

Code NO. PDS 27-9401-01

Ver 2.2

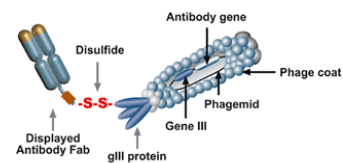
pCANTAB5e 噬菌体展示系统

pCANTAB5e Phgedisplay System For Recombinant Antibody

& Recombinant Protein Expression

北京宝科维食安生物技术有限公司 www.bio-viewchina.com

注意: 本制品仅供实验室研究使用。请勿用于人体及动物的治疗、
临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂等。



目 录

内容	页码
系统说明	2
系统内容	2
保存温度	3
操作方法	4
使用注意	4
TG1 菌株	5
HB2151 菌株	6
载体参考序列	7

北京宝科维食安生物技术有限公司 www.bio-viewshine.com

噬菌体展示系统说明书

【系统说明】

本系统是用于抗体基因表达，制备重组抗体。宿主菌 TG1 为质粒载体 pCANTAB5e 复制和表达的宿主菌，无抗性，用 2×YT 培养基，37℃ 进行培养。载体 pCANTAB5e 为用于构建重组单链抗体 scFv 的载体，具有氨苄抗性，大小为 4522bp，具体图谱及酶切位点如下示。辅助噬菌体 M13K07 用于拯救噬菌粒，具有卡那抗性，在其辅助下噬菌粒得以复制，并以融合的形式表达在噬菌体表面。在 scFv 基因后面含有一段编码 Tag 尾肽（E-Tag）的序列，在尾肽后面有一琥珀（Amber）终止密码子，位于 scFv 基因与 cpIII 基因之间，在抑制型细菌 TG1 中，这种琥珀密码子只有 20% 有效，故在蛋白翻译过程中可以通读而形成 scFv-cpIII 融合蛋白；但在非抑制型菌株中，如 HB2151，此终止子被识别，同时 scFv 基因在翻译过程中在 cpIII 基因前终止，形成独立的抗体蛋白，滞留于细胞膜间隙，并在长时间培养后泄漏在培养液中，形成可溶性表达。

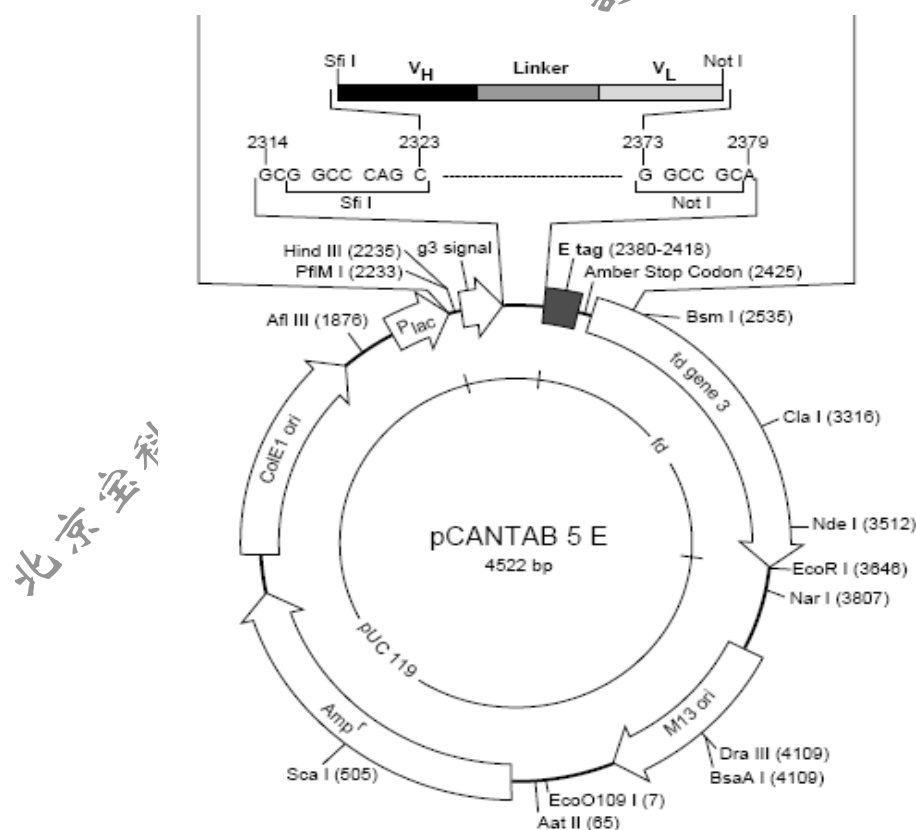
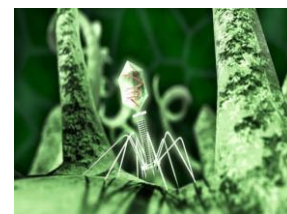


