

Nanobody Library Selection by MACS and FACS

20240510-NYY&QZM

Nb: plasmid (pYDS649)

strain (BJ5465) (-TRP)

Nb 文库多样性: 5×10^8

Nb 冻存: 1×10^{10} (10% DMSO + 90% Yglc4.5-TRP)

筛选时酵母生长状态处于 OD₆₀₀ 为 0.8-1.0 为最好。

比色皿测 OD 时, 酵母要稀释, OD 值在 0.0 - 1.0 数据才会准确。

Selection buffer: 还需加入 0.1% detergent, 2 mM Ca²⁺, 过滤除菌。

注意: 无菌操作 (超净台内)

一: 酵母复苏

1. 酵母 30℃ 解冻, 加入 1L Yglc4.5-TRP 培养基中, 230 rpm, 30℃ 过夜扩增, 大概会长 8-10 倍。
2. 同时取 1ml 酵母, 梯度稀释, 各取 100 μl 涂板确定存活率 (YPDA plate)。

二: 诱导表达及测量表达率

1. 取 5×10^9 个酵母 (约 100ml), 2000g 3min。20ml Gala6.0 wash 一次后加入 1L Gala6.0 培养基中过夜诱导。25℃, 220rpm, 约 16-18h。
2. 取 1×10^6 个酵母, 100 μl Sele buffer 重悬, 加入 1 μl HA 抗体染色 15min。FACS 测表达, 用不加抗体的酵母做对照圈门, 酵母正常表达率约为 15%。

三: 负筛

1. 取诱导后的酵母 1×10^{10} , 2000g, 4℃, 3min。
 2. 10 ml cold sele buffer 重悬。2000g, 4℃, 3min, 去掉上清。
 3. 加入 5ml sele buffer 重悬, 再加入 300 μl FITC beads 和 200 nM anti-Tag Ab-FITC, 混匀。冷室内, rotate 40 min。
- 注: (**beads 必须在超净台内打开, 抗体以及目的蛋白需 0.22 滤膜过滤除菌。**)
4. 剩 20 分钟时, 开始柱平衡: 将 LD column 放在磁力架上, 下方放 15ml 离心管, 将 5ml sele buffer 倒入 LD column 中, 平衡该柱子。
 5. 取出冷室中的酵母, 2000g, 4℃, 3min, 去掉上清。
 6. 加 5ml sele buffer 重悬。
 7. 将重悬的酵母流穿 LD column, 并收集流穿液。
 8. 再加 2ml sele buffer 至 LD column 冲洗残留的酵母并收集。
 9. 柱子弃之。将流穿液收集用于下一步正筛。

四：正筛

1. 将流穿液中的酵母 2000g, 4℃, 3min, 去掉上清。
2. 取 5ml sele buffer, 加入 300 nM 目的蛋白和 200 nM anti-Tag Ab-FITC, 过滤除菌, 用该 buffer 重悬上一步的酵母。
3. 冷室内 rotate 1h.
4. 2000g, 4℃, 3min, 去掉上清。5ml sele buffer, wash 3 次, 去掉上清。
5. 加 4.5 ml sele buffer 重悬, 再加入 300 μ l APC beads, 混匀。
6. 冷室内 rotate 20 min.
7. 同时平衡 LS column: 将 LS column 放在磁力架上, 下方接 15ml 离心管, 加入 5 ml sele buffer 平衡。
8. 将冷室内的酵母 2000g, 4℃, 3min 离心, 去上清。
9. 加入 5 ml sele buffer 重悬并流穿 LS column。
10. 加入 20-40 ml sele buffer wash 非特异黏附的酵母。
11. 取下 LS column, 放置于新的干净的 15 ml 离心管, 在 LS column 中加入 5 ml sele buffer, 收集洗脱下的酵母。
12. 取 100 μ l 酵母, 用于显微镜下技术, 和 FACS 检测是否有富集。
13. 剩下的酵母 2000g 离心, 用 3ml Glu-TRP 重悬, 30℃过夜培养。

