

国家“十一五”重点图书出版项目
——生物医学实验技术系列丛书

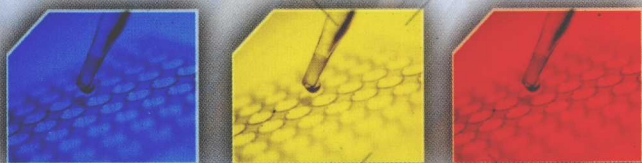
SHENGWU WENKU JISHU

生物文库技术

— 噬菌体展示与SELEX技术

—SHIJUNTI ZHANSHI YU SELEX JISHU—

主编 © 邵宁生 杨光 房涛



军事医学科学出版社

中国科学院图书馆
中国科学院图书馆

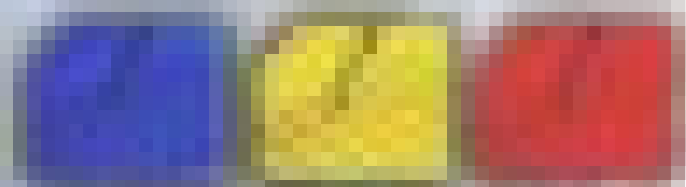
中国科学院图书馆
中国科学院图书馆

生物文库技术

—— 细胞培养与基因工程技术

中国科学院图书馆
中国科学院图书馆

中国科学院图书馆
中国科学院图书馆



国家十一五重点图书出版项目

生物医学实验技术丛书

生物文库技术

——噬菌体展示与 SELEX 技术

主 编 邵宁生 杨 光 房 涛

副主编 李少华 谢剑炜 薛沿宁 柳 川 董 洁 高 波

编 委 (按姓氏拼音顺序)

曹国军 曹晓晓 陈留存 丁红梅

冯健男 高亚萍 郭 磊 黄 欣

李 洁 刘农乐 刘雪梅 黎 燕

刘朝晖 吕 明 乔春霞 唐吉军

王成龙 王 芳 辛忠涛 徐 华

余 涛 张朝阳 张 杰 赵 安

赵 强

军事医学科学出版社

·北 京·

图书在版编目(CIP)数据

生物文库技术——噬菌体展示与 SELEX 技术/邵宁生,杨光,

房涛主编. —北京:军事医学科学出版社,2008.06

(生物医学实验技术丛书)

ISBN 978-7-80245-069-1 I. ①生… II. ①邵…

②杨… ③房… III. ①生物检验 IV. ①R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 020325 号

出 版:军事医学科学出版社

地 址:北京市海淀区太平路 27 号

邮 编:100850

联系电话:发行部:(010)66931051,66931049

81858195

编辑部:(010)66931127,66931039,66931038,

86702759,86703183

传 真:(010)63801284

网 址:<http://www.mmsp.cn>

印 装:中煤涿州制图印刷厂北京分厂

发 行:新华书店

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:10

字 数:170 千字

版 次:2011 年 10 月第 1 版

印 次:2011 年 10 月第 1 次

定 价:28.00 元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

生物医学实验技术丛书编委会

主任委员 房 涛 杨瑞馥 邵宁生
副主任委员 王天有 雷二庆 刘殿荣 董晓杰 高 波 许金廉
委 员 (按姓氏笔划排列)
王恒樑 王 勇 孙志伟 吴 军
应晓敏 李少华 李伍举 李永纲
杨 光 张贺秋 徐东刚 徐 池
葛学铭 董 洁

利其器 善其事

(代丛书总序)

人类对世界本质和规律的探求,集中体现在探求“物质之理”、“生命之理”和“心灵之理”等三个方面。对“理”(科学)的探求,离不开对“器”(技术)的掌握。在普遍意义上,技术^①是在一定的自然和社会环境中,用于实现输入集和目标集之间有向转换的可操作程序。简言之,技术是人类知识积累的自然过程和必由之路,是人类生存与文明进步的台阶与扶梯。人类历史表明,技术的发展常常是理论突破的先导。

