

Phage Display:

A Practical Approach

噬菌体展示： 通用实验指南

[美] 蒂姆·克拉克森 (Tim Clackson) 编
亨利·B·洛曼 (Henry B. Lowman)

马岚 卢帅 李铭 等译

如何计划一个成功的噬菌体展示实验？
噬菌体展示实验所需设备和试剂列表
实验步骤 • 构建噬菌体库 • 进行亲和筛选 • 分析所筛选克隆亲和性
噬菌体展示常规应用



化学工业出版社
生物·医药出版分社

Phage Display :

A Practical Approach

噬菌体展示： 通用实验指南

[美] 蒂姆·克拉克森 (Tim Clackson) 编
亨利·B·洛曼 (Henry B. Lowman)

马岚 卢帅 李铭 等译



化学工业出版社
生物·医药出版分社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

噬菌体展示：通用实验指南/[美] 克拉克森 (Clackson, T.), [美] 洛曼 (Lowman, H. B.) 编; 马岚等译. —北京: 化学工业出版社, 2008. 5

书名原文: Phage Display: A Practical Approach
ISBN 978-7-122-02763-4

I. 噬… II. ①克…②洛…③马… III. 噬菌体
IV. Q939.48

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 061319 号

Phage Display: A Practical Approach/by Tim Clackson, Henry B. Lowman
ISBN 0-19-963873-X

Copyright © Oxford University Press 2004

“Phage Display: A Practical Approach was originally published in English in 2003. This translation is published by arrangement with Oxford University Press and is for sale in the Mainland (part) of the People’s Republic of China only.”

本书中文简体字版由牛津大学出版社授权化学工业出版社独家出版发行, 仅在中国大陆销售。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2006-6049

上架建议: 生物/生物技术

责任编辑: 孟 嘉 郎红旗

文字编辑: 史 懿

责任校对: 宋 玮

装帧设计: 史利平

出版发行: 化学工业出版社 生物·医药出版分社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张 17 字数 397 千字 2008 年 7 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 55.00 元

版权所有 违者必究

译者的话

目前，国内研究者都在相关的领域内广泛运用噬菌体展示技术，其应用涉及各个方面，如抗体工程、蛋白质工程、多肽筛选和新药筛选等，但国内尚无比较系统、详细介绍该技术的中文参考书面世。

《噬菌体展示：通用实验指南》一书吸收了在该研究领域比较先进的实验室的大量经验，内容翔实，具有操作指导性强和参考价值高的特点。本书对噬菌体展示技术进行了较为充分的介绍和探讨，弥补了与噬菌体展示技术相关的发展领域资料的不足，其参考范围广泛，可为广大科研工作者提供更为便捷、快速的文献参考，提高该领域在国内的发展。

《噬菌体展示：通用实验指南》共分 14 章，几乎涵盖了噬菌体展示技术的所有操作相关技术，包括：①噬菌体生物学和噬菌体展示的介绍；②利用核苷酸定点突变或 DNA 重组技术进行展示库的构建及其筛选、筛选克隆的结合特性分析；③实际应用介绍（肽库的配体筛选，噬菌体抗体库的分离和筛选抗体的优化，DNA 结合蛋白的筛选，cDNA 展示库的克隆表达）；④筛选策略的探讨等相关内容。

噬菌体展示技术已广泛应用于生物学、新药筛选和功能基因组学的研究中，对医学临床、疾病诊断和治疗有广泛应用。该技术对鉴定蛋白质的新特性或改变其已有特性有广泛的应用范围，尤其是在基因工程抗体的研究方面为免疫治疗提供了重要研究策略。噬菌体展示技术虽有广泛的应用，但其新的研究领域、研究策略还需进一步提升和改进，该书也对其进行了一定的探讨。

