腔衰荡光谱技术	192
五、紫外光谱技术	193
六、原子荧光光谱技术	194
七、激光诱导击穿光谱技术	194
第二节 光谱技术在植物病原生物鉴定中的应用	194
一、光谱技术在植物病原细菌鉴定中的应用研究	194
二、光谱技术在植物病原真菌鉴定中的应用研究	194
三、光谱技术在植物病毒鉴定中的应用研究	195
参考文献	196
第十一章 菌体脂肪酸分析技术	199
第一节 菌体脂肪酸分析技术的原理	199
一、脂肪酸的特点与分类	199
二、菌体脂肪酸可用于细菌鉴定的原因	201
三、菌体脂肪酸分析的优势	202
四、菌体脂肪酸分析的基本操作	202
五、气相色谱法在菌体脂肪酸分析中的应用	203

第二节 菌体脂肪酸分析技术在植物病原生物鉴定中的应用	205
一、菌体脂肪酸分析技术在植物病原生物鉴定中的应用实例	205
二、植物病原生物脂肪酸分析技术展望	208
参考文献	209
后记	210

第一章 噬菌体展示技术

噬菌体展示技术(phage display technology)最初由美国 Missouri 大学的 George P. Smith 创建,是 20 世纪 90 年代建立和发展的利用噬菌体表达外源基因从而实现基因克隆化的一种重要的分子生物学技术。该技术以噬菌体或噬粒为载体,使外源肽或蛋白基因与噬菌体表面特定蛋白基因在载体表面进行融合表达,进而通过亲和富集法筛选表达有特异肽或蛋白质的噬菌体。

噬菌体展示技术的操作主要是通过几轮“吸附—洗脱—扩增”的淘洗(panning)过程后,将噬菌体展示文库中能与感兴趣的靶分子结合的噬菌体克隆淘洗出来,通过进一步的功能鉴定得到能与靶分子特异结合的噬菌体克隆。根据噬菌体克隆所展示多肽或蛋白与相应编码基因一一对应的关系就可明确与靶分子对应的配体的基因型和表现型特点。

噬菌体展示技术正逐渐发展成为发现具有新功能的多肽和改变已有多肽的性质的强大工具,作为一种基础研究工具,在蛋白质工程和细胞生物学中应用广泛,包括解析蛋白功能、发现受体对应的新配体和新抗体,目前已被广泛应用于细胞信号传导、基因表达调控、人源单克隆抗体的制备、药物筛选和疫苗研制以及疾病的诊断和治疗等研究领域。

第一节 噬菌体展示技术的原理

一、噬菌体展示技术的基本原理

噬菌体展示技术是一种噬菌体表面表达筛选技术,其原理是以噬菌体为载体,将外源核酸片段(一组随机多肽编码序列或基因群)克隆至噬菌体外壳蛋白基因中形成融合,并以融合蛋白的形式表达于噬菌体表面,众多融合型噬菌体便组成了噬菌体展示库。随后,将噬菌体过柱,用固定化的靶分子去筛选与之亲和的噬菌体。通过与特定的靶标反应,不能结合的噬菌体被洗脱掉,而能结合的噬菌体被保留下来并通过感染大肠杆菌得以扩增和富集,实现高通量筛选。

G. P. Smith 最先将限制性内切酶 *EcoR* I 的基因片断插入丝状噬菌体 f1 的衣壳蛋白 gⅢ 中,成功展示于噬菌体表面并表现有限制性内切酶活性。把已有的受体的特异性配基固定于固相表面,对某一噬菌体展示库进行筛选,淘洗掉非特异性重组噬菌体,即所谓的生物淘洗(biopanning),然后解离出锚定于固相表面与特异性配基相结合的特异性重

组噬菌体。展示某一外源肽的重组噬菌体中即含有编码此蛋白的外源插入基因,因此在得到有某一目的功能蛋白的同时,通过对插入 DNA 序列的测定能容易地得到其基因序列,绕过传统的从蛋白测序再到基因克隆的复杂程序。噬菌体表面展示把外源蛋白与噬菌体衣壳蛋白融合表达并展示于噬菌体表面,加上高效的生物淘洗,借助蛋白与基因的对应关系,能迅速地得到目的受体蛋白及其基因序列。因此,噬菌体展示技术能广泛地用于涉及蛋白识别的研究领域。以 M13 噬菌体展示系统为例,噬菌体表面展示流程图见图 1-1。