在生命科学领域,生物技术起着同样重要的作用。1665年,R. Hook(罗伯特·虎克)之所以能够发现细胞,正是凭借着他鹤立鸡群的光学显微镜技术。诺贝尔奖获得者 Linus Pauling(刘易斯·鲍林)所完善的X射线晶体衍射技术,帮助 Watson(沃森)和 Crick(克里克)发现了DNA双螺旋结构,从而奠定了现代分子生物学的坚实基础,而该技术成功地标识出了构成核糖体的成千上万个原子,在半个世纪以后,将 Venkatraman Ramakrishnan(文卡特拉曼·拉马克里斯南)等三人送上了诺贝尔奖的领奖台。自1973年S. Cohen(科恩)等人首次实现DNA的体外重组以来,基因工程技术为人类认识“生命之理”提供了一把“金钥匙”。基于对生物技术重要性的认识,在2006年发布的《国家中长期科学和技术发展纲要(2006—2020年)》中,国家将生物技术作为科学技术发展的战略重点。

工欲善其事,必先利其器。所谓“事”,在科学研究上讲就是工作、目标(科学发现);所谓“器”,就是成此事的工具(技术)。因此,非常有必要认真学习和掌握先进的生物技术,并准确、熟练地运用以揭示“生命之理”。然而,许多学者为了保持技术的领先和垄断,在文章和论著中

^①李喜先. 技术系统论,北京:科学出版社,2005:1-4

对自己的成功经验有所保留,只写理论不写经验,客观存在的学术壁垒现象使得一些新的生物技术不能得到很好的普及和应用。

本套丛书的编者均来自科研一线,在研究实践中积累了丰富的经验。他们毫无保留地将当前生物医学领域重要的蛋白质分离与纯化技术、抗体技术、胶体金制备技术、酶联免疫斑点技术、噬菌体表面展示技术、SELEX 技术、计算机辅助实验设计等的技术诀窍奉献给了读者。

我相信,这套生物技术丛书一定能够为推动我国生命科学发展做出大的贡献。



军事医学科学院 院 长
中国科学院 院 士
2011 年 10 月

序

噬菌体展示技术和 SELEX 技术都属于生物文库技术,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最常用的二种,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,该技术主要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。

SELEX 技术是指指数级富集的配体系统进化,是一种新的组合化学技术,它是应用大容量的随机寡核苷酸库,结合 PCR 体外扩增技术,以指数级富集与靶分子特异结合的寡核苷酸,经过几轮筛选,获得高亲和力、高特异性的寡核苷酸配基(aptamer)。由于文库中的寡核苷酸序列能形成多种空间结构,因此 SELEX 技术可选择的靶分子范围十分广泛,包括蛋白、多肽、核酸、氨基糖苷、有机染料、氨基酸、金属离子等。在基础研究方面,SELEX 技术可直接应用于生命进化的研究,如利用随机 RNA 文库可以筛选出核酶的特异寡核苷酸配基及其剪切位点,发现新的核酶序列。在临床诊断、体内造影方面 SELEX 技术也发挥了重要作用,由于寡核苷酸配基的高特异性和高亲和力,因此比蛋白质试剂具有更高的灵敏度。利用 SELEX 技术筛选药物或先导化合物是该技术的主要应用范围,目前已在抗病毒、肿瘤、炎症性疾病方面取得了可喜的成绩。

基于噬菌体展示技术和 SELEX 技术的广泛应用,该书从技术角度较详细地介绍了操作方法,由于参与该书编写的人员均为在一线工作的科技人员,在具体操作中有许多切身体会和经验,可使读者在了解一般原理的基础上,能按书中介绍的方法进行操作,并获得满意结果。为了使读者更深入地了解这些技术的应用,书中还列举了一些成功的实例,因此,该书对从事相关研究的科技工作者、在读大学生和研究生顺利掌握实验技能将有很大帮助。