本书适合于研究生和从事噬菌体展示的相关研究人员；从事生物技术和医药研究的基础研究者、临床研究者或药物筛选的研究者；以及相关领域的化学研究者等阅读参考。

在此，我们要感谢每个章节的译者所作出的贡献，以及他们为此所付出的时间和精力。同时，我们还要感谢化学工业出版社的编辑人员对本书的支持。

由于译者水平有限，译文中不妥之处甚至错误在所难免，敬请广大读者批评指正。

马 岚
2008 年 5 月

前 言

将肽段和蛋白展示于丝状噬菌体上（即噬菌体展示技术）是一种能够将所需性质的多肽从大量变异体中提取出来的体外筛选技术。从 1985 年 George Smith 最初开拓性地描述这个概念以来，噬菌体展示技术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。噬菌体展示技术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。在制药工业和生物技术领域，噬菌体展示技术也深受欢迎，现在，由噬菌体展示技术发现或改造的一些蛋白和抗体已经被批准进入临床应用。

尽管应用很广泛，噬菌体展示技术还是由于比较复杂且在技术上具有挑战性，尚不能在大多数主流实验室得以运用。在写《Phage Display: A Practical Approach》这本书时，我们力求使它成为一本通俗易懂的实验指南，进而使这项技术能够在大多数研究者的研究领域内得到最大范围的应用。目的就是为了让它无论对于新手还是老手都能适用。对于刚入行的研究者，关键性的概念和实验步骤在本书中均有详细的描述，章节中也含有与实验设计相关的足够信息，并且很多情况下都有排难解疑的内容。而对于有经验的研究者，本书可以作为噬菌体展示技术的参考书，包括提供一些实验步骤、替代的方案和一些新应用的介绍等进展。

本书的一个特别的目的是为了广泛覆盖噬菌体展示技术的两个最为常见的应用：肽库和抗体库。除了本书中几个章节覆盖到的这些主要的应用外，噬菌体展示技术同时作为一项主要的蛋白质工程工具广泛地应用于蛋白质改造和优化蛋白质功能。另外，噬菌体展示实验中的每个过程（无论是库的构建，筛选，还是对于结果的分析）都可以通过很多途径完成。其中，筛选的过程（即使表达所需性质的多肽或蛋白的噬菌体富集的过程）赋予了很大创造性的，本质上说，只局限于研究者的想象力。我们的目标就是为了让读者能够跳出具体实验步骤的条条框框的限制，而对实验步骤加以改造使之能为自己感兴趣的蛋白或筛选系统服务。

基于此目的，本书以分子生物学的步骤为模式，逐步介绍了噬菌体库的构建、筛选和分析步骤。第 1 章提供了噬菌体生物学和噬菌体技术的概述，目的是让读者对大概的原理、实验策略有个先期的了解，并简单介绍了当着手于噬菌体科研项目时应该如何做出选择。同时，因为提供了具体实验步骤和方法的位置以及列出了在各阶段可替代实验方法，本章也可作为本书其余章节的导航工具。第 2 章和第 3 章接着描述出了两种常见的准备多样化文库的方案：寡核苷酸定向诱导突变和 DNA 改组。第 4 章提供了设计筛选过程的指导和实施亲和筛选的实验步骤。第 5 章描述了一个通过简单的 ELISA 步骤，分析筛选得到的噬菌体克隆亲和性（普遍最为关注的参数）的方法。

接下来的各个章节主要集中在具体应用，包括从肽库中筛选配体（第 6 章），筛选酶底物肽（第 7 章），筛选 DNA 结合蛋白（第 9 章），通过 cDNA 展示克隆（第 12 章）和构建噬菌体抗体库以及抗体优化（第 13 章和第 14 章）。另外一些章节介绍了不同的筛选方法，包括稳定性筛选（第 8 章）、体内定向筛选（第 10 章），以及血清定向结合筛选（第 11 章）。总的来说，这些章节介绍了噬菌体展示技术中已建立或新兴的主要应用，并阐明了这些方法

可能被应用的范围。

总体而言，我们尽量避免重复性描述那些可轻易在不同的载体或系统中使用的实验方案，而是在各个章节中交叉引用共同的实验方案（如电转化大肠杆菌细胞）。但是，在有些情况下，还是包含了不同研究组中所使用的可替代的实验方案，一则是为了说明实验步骤中哪些变化是可能的，二则是为了保持作者实验室中已建立的实验方案的完整性。

