

[文章编号] 1007-7405(2017)02-0011-05

# 凡纳滨对虾 T7 噬菌体 cDNA 展示文库的构建

胡文燕<sup>1</sup>, 朱孟凯<sup>1</sup>, 钟理<sup>2</sup>, 姚翠鸾<sup>1</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002)

**[摘要]** 以来源于多种组织的 mRNA 为模板, 构建了一个凡纳滨对虾混合组织的 T7 噬菌体 cDNA 展示文库。结果表明: 噬菌体文库容量大, 达  $9.3 \times 10^7$  pfu; 文库重组率高, 为 97%; 大于 250 bp 的片段占 70% 以上; 利用液体扩增法对文库进行扩增, 扩增后文库的滴度为  $2.1 \times 10^{12}$  pfu/mL。

**[关键词]** 凡纳滨对虾; T7 噬菌体展示文库; 文库容量; 重组率

**[中图分类号]** S 917.4

## Construction of T7 Phage Display cDNA Library of *Litopenaeus vannamei*

HU Wenyan<sup>1</sup>, ZHU Mengkai<sup>1</sup>, ZHONG Li<sup>2</sup>, YAO Cuiluan<sup>1</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

**Abstract:** In order to investigate the gene function and protein interaction, total RNA were extracted from various tissues of *Litopenaeus vannamei* and then pooled together. The mRNA was separated from the pooled total RNA and a T7 phage display cDNA library of *L. vannamei* was constructed. Results showed that the total number of primary recombinants of the T7 phage display cDNA library was about  $9.3 \times 10^7$  pfu, the recombination ratio was 97% and the ratio of fragments greater than 250 bp was proved to be 70% by PCR amplification. The phage titer of the amplified library was  $2.1 \times 10^{12}$  pfu/mL. In general, a T7 phage display cDNA library from *L. vannamei* was successfully constructed with a large reservoir capacity and high recombination rate, which is helpful for the investigation of gene function and protein interaction.

**Keywords:** *Litopenaeus vannamei*; phage display library; reservoir capacity; recombination rate

## 0 引言

T7 噬菌体展示技术作为研究基因与蛋白质、蛋白质与蛋白质相互作用的一种便捷、高效、成熟的新型技术, 同时由于文库的实用性, 在基因功能研究中得到广泛应用<sup>[1]</sup>。噬菌体展示技术目前已经应用于多个研究领域, 包括功能基因的筛选<sup>[2-6]</sup>、蛋白质-蛋白质相互作用<sup>[7-8]</sup>、抗体库与抗原表位<sup>[9-11]</sup>、受体结构与功能<sup>[12]</sup>、抗病毒多肽药物开发<sup>[13]</sup>等。多种水产动物的 T7 噬菌体展示文库也已经建立, 例如在对虾中, Song 等<sup>[5]</sup>成功构建了日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicas*) 血细胞的 T7 噬菌体 cDNA 展示文库; 刘宁<sup>[2]</sup>以细菌刺激后提取的中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 血细胞为模板, 成功构建了 T7 噬菌体 cDNA 展示文库; 袁丽<sup>[7]</sup>以日本囊对虾淋巴原代细胞为模板, 应用噬菌体

[收稿日期] 2016-06-02

[修回日期] 2016-06-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (41276178)

[作者简介] 胡文燕 (1990—), 女, 硕士生, 从事水产养殖方向研究。通信作者: 姚翠鸾 (1971—), 女, 教授, 博导, E-mail: clyao@jmu.edu.cn。

展示技术对 WSSV 的中和抗体及感染相关蛋白进行研究, 获得了一个能够阻止 WSSV 与对虾淋巴原代培养细胞结合的单链抗体 P1D3。

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是养殖量最大的对虾种类, 对于其自身功能基因的深入研究是对虾健康养殖的首要任务<sup>[14-16]</sup>。但是关于凡纳滨对虾 T7 噬菌体展示文库的构建报道尚不多见。因此, 本研究拟构建凡纳滨对虾 T7 噬菌体展示文库, 为后期通过 T7 噬菌体展示技术深入研究凡纳滨对虾基因功能、蛋白相互作用的分子机制等奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集

凡纳滨对虾购自厦门市海沧区, 体重和体长分别为  $(7.5 \pm 1)$  g 和  $(11.5 \pm 1)$  cm, 实验前在集美大学海水厂暂养 1 周。取未经刺激的凡纳滨对虾的肝胰腺、肌肉、神经、肠、胃、心脏、鳃、眼柄、皮肤等组织, 迅速放入 RNA 保护液中后转移到  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存。从凡纳滨对虾腹血窦抽取血淋巴, 与抗凝剂 ( $\text{NaCl}$  450 mmol/L,  $\text{KCl}$  10 mmol/L,  $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$  10 mmol/L,  $\text{HEPES}$  10 mmol/L, pH 7.45) 按照 1:2 (体积比) 的比例混合,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、2800 r/min 分离血细胞 10 min, 并将其迅速保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

受体菌 BLT5615 菌株购自 Novagen 公司。

### 1.2 凡纳滨对虾 T7 噬菌体展示文库的构建

#### 1.2.1 总 RNA 的提取及 mRNA 的分离

凡纳滨对虾各组织总 RNA 采用试剂盒 (Invitrogen, USA) 提取, 参照说明书进行, 之后用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度。将各个组织提取的总 RNA 等量混合, 采用 mRNA 分离试剂盒 (Promega, USA) 分离纯化混合样本中的 mRNA。