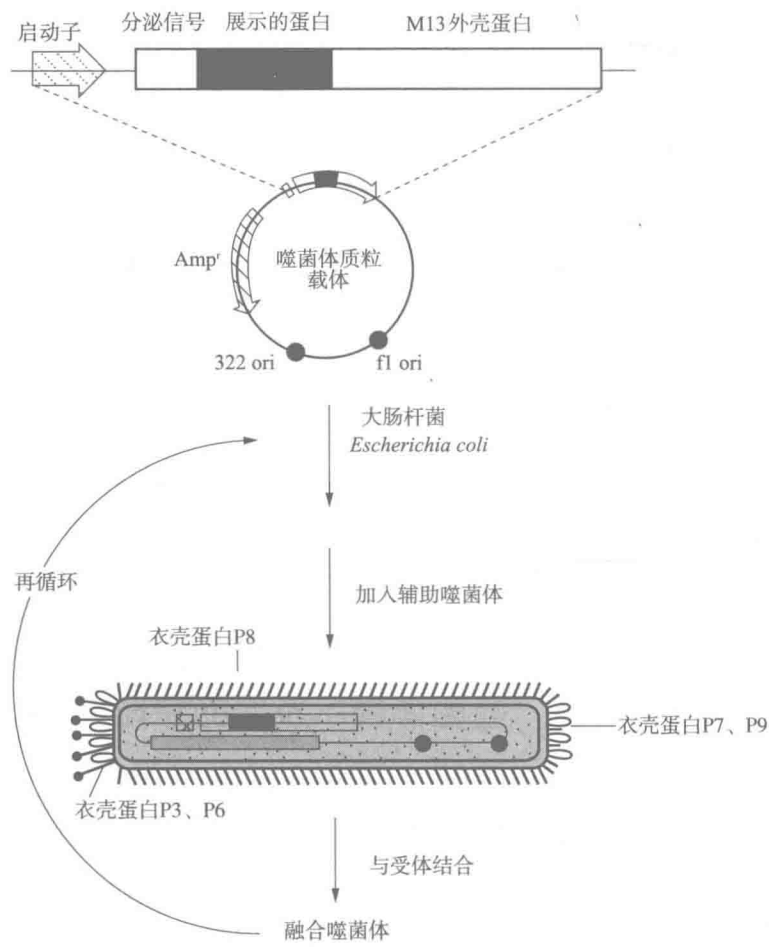


图 1-1 噬菌体表面展示流程图(以 M13 噬菌体展示系统为例)

噬菌体展示技术的显著特点是建立了基因型和表现型之间的对应关系。操作简单易行,该技术采用经典的 PCR 分子克隆等技术即可操作,在几周内即可筛选 $10^6 \sim 10^8$ 克隆,筛选获得抗体库可以用于原核系统表达,无需组织培养,极大地降低了成本。筛选获得噬菌体随机肽库具有容量大、体积小、筛选简便、制备成本低、可多次扩增等突出优点。有学者甚至认为,噬菌体展示文库中的随机多肽库的应用范围仅仅受到人的想像力的限制。

二、噬菌体展示载体的主要类型

噬菌体表面展示一般采用噬菌体载体和噬菌体质粒(phagemid)载体两种。

(一) 噬菌体载体

噬菌体展示技术的一个重要构成是噬菌体载体,有许多种噬菌体可以作为载体运用于噬菌体展示:丝状噬菌体、 λ 噬菌体、T4噬菌体、T7噬菌体。

1. 丝状噬菌体

丝状噬菌体是单链环状 DNA 病毒,包括:M13、fd、f1 噬菌体。其基因组为 6.4 kb,共编码 10 个不同的蛋白质。在丝状噬菌体 10 个蛋白质中,与表面展示有关的蛋白质主要是由基因Ⅲ(g3)和基因Ⅷ(g8)编码的外壳蛋白 gp3 和 gp8,分别可构成 gp3 和 gp8 展示系统。gp3 和 gp8 蛋白的 N 端均游离在外,外源肽通过柔性接头与其 N 端连接,融合蛋白即可展示外源肽段的构象。gp3 和 gp8 融合蛋白的差别在于:①融合外源肽段大小的能力不同。gp3 可融合较大的外源肽段,这是 gp3 展示系统最突出的特点,对外源多肽或蛋白质的大小无严格限制,较长的多肽甚至整个蛋白质都可整合到基因Ⅲ外壳蛋白上,大至 50 ku¹⁾的蛋白质已被成功展示。而 gp8 分子较小,只能融合较小的外源肽段,如五肽或六肽,携带肽段太大会影响外壳的组装。②拷贝数不同。gp3 的拷贝数仅 3~5 个,这可以减少多价结合,故可用于选择高亲和力的配体。gp8 的拷贝数极多(2700 个),制备人工疫苗则以 gp3 作为融合部位更为适宜。丝状噬菌体展示系统是最早开发的展示系统,技术最为成熟,但是该系统展示的多肽或蛋白需要经过细胞膜分泌出来,不利于展示那些难以分泌的肽或蛋白,并且其 N 端可以融合的外源多肽容量有限。