我们希望本书能够成为对于所有有志于开发噬菌体展示技术潜能的读者的一本有用的实验工具书。在此，我们要感谢每个章节的作者所作出的卓越贡献，以及他们为此所付出的时间和精力。同时，我们还要感谢牛津大学出版社的编辑人员对本书的支持。

Tim Clackson
Henry B. Lowman

缩略语对照表

A=absorbance	吸光度
A_{xxx} =absorbance at xxx nm	xxx 纳米波长下的吸光度
ABTS=2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	2,2'-连氮基-双 (3-乙基苯并噻吡咯啉-6-磺酸)
Amp ^R =ampicillin or carbenicillin resistance	氨苄青霉素或羧苄青霉素抗性
ANP=atrial naturetic peptide	心房利钠肽
AP=alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
BLAST=basic local alignment search tool	局部同源检索工具
bp=base pair (s)	碱基对
BSA=bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CCC-dsDNA=covalently closed circular double-stranded DNA	共价闭环双链 DNA
CD=circular dichroism	圆二色谱
cDNA=complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
CDR=complementarity determining region	互补决定区
Cfu=colony forming unit (s)	集落形成单位
C_H =heavy chain constant region (of an antibody)	(抗体) 重链恒定区
C_L =light chain constant region (of an antibody)	(抗体) 轻链恒定区
DEPC=diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DMEM=Dulbecco's modified eagle' medium	Dulbecco 修改的 eagle 培养基
DMSO=dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
dNTPs=deoxyribonucleotide triphosphates	脱氧核糖核苷酸三磷酸
DS-Ab=disease-specific antibodies	疾病特异性抗体
dsDNA=double-stranded DNA	双链脱氧核糖核酸
DTT=dithiothreitol	二硫苏糖醇
dU-ssDNA=Uracil-containing single-stranded DNA	含脱氧尿苷单链脱氧核糖核酸
EDTA=ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
EGF=epidermal growth factor	表皮生长因子
ELISA=enzyme-linked immunosorbant assay	酶联免疫吸附实验
EPO=erythropoietin	促红细胞生成素
EST=expressed sequence tag	序列表达标签
Fab=antigen-binding antibody fragment comprising $V_H C_H1$ and $V_L C_L$	包括 $V_H C_H1$ 和 $V_L C_L$ 的抗原结合片段
Fc=constant region of an antibody	抗体恒定区
Ff=family of filamentous <i>E. coli</i> phage comprising f1, M13 and fd	大肠杆菌丝状噬菌体家族, 包括 f1、M13、fd
FR=framework region (of an antibody V_H or V_L domain)	骨架区 (抗体 V_H 或 V_L 结构域)
FVIIa=Factor VIIa	活化凝血因子 VIIa
Hepes= <i>N</i> -[2-hydroxyethyl] piperazine- <i>N'</i> -[2-ethanesulfonic acid]	<i>N</i> -(2-羟乙基) 哌嗪- <i>N'</i> -(2-羟基丙磺酸)

