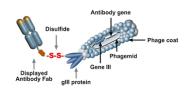
pCANTAB5e 噬菌体展示系统 pCANTAB5e Phgedisplay System For Recombinant Antibady & Recombinant Protein Expression Antibady Antibady

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 系统内容 保存温度 操作方法 使用注意 TG1 菌株 HB2151 菌株	2 2 3 4 4 5 6:0
内容 系统说明 系统内容 保存方法 使用注意 TG1 菌株 HB2151 菌株 载体参考序列	IN TOOL
海海	

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 cplll 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-cplll 融合蛋白;但在非抑制型菌株中,如 HB2151,此终止了被识别,同时 scFv 基因在翻译过程中在 cplll 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。

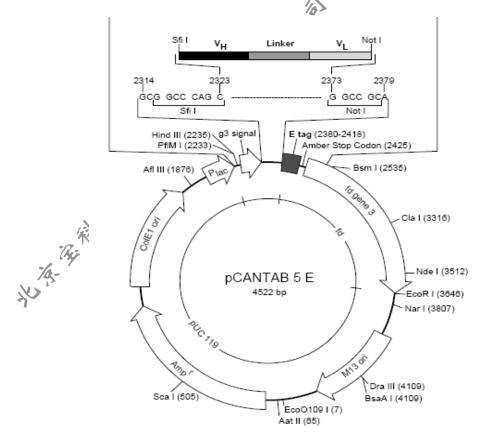


图 1 pCANTAB5e 噬菌粒载体图谱



2218 pCANTAB5-R1
5' ATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTTGGAGATTTT
3' TACTGGTACTAATGCGGTTCGAAACCTCGGAAAAAAAACCTCTAAAA
pCANTAB5-S1
CAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTCCTTTCTAT
GTTGCACTTTTTTAATAATAAGCGTTAAGGAAATCAACAAGGAAAGATA
2314 Sfi I
GCGGCCCAGCCGGCCNNNNNNGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCG
CGCCGGGTCGGCCGGNNNNNNCCCCGGTTCCGTGGTGCCAGTGGC
VH
pCANTAB5-S3
TCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGG
AGAGGAGTCCACCTCCGCCAAGTCCGCCTCCACCGAGACCGCCACC
LinkerpCANTAB5-\$4
Nat 2379
Not I 2379
CGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCANNNNNNGCGGCCGCA
CGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCANNNNNNGCGGCCGCA GCCTAGCCTGTAGCTCGAGTGAGTCAGAGGTNNNNNNCGCCGGCGT
CGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCANNNNNNGCGGCCGCA GCCTAGCCTGTAGCTCGAGTGAGTCAGAGGTNNNNNNCGCCGGCGT
CGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCANNNNNNGCGGCCGCA GCCTAGCCTGTAGCTCGAGTGAGTCAGAGGTNNNNNNCGCCGGCGT VL
CGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCANNNNNNGCGGCCGCA GCCTAGCCTGTAGCTCGAGTGAGTCAGAGGTNNNNNNCGCCGGCGT
CGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCANNNNNNGCGGCCGCA GCCTAGCCTGTAGCTCGAGTGAGTCAGAGGTNNNNNNCGCCGGCGT E tag GGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGCCGCA CCACGCGGCCACGGCATAGGCCTAGGCGACCTTGGCGCACGGCGT
CGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCANNNNNNGCGGCCGCA GCCTAGCCTGTAGCTCGAGTGAGTCAGAGGTNNNNNNCGCCGGCGT VL E tag GGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGCAACCGCGTGCCGCA
CGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCANNNNNNGCGGCCGCA GCCTAGCCTGTAGCTCGAGTGAGTCAGAGGTNNNNNNCGCCGGCGT E tag GGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGCCGCA CCACGCGGCCACGGCATAGGCCTAGGCGACCTTGGCGCACGGCGT Amber Stop Codon
CGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCANNNNNNGCGGCCGCA GCCTAGCCTGTAGCTCGAGTGAGTCAGAGGTNNNNNNCGCCGGCGT E tag GGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGCCGCA CCACGCGGCCACGGCATAGGCCTAGGCGACCTTGGCGCACGGCGT Amber Stop Codon TAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCTCATACAGAAAATTCATTTAC
CGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCANNNNNNGCGGCCGCA GCCTAGCCTGTAGCTCGAGTGAGTCAGAGGTNNNNNNCGCGGCCGCA E tag GGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGCCGCA CCACGCGGCCACGGCATAGGCCTAGGCGACCTTGGCGCACGCGT Amber Stop Codon TAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCTCATACAGAAAATTCATTTAC ATCTGACAACTTTCAACAAATCGTTTTGGAGTATGTCTTTTAAGTAAATG pCANTAB5-S6 2521
CGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCANNNNNNGCGGCCGCA GCCTAGCCTGTAGCTCGAGTGAGTCAGAGGTNNNNNNCGCCGGCGCA E tag GGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGCCGCA CCACGCGGCCACGGCATAGGCCTAGGCGACCTTGGCGCACGGCGT Amber Stop Codon TAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCTCATACAGAAAATTCATTTAC ATCTGACAACTTTCAACAAATCGTTTTGGAGTATGTCTTTTAAGTAAATG pCANTAB5-S6 2521 TAACGTCTGGAAAGACGACAAAACTTTAGATCGTTACGCTAACTATG 3'
CGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCANNNNNNGCGGCCGCA GCCTAGCCTGTAGCTCGAGTGAGTCAGAGGTNNNNNNCGCCGGCGT E tag GGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGCCGCA CCACGCGGCCACGGCATAGGCCTAGGCGACCTTGGCGCACGGCGT Amber Stop Codon TAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCTCATACAGAAAATTCATTTAC ATCTGACAACTTTCAACAAATCGTTTTGGAGTATGTCTTTTAAGTAAATG pCANTAB5-S6 2521 TAACGTCTGGAAAGACGACAAAACTTTAGATCGTTACGCTAACTATG 3' ATTGCAGACCTTTCTGCTGTTTTGAAATCTAGCAATGCGATTGATAC 5'
CGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCANNNNNNGCGGCCGCA GCCTAGCCTGTAGCTCGAGTGAGTCAGAGGTNNNNNNCGCCGGCGCA E tag GGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGCCGCA CCACGCGGCCACGGCATAGGCCTAGGCGACCTTGGCGCACGGCGT Amber Stop Codon TAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCTCATACAGAAAATTCATTTAC ATCTGACAACTTTCAACAAATCGTTTTGGAGTATGTCTTTTAAGTAAATG pCANTAB5-S6 2521 TAACGTCTGGAAAGACGACAAAACTTTAGATCGTTACGCTAACTATG 3'