2. λ 噬菌体

λ 噬菌体是最早使用的克隆载体,它在分子克隆中始终起着重要作用。其两端为不闭合的线形双链 DNA,末端为长 12 个核苷酸的互补单链。 λ 噬菌体展示系统是将外源肽或蛋白质与 λ 噬菌体的主要尾部蛋白 PV 或 λ 噬菌体头部组装的必需蛋白 D 蛋白融合而被展示的。与丝状噬菌体比较而言, λ 噬菌体是在宿主细胞内组装后再释放而不必通过分泌途径,因此它可展示的肽或蛋白质范围较广。成熟的 λ 噬菌体颗粒有两个结构单位,即由头部和尾部组成。D 蛋白是 λ 噬菌体头部组装必需的蛋白,也称装饰蛋白,分子质量为 11 ku,有 405 个拷贝。 λ 噬菌体的主要尾部蛋白 PV 形成管状结构,分子质量为 25.8 ku,在衣壳表面有 192 个拷贝。D 蛋白 N 端,PV 蛋白 C 端都可供外源序列插入或替换。这两个基本展示位点属于多拷贝,适合于展示低亲和力的肽或蛋白,可以用来展示大肽,故可用于构建随机引物 cDNA 文库。

3. T4 噬菌体

与 λ 噬菌体一样,T4 噬菌体是在宿主细胞内装配,不需通过分泌途径。因而可展示

1) 1u=1D,1ku=1kD。

各种大小的多肽或蛋白质,很少受到限制。T4 噬菌体载体可以体外组装且系统容量大(35 kb 以上),拷贝数高,在分析抗原表位、细胞因子、受体及生物工程学等方面有相当大的应用潜力。但由于其采用的是 C 端融合,这对研究蛋白质 N 端的功能不适合,而使它在蛋白质生物研究中的应用受到局限。T4 噬菌体展示系统是 20 世纪 90 年代中期建立起来的一种展示系统。它的显著特点是能够将两种性质完全不同的外源多肽或蛋白质,分别与 T4 噬菌体的衣壳蛋白 SOC 和 HOC 的 C 端融合而直接展示于 T4 噬菌体的表面,因此它表达的蛋白不需要复杂的蛋白纯化,避免了因纯化而引起的蛋白质变性和丢失。

4. T7 噬菌体

Houshmand 等在 1999 年建立了以 T7 噬菌体为载体的展示系统。T7 噬菌体衣壳蛋白通常有两种形式,即 10A(344 个氨基酸)和 10B(397 个氨基酸),独特的 10B 衣壳蛋白区存在于噬菌体表面,所以被用作噬菌体展示。T7 噬菌体展示系统的优点有:①T7 噬菌体生长非常迅速,在固体培养基上形成噬菌斑只需 3 h,在菌液中从感染到裂解只需 1 h~2 h,节省了大量时间。②可表达大于 50 个氨基酸的多肽片段而不需辅助噬菌体进行包装。③可高拷贝地表达约 50 个氨基酸的多肽片段或低拷贝地表达 1000 个氨基酸的多肽片段。④T7 噬菌体在高 pH(pH 为 10)、高盐(5 mol/L NaCl)、变性剂(100 mmol/L DTT)等条件下十分稳定,有利于根据不同需要采用多种条件进行筛选而不影响噬菌体本身活性。T7 噬菌体的这些特性使之成为替代其他传统系统的更好选择。

(二) 噬菌体质粒载体

噬菌体质粒中除质粒自身的复制起点和抗药性基因外,还含有噬菌体的一完整的衣壳蛋白(gp3 或 gp8)基因以及噬菌体的基因间隔区(intergenic region, IC),该区含有决定噬菌体 DNA 复制起始、中止和被组装识别的序列。噬菌体自身无编码组装成熟的蛋白,不能独立组装成熟,故需辅助噬菌体的参与。辅助噬菌体含有生命周期所需的全套基因,可提供噬菌体 DNA 复制、组装和感染所需的全部基因产物;但在其基因间隔区插入了 lacZ 片断,使 gp2 蛋白不能对其有效的识别,在有噬菌体质粒存在时噬菌体质粒被优先启动滚环复制,产生 ssDNA 并被组装(一般包装的噬菌体质粒多于辅助噬菌体约 50 倍)。辅助噬菌体编码的正常衣壳蛋白与重组衣壳蛋白竞争组装,因此成熟的噬菌体粒子上既有正常衣壳蛋白又有重组衣壳蛋白,竞争组装的结果使每个噬菌体表面展示平均不到一个融合 gp3 蛋白。