hGH=human growth hormone	人生长激素
HRP=horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IAA=isoamyl alcohol	异戊酯
IAS phage=immunity affinity selected phage	亲和免疫选择的噬菌体
IG=intergenic regions (of Ff phage genome)	基因间隔区 (Ff 噬菌体基因组)
IgG=immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IgM=immunoglobulin M	免疫球蛋白 M
IMAC=immobilized metal ion affinity chromatography	金属螯合层析
IPTG=isopropyl β -D-thiogalactoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
J _H =heavy chain joining fragment	重链连接基因段
Kan=kanamycin	卡那霉素
K _d =dissociation constant	解离常数
k _{off} =dissociation rate constant	解离速率常数
k _{on} =association rate constant	结合速率常数
LB=Luria-Bertani medium	Luria-Bertani 培养基
mAb=monoclonal antibody	单克隆抗体
MBP=maltose binding protein	麦芽糖结合蛋白
MLB=magnesium containing lysis buffer	含镁裂解液
Moi=multiplicity of infection	复染指数
MTA=materials transfer agreement	材料转移协议
MTI=mustard trypsin inhibitor	芥菜胰蛋白酶抑制剂
NHS=N-hydroxysuccinimide	N-羟基丁二酰亚胺
Ni-NTA=nickel-nitrilo-triacetic acid	氮川三乙酸镍
OD=optical density (absorbance)	光密度 (吸光度)
OD _{xxx} =optical density (absorbance) at xxx nm	光密度 (吸光度) 于 xxx 纳米波长下
OPD=o-phenylenediamine	邻苯二胺
P _{III} =filamentous phage minor capsid protein	丝状噬菌体次要衣壳蛋白
P _{VIII} =filamentous phage major capsid protein	丝状噬菌体主要衣壳蛋白
P _{phoA} =alkaline phosphatase promoter	碱性磷酸酶启动子
PAGE=polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBL=peripheral blood lymphocyte (s)	外周血淋巴细胞
PBS=phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR=polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PDB=protein data bank	蛋白质数据库
PEG=polyethylene glycol	聚乙二醇
Pfu=plaque forming unit (s)	空斑形成单位
pNPP=p-nitrophenyl phosphate	对硝基苯磷酸
PS=packaging signal (of Ff phage genome)	(Ff 噬菌体基因组) 包装信号
R=resistance/resistant	抗性
RACE=rapid amplification of cDNA ends	cDNA 末端的快速扩增
RF=replicative form (of Ff phage genome)	(Ff 噬菌体基因组) 复制形式
RPAS=recombinant phage antibody system	重组噬菌体抗体系统
RT=room temperature	室温
RU=resonance units	共振单位

scFv= single-chain Fv ($V_H + V_L$) antibody fragment	单链抗体 Fv ($V_H + V_L$) 段
SDS= sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SDS-PAGE= SDS polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
SH3= Src homology 3	Src 同源结构域 3
SPR= surface plasmon resonance	表面等离子共振
ssDNA= single-stranded DNA	单链脱氧核糖核酸
StEP= staggered extension process	交叉延伸过程
Tet ^R = tetracycline resistance	四环素抗性
TF= tissue factor	组织因子
TMB= 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
TU= transducing unit (s)	转导单位
UV= ultraviolet	紫外线
V-gene= antibody variable region gene	抗体可变区基因
V_H = heavy chain variable region (of an antibody)	(抗体) 重链可变区
V_L = light chain variable region (of an antibody)	(抗体) 轻链可变区
Wt= wild type	野生型
Wt-UBQ-phage= wild-type ubiquitin-phage	野生型泛素噬菌体
X-gal= 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside	5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷

编写者名录

Frances H. Arnold

Division of Chemistry and Chemical
Engineering, 210-41
California Institute of Technology
1200 East California Boulevard
Pasadena, CA 91125, USA
E-mail: frances@cheme.caltech.edu

Marcus D. Ballinger

Sunesis Pharmaceuticals Inc.
341 Oyster Point Boulevard
South San Francisco, CA 94080, USA
E-mail: ballinger@sunesis.com

Michele Bernasconi

The Burnham Institute and Program
in Molecular Pathology
Department of Pathology
University of California San Diego
School of Medicine
10901 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, USA
E-mail: mbernasconi@burnham.org

Andrew R.M. Bradbury

Biosciences Division
Los Alamos National Laboratory
Los Alamos, New Mexico, USA
and
International School for
Advanced Studies (SISSA)
Via Beirut 2-4
Trieste 34012, Italy
E-mail: amb@lanl.gov

Yen Choo

MRC Laboratory of Molecular Biology
Hills Road
Cambridge CB2 2QH, UK
Present address:
Plasticell Ltd.
10 Sydney Street
London SW3 6pp, UK
E-mail: yen@plasticell.com

Tim Clackson

ARIAD Pharmaceuticals, Inc.
26 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139, USA
E-mail: clackson@ariad.com