沈信奋

军事医学科学院 研究员

中国工程院 院士

2011 年 10 月

前言

噬菌体展示技术和 SELEX 技术是生物文库技术中最常用的两种技术。

噬菌体展示技术是将外源蛋白的基因型与表型联系在一起,通过筛选可以将展示特异性外源蛋白多肽的噬菌体从表达有各种外源蛋白的噬菌体库中筛选出来,经扩增可以得到上千倍乃至 10^8 倍的富集。获得的靶(分)子特异结合肽在拮抗肽筛选、抗体抗原表位鉴定方面十分有用。

SELEX 技术是应用大容量的人工合成随机寡核苷酸库,结合 PCR 体外扩增技术,以指数级富集与靶(分)子特异结合的寡核苷酸适配体(aptamer)的方法。由于获得的 aptamer 具有高特异性、高亲和力,在特异分子标志物筛选及靶标发现方面具有独到优势。目前,噬菌体展示和 SELEX 技术已经广泛应用于基础研究、药物筛选、疫苗及诊断试剂的研制等方面,具有很好的应用前景。

本书作者经过多年努力,建立和改良了多种噬菌体展示和 SELEX 技术平台,并利用上述技术平台开展了针对感染、炎症、肿瘤和生物毒素等方面的新型诊断或治疗药物以及基础方面的研究,取得了良好的结果。此书是根据作者实际工作经验,结合具体筛选实例编写而成,特别编入作者的经验借鉴与注意事项,为读者提供了较详尽的参考技术路线和具体操作方法,尽量使具有一定生物化学和分子生物学实验基础的科技人员能够快速掌握噬菌体展示和 SELEX 技术。

参与本书编写的作者大多为一线年轻科技人员,虽然实践经验丰富,但是水平有限,文中会有诸多不足之处,敬请读者指正。

邵宁生

2011 年 9 月

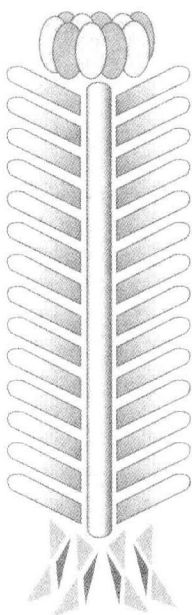
目 录

上篇 噬菌体表面展示技术原理及其操作指南

第 1 章 概述	(3)
一、噬菌体表面展示随机肽库	(3)
二、噬菌体抗体库	(7)
三、噬菌体表面展示技术筛选原理和基本方法	(11)
四、噬菌体表面展示技术的应用	(12)
第 2 章 噬菌体表面展示肽库技术操作指南	(17)
一、试剂	(17)
二、实验步骤	(18)
三、影响筛选的因素	(21)
四、结果判断和分析	(24)
第 3 章 噬菌体肽库构建及筛选实例	(26)
实例 1 基于昆虫防御素 A 蛋白分子的噬菌体展示构象肽库的构建	(26)
实例 2 重组 hTNF- α 结合肽的筛选	(31)
实例 3 马抗 SARS-CoV 多抗抗原表位的筛选	(36)
第 4 章 噬菌体抗体库技术操作指南	(47)
一、试剂	(47)
二、实验步骤	(48)
三、影响筛选的因素	(53)
第 5 章 噬菌体抗体库构建及筛选实例	(55)
一、引物	(56)
二、淋巴细胞总 RNA 的提取及 VH 和 VL 基因的扩增	(57)
三、初级噬菌体抗体库的构建	(57)
四、通过 Cre-loxP 位点特异性重组构建大容量噬菌体抗体库	(58)
五、噬菌体抗体库的筛选	(59)
六、噬菌体抗体的鉴定及序列分析	(60)