图 1 pCANTAB5e 噬菌粒载体图谱



pCANTAB 5 E map on previous page

图 2 pCANTAB5e 部分载体序列

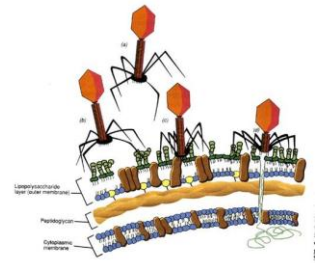
【系统内容】

- 融合表达宿主菌 TG1 (15%甘油保存);
- 噬菌粒载体 pCANTAB5e (DNA 溶于 TE Buffer, 浓度 50ng/ul);
- 辅助噬菌体 M13K07 (滴度为 1.2×10^{12} pfu/ml);
- 可溶性表达宿主菌 HB2151 (15%甘油保存)。

【保存温度】

噬菌粒载体、宿主菌保存于 -20℃。

辅助噬菌体请存放在 4℃ 即可, 不可冻存。



【操作方法】

1. 辅助噬菌体毒种制备

- 1) 将辅助噬菌体 M13K07 划线于 2×YT 琼脂平板上;
- 2) 制备 2×YT 半固体琼脂 (0.7% 琼脂) 为上层琼脂 (Top Agar), 冷却至 50 °C 时, 取 4 mL Top Agar 并加入 0.5 mL 过夜培养的新鲜 TG1 菌 (OD₆₆₀ 达 0.8), 充分混匀, 沿着划线浓度从低至高的方向, 倾注 Top Agar;
- 3) 37 °C 培养 6-12 小时, 用接种针挑取单个噬菌斑, 接种于 30-200 mL 2×YT-K (kanamycin 70 µg/mL), 37 °C 充分振荡培养 10-14 小时;
- 4) 8000 rpm 离心 15 min, 4 °C;
- 5) 小心取上清, 建议用 0.45µm 滤膜过滤后, 分装无菌小管, 存放 4 °C 至少可用半年。

2. 噬菌体毒种的滴定

- 1) 准备不含任何抗生素的 2×YT 培养平板 5-6 个;
- 2) 用 2×YT 培养基配制 0.7% 琼脂平板, 即为表层琼脂 (Top Agar), 冷却至 42 °C 并在 42 °C 恒温保存;
- 3) 将上述噬菌体溶液用培养基做 10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰ 稀释;
- 4) 取过夜培养的 TG1 菌液 (OD₆₆₀=1 左右), 分装小试管, 500µL / 小试管, 标明 10⁻⁶ 至 10⁻¹⁰ 稀释度;

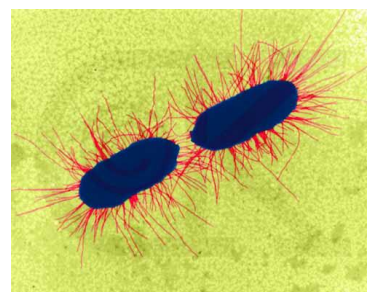
备注: 宿主菌的制备请参照 TG1 菌株说明书进行。

- 5) 加入以上步骤 3 中依次稀释的噬菌体 100µL 到每个相应的标准稀释度的试管中, 充分混匀, 37 °C 轻柔振荡反应 30 min;
- 6) 加入 Top Agar 3 mL 至每个试管中, 立即浇注事先准备好的平皿, 37 °C 培养过夜;
- 7) 计算平皿上的空斑数, 乘于相应稀释倍数, 一般浓度可达 10¹² pfu/mL。

【注意事项】

1. 噬菌体毒种, 在使用前应按以上推荐的方法进行浓度滴定;
2. 噬菌体毒种存放在 4 °C 下即可, 不可 -20 °C 或更低温度冻存;

TG1 菌株 说明书



菌株名称: *E. coli* TG1 Cells

规格: 200 μ L/管

状态: 15%甘油保存

性质参数: *K12 (lac-pro), supE, thi, hsd5/F'[traD36, proAB, lacIq, lacZ M15]*.