Riccardo Cortese

Istituto di Ricerche di
Biologia Molecolare
P. Angeletti (IRBM)
Via Pontina km 30,6
00040 Pomezia (Rome), Italy
E-mail: riccardo_cortese@merck.com

Brian C. Cunningham

Sunesis Pharmaceuticals Inc.
341 Oyster Point Boulevard
South San Francisco, CA 94080, USA
E-mail: bcc@sunesis.com

Steven E. Cwirla

XenoPort, Inc.
3410 Central Expressway
Santa Clara, CA 95051, USA
E-mail: scwirla@xenoport.com

Warren L. DeLano

Sunesis Pharmaceuticals Inc.
341 Oyster Point Boulevard
South San Francisco, CA 94080, USA
E-mail: warren@sunesis.com

Mark S. Dennis

Department of Protein Engineering
Genentech Inc.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, USA
E-mail: msd@gene.com

William J. Dower

XenoPort, Inc.
3410 Central Expressway
Santa Clara, CA 95051, USA
E-mail: bdower@xenoport.com

Michael D. Finucane

Centre for Biomolecular Design and

Drug Development
School of Biological Sciences
Biology Building
University of Sussex
Falmer, Brighton BN1 9QG, UK
Present address:
Department of Molecular Pharmacology
Center for Clinical Sciences
Research
Stanford University, CA 94305, USA
E-mail: mikef@stanford.edu

Marc Fransen
Katholieke Universiteit Leuven
Faculteit Geneeskunde
Campus Gasthuisberg
Departement Moleculaire
Celbiologie
Afdeling Farmacologie
Herestraat 49, B-3000 Leuven, Belgium
E-mail:
marc.fransen@med.kuleuven.ac.be

Christian M. Gates
Amersham Biosciences
800 Centennial Avenue
Piscataway, NJ 08855, USA

Jason A. Hoffman
The Burnham Institute and Program
in Molecular Pathology
Department of Pathology
University of California San Diego
School of Medicine
10901 N. Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, USA
E-mail: jhoffman@burnham.org
and
Program in Molecular Pathology
Department of Pathology
University of California
San Diego School of Medicine

Mark Isalan
MRC Laboratory of Molecular Biology
Hills Road
Cambridge CB2 2QH, UK
Present address:
European Molecular Biology
Laboratory (EMBL)
Meyerohofstrasse 1
Heidelberg 69117
Germany

E-mail: mark.isalan@embl-heidelberg.de

Laurent Jaspers
MRC Laboratory of Molecular Biology
Hills Road
Cambridge CB2 2QH, UK
E-mail: lsj@mrc-lmb.cam.ac.uk

Pirjo Laakkonen
The Burnham Institute and Program
in Molecular Pathology
Department of Pathology
University of California San Diego
School of Medicine
10901 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, USA
E-mail: plaakkonen@burnham.org

Henry B. Lowman
Department of Protein Engineering
Genentech, Inc.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, USA
E-mail: hbl@gene.com

James D. Marks
Departments of Anesthesiology and
Pharmaceutical Chemistry
University of California, San Francisco
Rm 3C-38, San Francisco General
Hospital
1001 Potrero
San Francisco, CA 94110, USA
E-mail: marksj@anesthesia.ucsf.edu

David J. Matthews
Exelixis Inc.
170 Harbor Way
South San Francisco, CA 94083, USA
E-mail: matthews@exelixis.com

Kentaro Miyazaki
Division of Chemistry and Chemical
Engineering, 210-41
California Institute of Technology
1200 East California Boulevard
Pasadena, CA 91125, USA
Present address:
National Institute of Bioscience and
Human
Technology
1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki
305-8566, Japan
E-mail: miyaken@nih.go.jp

Paolo Monaci

Istituto di Ricerche di Biologia
Molecolare
P. Angeletti (IRBM)
Via Pontina km 30,6
00040 Pomezia (Rome), Italy
E-mail: paolo_monaci@merck.com

Ulrik Nielsen

Departments of Anesthesiology and
Pharmaceutical Chemistry
University of California, San Francisco
Rm 3C-38, San Francisco General
Hospital
1001 Potrero
San Francisco, CA 94110, USA
E-mail: nielsenu@anesthesia.ucsf.edu