下篇 SELEX 技术原理及其操作指南

第 1 章 概述	(63)
一、SELEX 技术的基本技术路线	(63)
二、SELEX 筛选的特点	(66)
三、SELEX 的应用	(67)
四、适配子的改造	(71)
第 2 章 SELEX 技术操作指南	(75)
一、试剂与设备	(75)
二、文库/文库模板和引物的设计与合成	(76)
三、RNA 文库的获得(PCR、体外转录与 RNA 回收)	(79)
四、文库与靶分子孵育	(82)
五、结合寡核苷酸分子的分离	(83)
六、反转录	(86)
七、PCR	(87)
八、下一轮筛选文库的制备	(88)
九、重复筛选	(90)
十、筛选后获得的特异 aptamer 的分析	(90)
第 3 章 SELEX 技术筛选实例	(93)
实例 1 牛凝血酶特异的 RNA aptamer 的筛选	(93)
实例 2 CE-SELEX 筛选技术	(103)
实例 3 亲和层析 SELEX 筛选促红细胞生成素适配体及基于分子 信标检测方法的建立	(111)
实例 4 亲和层析 SELEX 筛选相思子毒素适配体及其在分析检测中的应用	(117)
实例 5 以完整细胞为靶的消减 SELEX 筛选	(123)
实例 6 肿瘤组织切片-SELEX 技术筛选临床标本分子探针	(132)
实例 7 组合 aptamer 用于金黄色葡萄球菌检测的研究	(140)



第1章 概述

- 一、噬菌体表面展示随机肽库
- 二、噬菌体抗体库
- 三、噬菌体表面展示技术筛选原理和基本方法
- 四、噬菌体表面展示技术的应用

第2章 噬菌体表面展示肽库技术操作指南

- 一、试剂
- 二、实验步骤
- 三、影响筛选的因素
- 四、结果判断和分析

第3章 噬菌体肽库构建及筛选实例

- 实例1 基于昆虫防御素A蛋白分子的噬菌体展示构象肽库的构建
- 实例2 重组hTNF- α 结合肽的筛选
- 实例3 马抗SARS-CoV多抗抗原表位的筛选

第4章 噬菌体抗体库技术操作指南

- 一、试剂
- 二、实验步骤
- 三、影响筛选的因素

第5章 噬菌体抗体库构建及筛选实例

- 一、引物
- 二、淋巴细胞总RNA的提取及VH和VL基因的扩增
- 三、初级噬菌体抗体库的构建
- 四、通过Cre-loxP位点特异性重组构建大容量噬菌体抗体库
- 五、噬菌体抗体库的筛选
- 六、噬菌体抗体的鉴定及序列分析

第 1 章

概 述

生命活动中生物信息的传递和生物功能的实现都离不开分子和分子之间的相互作用,而这种作用起始于分子间的识别。分子识别的物质基础在于分子结构,如 A 分子和 B、C 分子可以结合,而不与 D、E 或其他分子结合,说明分子间的识别和相互作用是具有特异性和专一性的。三维空间结构的特异性是这一特性的结构基础。B、C 分子能和 A 分子相互识别并相互作用,提示两者至少具有相似的局部三维空间特异结构,它们与 A 分子的某一局部三维空间结构相匹配或互补,导致分子间的相互识别和作用。

从浩瀚的生物分子海洋中寻找或筛选出与某一特定生物分子相互作用的配体分子,没有高通量高效率的筛选方法几乎是难以完成的。如果能建立一个分子文库,它的容量足够大,包含各种各样的局部三维空间结构的分子,同时应用高效低耗的快速筛选技术从该文库中获得与目的分子相匹配或互补的分子,那么寻找目的分子的配体、揭示配体结构规律的研究将从海底捞针样的艰难中解脱出来。20 世纪 80 年代中期以来,各种生物文库技术的出现,为高通量、高效率及低成本筛选配体分子提供了新的技术手段,其中噬菌体展示技术是最有效的方法之一。