建议:

1. 菌株在发货之前已经经过严格的确证，质量有保障；
2. 菌株保存在15%甘油的培养基中，接到菌株后，请挑取菌液在2x YT平板上划线，37 $^{\circ}$ C过夜培养后，再次挑取单个菌落在Minimal Medium 平板上划线，37 $^{\circ}$ C过夜培养后即可使用，以便使纤毛充分表达，利于噬菌体感染；
3. 在Minimal Medium 平板上生长的细菌，不宜在冰箱中放置过久再使用；
4. Minimal Medium plate配制方法：

Prepare stocks of the following:

1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: Dissolve 20.33 g in distilled water to a final volume of 100 ml and autoclave.

1 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Dissolve 14.7 g in distilled water to a final volume of 100 ml and autoclave.

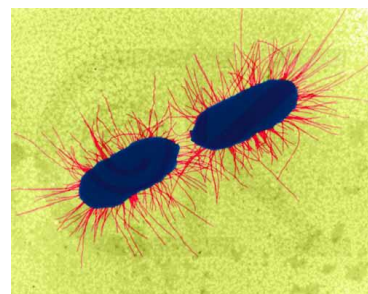
1 M thiamine hydrochloride: Dissolve 33.73 g in distilled water to a final volume of 100 ml and sterilize using a 0.22 μ m filter.

20% glucose: Dissolve 20 g of D-(+)-glucose (anhydrous) in distilled water to a final volume of 100 ml and sterilize by filtration through a 0.2 μ m filter. Do not autoclave.

In a 500 ml bottle, dissolve 6 g of Na_2HPO_4 (dibasic), 3 g of KH_2PO_4 (monobasic) and 1 g of NH_4Cl in distilled water to a final volume of 500 ml. adjust the pH to 7.4 with NaOH.

In a separate 1 liter bottle, add distilled water to 15 g of Bacto-agar to a final Volume of 500 ml. Autoclave both bottles simultaneously to sterilize. Cool both bottles to 50-60 $^{\circ}$ C and combine. Add 1 ml of 1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 ml of 1 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 ml of 1 M thiamine hydrochloride and 5 ml of 20% glucose. Pour plates immediately.

HB2151 菌株 说明书



菌株名称: *E. coli* HB2151 Cells

规格: 200 μ L/管

状态: 15%甘油保存

性质参数: K12 (lac-pro), ara, nalr, thi/F'[proAB, lacIq, lacZ M15].

建议:

1. 菌株在发货之前已经经过严格的确证，质量有保障；
2. 菌株保存在15%甘油的培养基中，接到菌株后，请挑取菌液在2x YT-N平板（2x YT medium containing 100 μ g/ml nalidixic acid）上划线，37 $^{\circ}$ C过夜培养后，再次挑取单个菌落在Minimal Medium 平板上划线，37 $^{\circ}$ C过夜培养后即可使用，以便使纤毛充分表达，利于噬菌体感染；
3. 在Minimal Medium 平板上生长的细菌，不宜在冰箱中放置过久再使用；
4. Minimal Medium plate 配制方法：

Prepare stocks of the following:

1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: Dissolve 20.33 g in distilled water to a final volume of 100 ml and autoclave.

1 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Dissolve 14.7 g in distilled water to a final volume of 100 ml and autoclave.

1 M thiamine hydrochloride: Dissolve 33.73 g in distilled water to a final volume of 100 ml and sterilize using a 0.22 μ m filter.

20% glucose: Dissolve 20 g of D-(+)-glucose (anhydrous) in distilled water to a final volume of 100 ml and sterilize by filtration through a 0.2 μ m filter. Do not autoclave.

In a 500 ml bottle, dissolve 6 g of Na_2HPO_4 (dibasic), 3 g of KH_2PO_4 (monobasic) and 1 g of NH_4Cl in distilled water to a final volume of 500 ml. adjust the pH to 7.4 with NaOH.

In a separate 1 liter bottle, add distilled water to 15 g of Bacto-agar to a final Volume of 500 ml. Autoclave both bottles simultaneously to sterilize. Cool both bottles to 50-60 $^{\circ}$ C and combine. Add 1 ml of 1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 ml of 1 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 ml of 1 M thiamine hydrochloride and 5 ml of 20% glucose. Pour plates immediately.

pCANTAB5e 载体的序列介绍（仅作参考）

具体序列请登录<http://www.bio-viewshine.com>下载。

北京宝科维食安生物技术有限公司 www.bio-viewshine.com

Bio-View Shine™

北京宝科维食安生物技术有限公司

BIO -VIEW SHINE BIOTECHNOLOGY (Beijing) CO. LTD.

地址：北京市海淀区知春路 51 号慎昌大厦

网址：www.bio-viewshine.com

技术支持：+86 181 4650 1320

E-mail: service@bio-viewshine.com

For research use only