Kimmo Porkka

The Burnham Institute and Program
in Molecular Pathology
Department of Pathology
University of California San Diego
School of Medicine
10901 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, USA
E-mail: kporkka@burnham.org

Erkki Ruoslahti

The Burnham Institute and Program in
Molecular Pathology
Department of Pathology
University of California San Diego
School of Medicine
10901 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, USA
E-mail: ruoslahti@burnham.org

Marjorie Russel

The Rockefeller University
1230 York Avenue
New York, NY 10021, USA
E-mail:
russelm@rockvax.rockefeller.edu

Peter J. Schatz

Affymax Inc.
4001 Miranda Avenue
Palo Alto, CA 94304, USA
E-mail: Peter_Schatz@affymax.com

Sachdev S. Sidhu

Department of Protein Engineering
Genentech, Inc.

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080, USA
E-mail: sidhu@gene.com

Mihriban Tuna

Centre for Biomolecular Design and
Drug Development
School of Biological Sciences
Biology Building
University of Sussex
Falmer, Brighton BN1 9QG, UK
E-mail: m.tuna@susx.ac.uk

Natalie G. M. Vlachakis

Centre for Biomolecular Design and
Drug Development
School of Biological Sciences
Biology Building
University of Sussex
Falmer, Brighton BN1 9QG, UK
E-mail: nataliev@biols.susx.ac.uk

Christopher R. Wagstrom

Affymax Inc.
4001 Miranda Avenue
Palo Alto,
CA 94304, USA
Present address:
Zyomyx, Inc.
26101 Research Road
Hayward,
CA 94545, USA
E-mail: cwagstrom@zyomyx.com

Gregory A. Weiss

Department of Protein Engineering
Genentech, Inc.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, USA
Present address:
516 Rowland Hall
Department of Chemistry
University of California
Irvine, CA 92697-2025, USA
E-mail: gweiss@uci.edu

Derek N. Woolfson

Centre for Biomolecular Design and
Drug Development
School of Biological Sciences
Biology Building
University of Sussex
Falmer, Brighton BN1 9QG, UK
E-mail: dek@biols.susx.ac.uk

实验方案目录

着手一个噬菌体展示项目

实验方案 1.1 滴定及增殖噬菌斑纯化的丝状噬菌体	12
---------------------------------	----

文库的构建和保存

实验方案 2.1 dU-ssDNA 模板的分离	25
实验方案 2.2 噬菌体文库的构建	27
实验方案 2.3 大肠杆菌的电转化和噬菌体的繁殖	29
实验方案 2.4 噬菌体展示文库的再增殖	30

生物试剂

实验方案 2.5 感受态大肠杆菌 SS320 的制备	31
实验方案 2.6 制备辅助噬菌体储液	32

体外 DNA 重组的方法

实验方案 3.1 DNA 改组	36
实验方案 3.2 DNA 的随机片段化	37
实验方案 3.3 随机引物重组	39
实验方案 3.4 StEP DNA 重组	40
实验方案 3.5 异源双链重组：异源双链质粒	41
实验方案 3.6 异源双链重组：异源双链插入片段	41
实验方案 3.7 使用尿嘧啶 DNA 糖基化酶对含有尿嘧啶的 DNA 去污染	44