本篇就噬菌体表面展示随机肽库和噬菌体抗体库、筛选方法和应用实例做较为详细的描述,以期从事这方面研究的科研人员提供参考。

一、噬菌体表面展示随机肽库

顾名思义,噬菌体表面展示随机肽库(Phage-Displayed Peptide Library)是指将不同排列氨基酸组成的具有各种各样局部三维空间结构的多肽分别展示在噬菌体表面所构成的分子文库。噬菌体表面展示随机肽库常常根据大小、结构和特殊要求进行分类。如根据随机区段长短的不同分为 6、9、12

生物文库:一个大量分子的集合体,包括 cDNA 文库、RNA 文库、多肽库、抗体库、蛋白质文库等。

噬菌体表面展示技术的特点:

1. 高通量:可从 10 个“噬菌体克隆中筛选出与靶分子特异结合的配体分子。
2. 高效率:可在一周内完成筛选工作,获得目的序列。
3. 低成本:对仪器、试剂无特殊需要。

等随机肽库;根据结构不同分为线性和非线性肽库(非线性肽库也称为构象肽库,最简单的是环 7 肽库,复杂的如抗体库等);依据特殊目的构建的肽库,如某些偏性肽库、突变肽库等。由于多肽序列是随机构成的,因此又称为噬菌体展示随机肽库。它是巧妙地利用噬菌体的基因复制、转录、蛋白表达和感染扩增等生活周期特性,结合基因重组技术得以实现的,所以说它是微生物学和分子生物学技术进步的结晶。

噬菌体表面展示随机肽库 { 大小:六肽库/九肽库/十二肽库
结构:线性/非线性
特殊的:偏性肽库/突变肽库等

下面就相关背景知识和噬菌体表面展示随机肽库的构建、分类等以丝状噬菌体衣壳蛋白 P3 和 P8 展示的随机肽库为例简介如下。

1. 丝状噬菌体的组成和结构

长丝状的噬菌体由衣壳蛋白包裹基因组 DNA 构成,直径约 6 nm,长 1 μm。其基因组是一个单链环状正链 DNA,长约 6407 个核苷酸,共有 11 个基因,编码 11 个蛋白质。衣壳蛋白有 5 个,分别为 P3、P6、P7、P8 和 P9;其余 5 个蛋白与表面展示无关(表 1)。P8 为主要衣壳蛋白,约有 2 700 个拷贝,它们围绕基因组 DNA 螺旋排列呈长管状,构成噬菌体体身。其他为次要衣壳蛋白,P3、P6 位于一端,P7、P9 位于另一端,它们各自的拷贝数均不超过 5。5 种衣壳蛋白均可用于表面展示外源肽段或蛋白(图 1)。

表 1 M13 基因及其编码蛋白

基因	编码蛋白功能	氨基酸	分子量
II	DNA 复制	410	46137
X	DNA 复制	111	12672
V	结合 ssDNA	87	9682
VIII	主要衣壳蛋白	50	5235
III	次要衣壳蛋白	406	42522
VI	次要衣壳蛋白	112	12342
VII	次要衣壳蛋白	33	3599
IX	次要衣壳蛋白	32	3650
I	噬菌体组装	348	39502
IV	噬菌体组装	405	43476
XI	噬菌体组装	108	12424

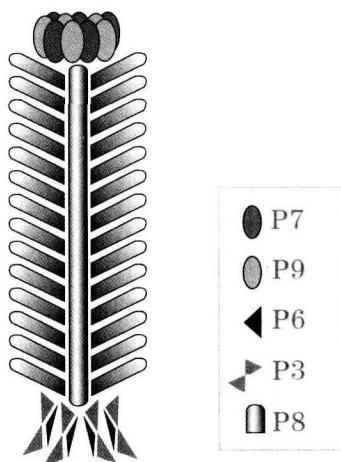


图1 丝状噬菌体外壳蛋白结构示意图

2. 外源蛋白在丝状噬菌体的表达

目前外源多肽主要展示在 P3 和 P8 上。P3 是衣壳蛋白中分子最大的,分子量约 40 kDa,由 406 个氨基酸残基构成。其 C 端为疏水区,锚定在外壳上,N 端游离在外。P3 蛋白包含多次重复的-SGG-或-SGGG-序列,使其空间结构具有易变性和灵活性。实验已证实,其 N 端可以插入大片段外源蛋白而一般情况不影响噬菌体结构和功能。P8 蛋白较小,由 50 个氨基酸残基组成。其 C 端主要含碱性氨基酸残基,易与 DNA 结合;中间区域为疏水区形成噬菌体外壳;N 端游离,外露于噬菌体表面,一般在 N 端可以插入 5~6 个氨基酸残基的外源肽段。P3 和 P8 蛋白展示系统有各自特点,应根据需要选择使用。

