

兔scFV噬菌体抗体文库构建

1.主要试剂和耗材

表1 主要试剂及其生产公司

试剂名称	货号	厂家
HiScript® III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)	R312-02	Vazyme
Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase	P505-d3	Vazyme
2×T5 Super PCR Mix	TSE005	TSINGKE
FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit	DC301	Vazyme
FastPure Plasmid Mini Kit	DC201	Vazyme
DL2000 DNA marker	TSJ011-500	TSINGKE
1 kb DNA Ladder	TSJ102-100	TSINGKE
T4 DNA Ligase	EL0011	Thermo
FastDigest	-	Thermo
Vector	-	AtaGenix
M13KO7 helper phage	N0315S	NEB

2.文库构建

2.1 蛋白质检

SDS-PAGE鉴定蛋白纯度（要求大于90%）；Bradford鉴定蛋白浓度(要求大于1mg/ml)；

2.2动物免疫

免疫新西兰大白兔，检测效价，效价达标后采血：

免疫时间	质量 (mg/只)	体积 (ul)	佐剂 (ul)	总体积 (ul)	免疫方案
1免 (Day1)	0.25 mg	500	500	1000	2点皮内 , 3点皮 下
2免 (Day15)	0.25 mg	500	500	1000	
3免 (Day25)	0.25 mg	500	500	1000	
4免 (Day30)	0.25 mg	500	500	1000	
5免 (Day37)	0.25 mg	500	500	1000	
6免 (Day44)	0.25 mg	500	500	1000	

2.3总RNA提取，反转录成cDNA

- (1) 将-80°C保存的PBMCs（用Trizol裂解）常温下解冻，每1 ml加入1/5体积的氯仿，震荡15s静置5 min。
- (2) 12000 rpm，4°C离心15 min，取上清加入等体积异丙醇，上下颠倒混匀静置10 min。
- (3) 12000 rpm，4°C离心10 min，弃上清，缓慢加入75%乙醇，轻轻上下颠倒洗涤。
- (4) 12000 rpm，4°C离心5 min，弃上清。

(5) 超净台室温干燥2-5 min，加入适量RNase-free水溶解。取出2 μl跑胶，再取出2 μl测浓度。

(6) cDNA合成

RNA	Use Random hexamers	Use Oligo(dT)20VN
RNA	5 μg	5 μg
ddH ₂ O	To 8 μl	To 8 μl
65°C, 5 min, 4°C, 2 min		
5x gDNA wiper Mix	2 μl	2 μl
42°C, 2 min		
10*RT Mix	2 μl	2 μl
HiScript III Enzyme Mix	2 μl	2 μl
Oligo(dT)20 VN or Random hexamers	1 μl	1 μl
ddH ₂ O	5 μl	5 μl
程序设定	25°C, 5 min, 37°C, 45 min, 85°C, 5s	37°C, 45 min, 85°C, 5s
总体积	20 μl	20 μl

2.4 可变区片段扩增并克隆至 M13 噬菌粒载体

PCR 反应体系	PCR过程	条件
2×Phant Max 缓冲液	25 μl	预变性 95 °C, 3 min
DNA 聚合酶	1 μl	变性 95 °C, 15 s
dNTP Mix	1 μl	退火 56 °C, 15 s
cDNA	2 μl	延伸 72 °C, 20 s
正向引物	2 μl	延伸 72 °C, 5 min
反向引物	2 μl	储存 4 °C, 保持
ddH ₂ O	Up to 50 μl	

2.4.1 轻链库构建

- (1) 将扩增后的轻链可变区片段切胶回收（350-450bp）。
- (2) 将PCR获得的V_K, V_λ片段以及pATA-scFv-2质粒37度，5h双酶切（NheI + NotI），切胶回收片段及酶切载体。

- (2) 将酶切片段及载体进行连接。
- (4) 将连接产物电转化至TG1感受态中，梯度稀释复苏菌液测库容量，剩余菌液涂布平板
- (5) 将平板上菌液刮下后，提取质粒用于构建重链库。

2.4.2完整ScFv文库构建

- (1) 将扩增后的重链可变区片段切胶回收（350-450bp）。
- (2) 将PCR获得的VH片段及轻链库质粒用sfI和XhoI双酶切，切胶回收片段及酶切载体。
- (3) 将酶切片段及载体进行连接。
- (4) 将连接产物电转化至TG1感受态中，梯度稀释复苏菌液测库容量，剩余菌液涂布平板。
- (5) 将平板上菌液刮下后，取70%的菌液加入甘油（甘油终浓度在15%-25%之间），分装10 OD或20 OD等菌液一管-80 °C保存。其余30%的菌液提取质粒。

2.5 转化 TG1 构建噬菌体文库，文库库容 $\geq 1 \times 10^8$ cfu;

2.6 至少对 96 个单克隆进行菌落 PCR 分析，对不少于 48 个克隆进行测序分析。

从相应文库转化后的平板上挑取48-96个克隆，于96深孔板中培养4h左右，取菌液进行PCR，剩余菌液保种，送测序。根据PCR结果分析抗体片段的插入正确率。测序得到的序列在数据库里（IMGT、Vbase2）进行分析。

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