噬菌体载体(见图 1-2)由于不需要辅助噬菌体,所以操作相对而言比较简便。噬菌体载体由于有辅助噬菌体的功能互补,对外源肽的承受能力较大,分子质量高达 50 ku 的蛋白已成功融合表达于 gp3 蛋白。噬菌体载体基因组比较大(大约 9 kb~10 kb),复制效率、转化效率也相对较低,所以获得高质量的载体 DNA 较从噬菌体质粒中获得要更困难。噬菌体质粒由于使用辅助噬菌体能较好地避免以上问题。

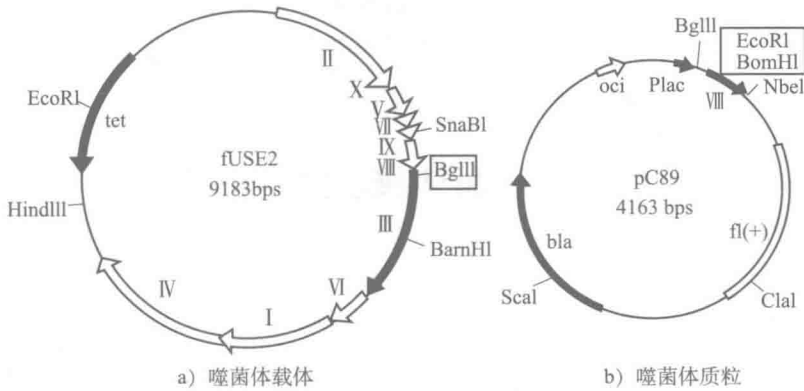


图 1-2 噬菌体展示的两类载体

三、噬菌体抗体库类型

根据抗体基因的来源不同,抗体库可分为天然库、免疫库、半合成库和全合成库。天然库的抗体基因来自非免疫个体 B 细胞的 IgM mRNA,可获得针对各种抗原的抗体。但由于缺乏亲和力成熟的过程,抗体的亲和力较低。免疫库抗体基因来自免疫个体 B 细胞的 IgG mRNA,可获得针对特定免疫原的抗体。半合成库是人工合成的一部分抗体可变区序列与另一部分抗体基因的天然序列组合构建的抗体库。全合成抗体库中的抗体基因全部由人工合成。合成的抗体库由于克服了生物来源抗体库中抗原的多样性具有潜在偏向性的局限,可获得针对各种抗原的特异性抗体,而且合成抗体库的通用性,非常适合自动化操作。合成库含有丰富的针对细胞表面标记物抗原的抗体,而免疫抗体库由于体内的免疫耐受机制,造成针对细胞表面抗原的抗体基因丢失。显然,对于蛋白质组学的研究,天然抗体库和合成抗体库是很好的抗体资源。

四、噬菌体展示技术的优势

噬菌体展示技术属于生物文库技术,所谓分子文库是指一个大量分子的集合体,它们可以是 cDNA 文库、RNA 文库、多肽库、抗体库、蛋白质文库等。不同的分子文库可以通过不同策略构建,然后经过“吸附-洗脱-扩增”的亲亲和筛选过程,高通量、高效率、快速地从浩瀚的分子文库中筛选出与某一特定分子相互作用的配体分子。

噬菌体抗体库和噬菌体展示随机肽库技术是噬菌体展示技术最常用的两种。从人 B 淋巴细胞中扩增全套抗体的轻链和重链基因,经噬菌体表面展示系统表达后形成的噬菌体抗体库,可以完全跨越抗原免疫而直接获得丰富多样的特异性人源抗体。此外,通过噬菌体抗体库技术可以进行抗体亲和力成熟和功能改造。噬菌体随机肽库则是由不同排列的氨基酸组成的多肽展示在噬菌体表面构成的分子文库,它提供了大量的结构与功能信息,只要库容量足够大,几乎任何一种分子都能从肽库中获得与之结合的配体,该技术可以应用于抗原表位分析、分子相互作用研究、疾病诊断、疫苗研制、功能基因组学研究等。