此时, 一轮筛选结束, 可将扩增 10 倍以上的酵母冻存留种, 用于之后的二次筛选。每次 MACS 或者 FACS 筛选结束以后都要冻存 2 或 3 管酵母防止下一步筛选出现问题, 冻存酵母直接放-80 即可。

二轮筛选: 步骤同第一次, 只是将所有 FITC 换成 APC, beads 量和目的蛋白量可减少一半。

五：FACS 筛选

1. 取两轮筛选后的诱导酵母, 5ml sele buffer, wash 2 次, 2000g, 4℃, 3min。
2. 2.5 ml sele buffer 中加入:

Anti-HA -Ab-APC : 20 μ l	}	0.22 过滤除菌, 重悬
100 nM 目的蛋白		
100 nM anti-Tag Ab-FITC		
3. 冷室内, rotate 染色 60 min。
4. 5 ml sele buffer Wash 2 次。
5. 10 ml sele buffer 重悬, 40 μ M 滤膜过滤到流式管中, 防止堵塞流式仪器。
6. 负一层 Aria II 分选。准备好 2 个接酵母的流式管, 管中提前加入 2ml sele buffer (或者培养酵母的培养基) 润湿管壁。
7. 分选后的酵母涂板 30℃培养, 扩增, 待下次 FACS-FITC (50 nM) 分选。
8. 挑选单克隆验证。500 μ l 诱导培养一晚即可。

六：得到 DNA 序列并表达 Nb

1. 过夜培养 5-10 ml 酵母，试剂盒提取质粒测序，通用引物 **GAL1**。
2. 将 Nb 片段克隆到 **pET26b** 载体上,可以保留 HA-tag, **卡那抗性**,周质空间表达。
3. Pull down 验证是否和目的蛋白有互作，组装 **complex** 过分子筛。

注：Nb 消光系数很大，一般为 2.0，因此实际浓度会少一倍。

七：酵母进化

1. 易错 PCR:

成分	体积
10×PCR MIX 酶	3 μ l
DNA 模版	1 μl (1ng/μl)
引物 (10 μ M each)	各 1 μ l
易错 PCR 增强剂	3 μ l
易错 PCR 专用 NTP	3 μ l
易错 PCR 专用 MnCl ₂	3 μ l
超纯水	15 μ l

最后加 MnCl₂，避免形成沉淀。

2. 易错 PCR 参数:

步骤	温度	时间	循环数
PCR 前变性	94℃	3 min	1
易错 PCR	94℃	1min	20
	60℃	1min	
	72℃	3min	

3.上述条件的突变率为:

突变氨基酸的个数	突变
0	2
1	3
2	3
3	1
>3	2

4. 易错 PCR 突变完成后，用正常 PCR 大量扩增易错 PCR 产物。

(正常 PCR 设计 overlap 40-50bp 以便和酵母载体连接)

5. 转化:

按照 kit 提前做好 BJ5465 酵母感受态，-80℃ 保存，用时室温解冻。

(YPDA 培养 BJ5465)

提前准备好 50 μ g 易错片段和 15 μ g 载体 (NheI 和 BamHI)，超净台内按照 kit 步骤文库转化，-TRP 涂板 30℃ 长 2-3 天。

收集所有克隆，Glu-TRP 中培养扩增 10 倍以上，冻存。

质粒载体一定要再次测序保证酶切位点没有突变再转化。

染料标记蛋白：

1. 蛋白上必须含有赖氨酸（K）才能标记成功。
 2. 蛋白浓缩过脱盐柱：150 mM NaCl, 25 mM Hepes, 不能含有-NH₂
 3. 染料 DMSO 溶解成 10 mM, -80℃分装保存。
 4. 蛋白：染料=1:2 - 1:5 摩尔比，**室温 1 小时**标记。
 5. 终止标记：用 1 M Tris- pH8.0 终止，体积比 10:1 加，即终浓度为 0.1M Tris, 混匀，避光 10 分钟。
 6. 再次过脱盐柱去除多余染料。
 7. 收集标记好的蛋白。分装液氮速冻保存-80℃
- 若是抗体则可加 50%甘油（体积比 1:1）于-20℃分装保存。

MACS 筛选示意图