3. 丝状噬菌体展示系统类型

编码 P3 和 P8 蛋白的基因 III 和 VIII 在丝状噬菌体单链 DNA 基因组中均只有一个拷贝。将外源基因插入基因 III 和 VIII 时,全部 P3 和 P8 蛋白都会融合展示外源肽段或蛋白,这样常常会影响 P3 和 P8 蛋白的功能,即影响丝状噬菌体感染大肠杆菌或噬菌体组装的能力,有时会造成噬菌体扩增困难。解决方法有两种,一是在基因组中既含有重组基因又保留野生基因,这样展示的 P3 或 P8 蛋白只有部分是融合外源肽段或蛋白的,不影响噬菌体的扩增;二是采用辅助噬菌体或噬菌粒同时感染宿主菌。前者带有野生基因 III 和 VIII 及复制、组装需要的基因,后者带有重组基因。这样产生的子代辅助噬菌体

的 P3 或 P8 蛋白也只有部分是融合外源肽段或蛋白的,所以也不会影响噬菌体的扩增。

4. 噬菌体随机肽库的构建

(1) 编码随机序列寡核苷酸的设计

构建随机肽库是将编码随机排列氨基酸残基的 DNA 片段按读码框架插入基因Ⅲ或Ⅷ,使每个噬菌体的 P3 或 P8 蛋白的 N 端展示不同的外源肽段。编码随机排列氨基酸残基的 DNA 片段通常是合成获得的。最初合成时采用 NNN(N 代表 A、G、C、T 四种核苷酸出现的机会均等)方式,即在单链 DNA 合成延伸中三联密码子的每个位点加入 A、G、C 和 T 的等量混合物。这样得到完全随机排列的寡核苷酸序列,理论上也可以获得随机排列的肽序列。但是观察表明,这种方法出现终止密码子和某些氨基酸偏性的概率较高。于是有人根据密码子简并原理设计了 NNK(K 代表 G 和 T 出现机会均等)和 NNS(S 代表 G 和 C 出现机会均等)方式。这种方法明显降低了密码子的偏性和终止密码子的数目。如 NNK 方式会产生 32 个三联密码子,编码 20 个天然氨基酸和一个 TAG 终止密码子(表 2)。虽然仍存在某些氨基酸一定程度的偏性现象,但是获得了显著的改进。

表 2 NNK 密码子编码表

		第二位置					
		T	C	A	G		
第一位置	T	Phe(F)	Ser(S)	Tyr(Y)	Cys(C)	T	第三位置
		Leu(L)	Ser(S)	Gln(Q)	Trp(W)	G	
	C	Leu(L)	Pro(P)	His(H)	Arg(R)	T	
		Leu(L)	Pro(P)	Gln(Q)	Arg(R)	G	
	A	Ile(I)	Thr(T)	Asn(N)	Ser(S)	T	
		Met(M)	Thr(T)	Lys(K)	Arg(R)	G	
	G	Val(V)	Ala(A)	Asp(D)	Gly(G)	T	
		Val(V)	Ala(A)	Glu(E)	Gly(G)	G	

(2) 基因插入与融合表达

采用基因重组技术,在相应载体(如 fUSE5 等)克隆位点将含随机序列的双链寡核苷酸片段插入,然后转化细菌获得噬菌体展示的原始库。其细节请参阅“噬菌体肽库构建及筛选实例”(见第 3 章)。