

## 噬菌体抗体文库淘选

### 1.主要实验仪器

表1 实验所用主要仪器

仪器名称	型号/厂家
高速冷冻离心机	Neofuge 15R
生物安全柜	Heal Force
电热恒温水浴锅	HHW21.600AII
恒温培养箱	Heal force
振荡培养箱	ZCZY-AS8
自动细胞计数仪	Count Star

### 2.主要试剂和耗材

表2主要试剂及其生产公司

试剂名称	货号	Manufactures
96-well plate	42592	Costar
Tween 20	P2287	Sigma
Tris	RES3098T-B7	Sigma
Glycine	G8200	Solarbio
PEG	181986	Sigma
PBS	C10010500BT	Life
Casein Na salt	S12003-100g	shyuanye
Skim milk	6342932	BD

### 3.实验内容

#### 3.1 3~4轮文库淘选（免疫管固相淘选）

(1) 包被免疫管：抗原蛋白（40-50 ug/ml，缓冲液 CBS/PBS），500ul每管，共2管，4℃过夜。对照管加入500 ul PBS。

(2) 5ml PBST洗涤免疫管3次。

(3) 5ml 5%脱脂牛奶/PBST 30℃封闭1h。

(4) 5ml PBS洗涤1次。

(5) 每管中加入500 ul， $10^{11}$ - $10^{12}$  pfu的文库噬菌体（或者上一轮的扩增噬菌体），30℃ 孵育2 h。

(6) 5 ml PBST洗涤4-6次(后几轮可根据富集程度增加洗涤次数)。

(7) 每管中加入500 ul的Gly-HCl (pH=2.2) 洗脱噬菌体，室温振荡孵育6-8 min左右。加入120-130 ul的Tris-HCl(pH=9.6)中和溶液至pH=7.0-8.0。

(8) 将洗脱后的噬菌体稀释后，侵染对数期的大肠杆菌TG1，铺板测定滴度。

### 3.2 洗脱噬菌体的扩增

- (1) 吸取洗脱后的噬菌体，加入到对数期的大肠杆菌TG1菌液中，37°C 静置30 min后，220 rpm培养30 min-1 h。
- (2) 培养基中加入抗生素Amp，37°C，220 rpm培养至菌液OD=0.4-0.6左右。
- (3) 在菌液中加入辅助噬菌体。37°C静置30 min后，220 rpm培养45 min-1 h。
- (4) 3000-5000 rpm离心菌液，弃上清。用同等体积2YT-Amp-Kan 培养基重悬菌体。30°C，220 rpm培养过夜。
- (5) 次日，8000 rpm，4°C，20 min 离心菌液，将上清转入新的离心管中。加入1/4体积的5\*PEG/NaCl 溶液。充分混匀后，放置冰上或者4°C，静置1-2 h。
- (6) 8000 rpm，4°C，离心30 min，弃上清。沉淀用1ml左右PBS重悬。8000 rpm，离心10 min，将上清转入到新的离心管中。
- (7) 将扩增后噬菌体稀释，侵染对数期的TG1，铺板测定滴度。

### 3.3 免疫管淘选（第2轮到第4轮）

使用扩增后的噬菌体进行第二轮淘选，步骤同3.1和3.2，如此重复3到4轮淘选。

表3 每轮淘选条件

轮数	包被抗原浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	封闭缓冲液	洗脱次数	洗脱产物体积( $\mu\text{l}$ )
1	筛选原蛋白 (50)	1% Casein/PBST	5	800
2	筛选原蛋白 (50)	5% milk/PBST	5	700
3	筛选原蛋白 (50)	1% Casein/PBST	5	600
4	筛选原蛋白 (50)	1% Casein/PBST	5	500

### 3.4 多克隆噬菌体 ELISA检测

- (1) 包被免疫板：抗原蛋白（2-4  $\mu\text{g/ml}$ ，缓冲液CBS/PBS），100  $\mu\text{l}$ ，4°C过夜。对照孔包被100  $\mu\text{l}$  PBS。
- (2) 300  $\mu\text{l}$  PBST洗涤3次。
- (3) 300  $\mu\text{l}$  5%脱脂牛奶/PBST 30°C封闭1h，300  $\mu\text{l}$  PBST洗涤2-3次。
- (4) 用PBS稀释每一轮扩增后的噬菌体，稀释倍数3倍递增。初始浓度为 $10^{12}$  pfu/ml。每孔中加入100  $\mu\text{l}$ 稀释后的扩增噬菌体。30°C孵育1 h，300  $\mu\text{l}$  PBST洗涤4-6次。
- (5) 加入100 $\mu\text{l}$ 二抗（抗噬菌体M13）稀释液，30°C孵育1h，300  $\mu\text{l}$  PBST洗涤4-6次。
- (6) 加入100  $\mu\text{l}$ 显色液TMB避光显色3-8 min，加入100  $\mu\text{l}$  2M HCl终止反应，酶标仪读数（450 nm-620 nm）。

### 3.5 单克隆ELISA验证

- (1) 选取合适的轮数，将其洗脱噬菌体稀释到合适的浓度，侵染对数期的TG1，铺板。

- (2) 次日，从板上挑取96个（或更多）单克隆，接入96深孔板 37°C 250 rpm振荡培养至菌液OD=0.4-0.6。
- (3) 在96深孔板培养基中加入辅助噬菌体。37°C静置30 min，250 rpm，37°C振荡培养45 min-1 h。
- (4) 将96深孔板，4000 rpm离心5 min，弃上清。每孔用2YT-Amp-Kan 培养基重悬菌液，30°C，250 rpm，振荡培养过夜。
- (5) 次日，将96深孔板4000 rpm离心10-15 min，取上清进行ELISA实验。
- (6) 包被免疫板：抗原蛋白（2-4 ug/ml，缓冲液 CBS/PBS），100 ul，4°C过夜。对照孔包被100 ul PBS。
- (7) 300 ul PBST洗涤3次。
- (8) 300 ul 5%脱脂牛奶/PBST 30°C封闭1 h。300 ul PBST洗涤2-3次。
- (9) 每孔中加入100 ul 噬菌体上清液。30°C孵育1h。300 ul PBST洗涤4-6次。
- (10) 加入100 ul二抗（抗M13）稀释液，30°C孵育1 h，300 ul PBST洗涤4-6次。
- (11) 加入100 ul显色液TMB避光显色3-8 min，加入100 ul 2M HCl终止反应，酶标仪读数（450 nm-620 nm）。

### 3.6 对阳性克隆进行validated ELISA验证

将单克隆筛选获得的阳性克隆进行测序后，去除双峰序列和重复序列获得最终的阳性克隆，阳性克隆按照3.5步骤进行二次ELISA检测验证，确保阳性结果的真实性。

### 3.7 测序。

The end



• 一站式蛋白抗体发现服务

重组蛋白·抗体·噬菌体文库·诊断原料

—— 武汉国家生物产业基地·光谷抗体发现与筛选公共服务平台 ——