载体的考虑

实验方案 4.1 用大肠杆菌 XL1-blue 菌株制备噬菌体	50
---------------------------------------	----

靶标的呈递

实验方案 4.2 靶标的包被及噬菌体的结合	54
实验方案 4.3 噬菌体结合的 ELISA 检测	56

筛选

实验方案 4.4 噬菌体结合筛选、洗涤及洗脱	58
实验方案 4.5 富集度的监测	59

分析前的鉴定

实验方案 4.6	噬菌体克隆鉴定	61
噬菌体结合性检测的进行		
实验方案 5.1	靶标包被的微孔板的准备	68
实验方案 5.2	固定化的包被试剂和加入的噬菌体的滴定	69
实验方案 5.3	噬菌体结合性检测	70
构建 pλ噬菌粒随机肽库		
实验方案 6.1	构建 p λ 噬菌粒库：载体的准备	77
实验方案 6.2	构建 p λ 噬菌粒库：插入片的准备	77
实验方案 6.3	构建 p λ 噬菌粒库：连接插入片段与 <i>Bst</i> XI 消化的 p8V5 载体	79
实验方案 6.4	构建 p λ 噬菌粒库：扩增与储存	80
筛选 pλ噬菌粒库		
实验方案 6.5	筛选 p λ 噬菌粒库：亲和筛选	82
实验方案 6.6	筛选 p λ 噬菌粒库：所筛选噬菌体的扩增	82
鉴定所获取的克隆		
实验方案 6.7	筛选 p λ 噬菌粒库：通过噬菌体 ELISA 鉴定得到的噬菌体克隆	83
冠状二聚体库的亲和筛选		
实验方案 6.8	冠状二聚体系统展示的肽复合物的亲和筛选	86
底物筛选程序		
实验方案 7.1	底物噬菌体筛选	93
筛选出的序列的鉴定		
实验方案 7.2	AP 融合蛋白的构建和测定	98
一般步骤及一个特例——从一个具有疏水性核心的突变体文库中筛选稳定的泛素变异性		
实验方案 8.1	用循环 PCR 来组装双链的简并诱变寡核苷酸	105
实验方案 8.2	黏末端定向的突变生成随机化文库	107
实验方案 8.3	电转化和噬菌粒文库的储存，甘油保种的制备以及筛选所需的噬菌体的制备	108
实验方案 8.4	用 SPR 对蛋白-噬菌体复合体单克隆的蛋白酶解的监测	112
实验方案 8.5	使用 Ni-NTA 琼脂糖珠的基于蛋白酶的噬菌体文库筛选	114
噬菌体文库卡匣的构建		
实验方案 9.1	文库卡匣的构建	120

噬菌体载体的制备及文库的构建

实验方案 9.2 噬菌体载体 DNA 的预处理及结合蛋白库的克隆	122
--	-----

噬菌体的筛选

实验方案 9.3 噬菌体 DNA/RNA 结合性筛选的标准程序	124
---------------------------------------	-----

对筛选出的噬菌体克隆的分析

实验方案 9.4 借助于噬菌体 ELISA 的 DNA/RNA 结合活性的分析	126
---	-----

筛选过程

实验方案 10.1 活体筛选	131
实验方案 10.2 体外筛选	135

单个噬菌体的鉴定

实验方案 10.3 插入区域的 PCR 扩增	138
实验方案 10.4 PCR 产物的测序	139
实验方案 10.5 在石蜡包埋的组织上进行免疫组化	141
实验方案 10.6 在新冷冻的组织上进行免疫荧光	142
实验方案 10.7 荧光标记多肽的注射以及血管通过体内凝集素染色的显现	144

噬菌体文库的构建

实验方案 11.1 构建基于 pⅢ 和 pⅦ的天然表位文库 (HCV 基因组)	148
---	-----

结合血清抗体的噬菌体展示肽的筛选

实验方案 11.2 用于噬菌体感染的细菌细胞 (TB 细胞) 的制备	149
实验方案 11.3 UV 灭活载体噬菌体的制备	149
实验方案 11.4 用抗人抗体包被微珠	150
实验方案 11.5 文库的筛选	151
实验方案 11.6 扩增来自淘洗的噬菌体群落	152

筛选单个克隆

实验方案 11.7 用于噬菌体展示文库的菌落试验	154
实验方案 11.8 基于 DNA 的筛选	157

已选择克隆的鉴定

实验方案 11.9 小规模制备噬菌体上清	159
实验方案 11.10 用噬菌体上清和人血清进行 ELISA	160
实验方案 11.11 用人血清进行噬菌体 ELISA	161
实验方案 11.12 大量制备噬菌粒克隆	162
实验方案 11.13 与噬菌体展示的多肽反应的血清抗体的亲和纯化	162
实验方案 11.14 交叉抑制实验	163