pCANTAB 5 E map on previous page

图 2xpCANTAB5e 部分载体序列

【系统内容】

- A. 融合表达宿主菌 **G1** (15%甘油保存);
- B. 噬菌粒载体 pCANTAB5e (DNA 溶于 TE Buffer, 浓度 50ng/ul);
- C. 辅助噬菌体 M13K07 (滴度为 1.2×10¹²pfu/ml);
- D. 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。

Paragram

【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 \mathbb{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℃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℃充分振荡培养 10-14 小时;
- 4) 8000 rpm 离心 15 min, 4℃;
- 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℃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℃ 并在 42℃恒温保存;
- 3) 将上述噬菌体溶液用培养基做 10⁻⁶、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;

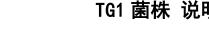
备注: 宿主菌的制备请参照 TG1 菌株说明书进行。

- 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℃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℃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 10¹²pfu/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℃下即可,不可-20℃或更低温度冻存;

TG1 菌株 说明书



规格: 200µL/管

状态: 15%甘油保存

菌株名称: E. coli TG1 Cells

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

- 菌株在发货之前已经经过严格的确证,质量有保障;
- 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 线,37℃过夜培养后,再次挑取单个菌落在Minimal Medium 平板上划线,37℃ 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 MgCl₂•6H₂O: Dissolve 20.33 g in distilled water to a final volume of 100 ml and autoclave.
- 1 M CaCl₂•2H₂O: 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 μm 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 µm filter. Do not autoclave.

In a \$500 ml bottle, dissolve 6 g of Na₂HPO₄ (dibasic), 3 g of KH₂PO₄ (monobasic) and 1 g of NH₄Cl 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°C and combine. Add1 ml of 1 M MgCl₂•6H₂O, 1 ml of 1 M CaCl₂•2H₂O, 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: 200µL/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 μg/ml nalidixic acid)上划线,37℃过夜培养后,再次挑取单个菌落在Minimal Medium 平板上划线,37℃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 MgCl₂•6H₂O: Dissolve 20.33 g in distilled water to a final volume of 100 ml and autoclave.

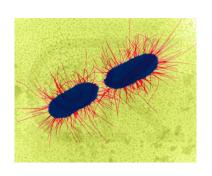
1 M CaCl₂•2H₂O: Dissolve 14.7 g in distilled water to a final volume of 100 ml and autoclave.

1 M thiamine hydrochloride: Dissolve 33.73 g in distilled water to a final volume of 100 ml and sterilize using a 0.22 μm 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°C and combine. Add1 ml of 1 M MgCl₂•6H₂O, 1 ml of 1 M CaCl₂•2H₂O, 1 ml of 1 M thiamine hydrochloride and 5 ml of 20% glucose. Pour plates immediately.



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

WA. RANGE TO STEP STATE OF THE STATE OF THE

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