实验方案 11.15	PCR 扩增的模板	164
表位成熟		
实验方案 11.16	表位成熟	166
在基于 g_{VI} 的展示载体中克隆 cDNA 文库		
实验方案 12.1	从预制的 λ GT11 文库中制备 cDNA 插入片段	173
实验方案 12.2	大规模连接及纯化连接后的 DNA	175
实验方案 12.3	Top10F' 细胞中的电转化及文库储存	176
g_{VI}-cDNA 融合噬菌体亲和选择		
实验方案 12.4	g_{VI} -cDNA 噬菌粒文库的获取和纯化	177
实验方案 12.5	使用生物素抗原来选择 g_{VI} -cDNA 噬菌体文库	179
实验方案 12.6	用免疫亲和和反应选择 g_{VI} -cDNA 噬菌体文库	180
对选择出的克隆进行分析		
实验方案 12.7	g_{VI} -cDNA 噬菌粒文库小规模获取和纯化	181
实验方案 12.8	噬菌体 ELISA	182
噬菌体抗体文库构建		
实验方案 13.1	从外周血淋巴细胞 (PBLs) 中分离 RNA	195
实验方案 13.2	cDNA 第一链的合成	196
实验方案 13.3	从 cDNA 第一链中扩增 V_H 和 V_L 基因	197
实验方案 13.4	制备 scFv 接头 DNA	199
实验方案 13.5	用 scFv 接头 PCR 装配 V_H 和 V_L 进行 scFv 基因文库的构建	200
实验方案 13.6	再扩增 scFv 基因文库以添加限制性位点进行克隆	201
实验方案 13.7	对 scFv 基因文库及 pHEN1 噬菌体展示载体的限制性消化	201
实验方案 13.8	scFv 和载体 DNA 的连接	202
实验方案 13.9	电感受态大肠杆菌 TG1 的制备	203
实验方案 13.10	电转化连接物及构建抗体文库	204
制备用于抗原上选择的噬菌体抗体		
实验方案 13.11	自文库甘油储存料中制备噬菌体抗体	206
实验方案 13.12	用氯化铯离心法纯化噬菌体	208
从噬菌体文库中选择抗原特异性抗体		
实验方案 13.13	在固相抗原上选择噬菌体抗体	210
实验方案 13.14	用可溶性生物素化抗原进行选择	211
识别鉴定抗原结合性抗体		
实验方案 13.15	在微量滴定板中表达噬菌体抗体	213

实验方案 13.16	噬菌体抗体 ELISA	214
实验方案 13.17	在微量滴定板中表达可溶性 scFv	215
实验方案 13.18	在微量滴定板中进行可溶性 scFv ELISA	216
实验方案 13.19	用 PCR 识别不同的噬菌体抗体克隆	217

在哪里又如何对抗体基因序列进行多样化

实验方案 14.1	用突变的 V_L CDR3 构建 scFv 基因文库	225
实验方案 14.2	再扩增 scFv V_L CDR3 基因文库添加 3' 限制性位点	226
实验方案 14.3	连接 scFv 和载体 DNA 并转化大肠杆菌, 构建 scFv 突变文库	227
实验方案 14.4	V_H CDR3 基因文库和 V_L 基因的扩增	228
实验方案 14.5	PCR 剪接 V_H CDR3 基因文库和 V_L 基因构建 scFv 基因文库	229
实验方案 14.6	构建人 V_H 基因节段文库	232
实验方案 14.7	再扩增 V_H 基因文库添加 3' 限制性位点并克隆创建 V_H 基因节段文库	233
实验方案 14.8	创建重链改组噬菌体文库	234
实验方案 14.9	人 V_L 基因文库的构建	236
实验方案 14.10	创建轻链改组噬菌体文库	237

选择和筛选亲和力更高的抗体

实验方案 14.11	平衡法选择高亲和力噬菌体抗体	238
------------	----------------------	-----

筛选解离速率优化的 scFv

实验方案 14.12	用 Biacore 仪筛选解离速率较低的 scFv	240
------------	---------------------------------	-----