#### 1.2.2 合成 cDNA 文库及末端处理

采用 cDNA 合成试剂盒 (Novagen, USA) 对  $4\text{ }\mu\text{g}$  纯化后的 mRNA 进行反转录, 合成双链 cDNA。用  $\text{EcoRI}/\text{HindIII}$  End Modification 试剂盒 (Novagen, USA) 对 cDNA 末端进行处理, 获得粘性 cDNA 片段后, 立刻用 Mini Column Fractionation 试剂盒 (Novagen, USA) 对双酶切产物进行片段大小分离, 具体操作步骤按照说明书进行。

#### 1.2.3 cDNA 与 T7 载体连接及体外包装

将  $5\text{ }\mu\text{L}$  反应体系 ( $V$  (处理好的 cDNA 片段) :  $V$  (T7 Select 10-3b 载体臂) = 2:1) 在  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  连接过夜, 之后与  $25\text{ }\mu\text{L}$  包装蛋白进行体外包装, 2 h 后加入  $270\text{ }\mu\text{L}$  无菌的液体 LB 培养基完成包装。

### 1.3 凡纳滨对虾 T7 噬菌体 cDNA 文库的鉴定

#### 1.3.1 文库容量测定

取  $10\text{ }\mu\text{L}$  包装产物, 用无菌的空白 LB 培养基进行 10 倍梯度稀释, 共稀释 6 个浓度梯度 ( $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ )。每个梯度取  $100\text{ }\mu\text{L}$  稀释液分别与  $250\text{ }\mu\text{L}$  BLT5615 菌液、2.5 mL 上层 LB 培养基 ( $\text{Amp}^+$ ,  $50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 混合均匀, 铺于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  预热的 LB 固体平板上, 待冷凝后于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱中倒置培养 3~4 h, 统计平板上的噬菌斑数量。按照公式: 噬菌体滴度 = 噬菌体个数  $\times$  稀释倍数  $\times$   $10/\text{平板个数}$ , 计算文库滴度, 再用噬菌体滴度乘以包装后所得文库的体积即可算出文库容量。

#### 1.3.2 文库插入片段分布及重组率测定

参照 T7 Select System 试剂盒 (Novagen, USA) 说明书, 从平板上随机挑取 30 个噬菌斑用 T7 上下游引物进行 PCR 扩增 (T7 上游引物: GGAGCTGTCGTATTCCAGTC; T7 下游引物: ACCCCTCAA-GACCCGTTT), 鉴定文库插入片段分布情况及重组率。在退火温度  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 35 个循环条件下进行常规 PCR 扩增。

用 1.5% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小和分布, 并用检测出条带的噬菌斑数 /

参与检测的总噬菌斑数,统计文库的重组率,评价噬菌体文库的质量和多样性。

1.3.3 T7 噬菌体展示文库的扩增

用包装后的噬菌体展示文库通过感染培养的 BLT5615 宿主菌的方式进行扩增,感染复数为 0.001~0.01。37℃摇菌 1~3 h,观察到细菌裂解后立即停止培养,得到可用于淘选的凡纳滨对虾 T7 噬菌体展示文库。9200 r/min 离心 10 min 纯化裂解物,取上清按照 1.3.1 所述方法测定噬菌体的滴度,其中梯度稀释倍数为 10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup>、10<sup>10</sup>、10<sup>11</sup>、10<sup>12</sup>。将扩增后的文库加入 0.1 倍体积的无菌 80% (体积分数) 甘油,混匀后储存于 -80℃。

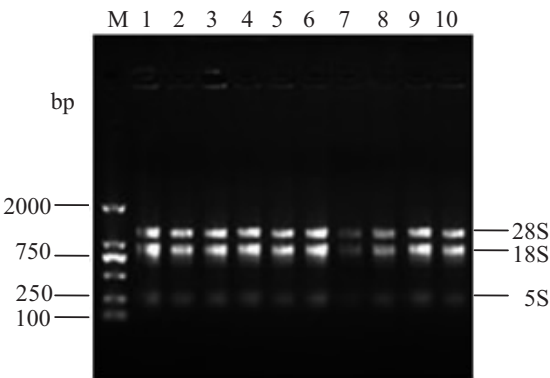
2 实验结果

2.1 总 RNA 的提取

凡纳滨对虾 10 个组织总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳检测结果表明:各组织 28S、18S rRNA 条带清晰, RNA 无明显降解 (见图 1); 紫外分光光度计检测样品的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 为 1.95~2.02, 表明 RNA 纯度较高, 无明显蛋白质污染, 可用于后续实验。由于 mRNA 的分离对总 RNA 的总量要求较多, 质量要求较高, 因此本研究对上述 10 个组织的总 RNA 等量混合, 分离 mRNA 后测得 RNA 总质量浓度为 400 ng/μL, 符合建立 T7 噬菌体 cDNA 展示文库的后续实验要求。

2.2 cDNA 合成

本实验双链 cDNA 检测结果表明: 其分子片段主要集中在 200~2000 bp (见图 2), 双链 cDNA 大小符合噬菌体展示文库的构建要求。

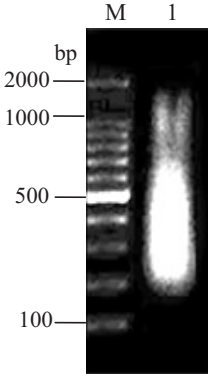


说明: 数字 1 至 10 分别为肌肉、神经、肠、胃、肝胰腺、心脏、鳃、眼柄、皮肤、血总 RNA 样品; M 为 2000 bp 标准分子量核酸。

Notes: Number 1-10 were total RNA from muscle, nerve, intestine, stomach, haptopancreas, heart, gill, eyestalk and hemocytes, respectively; M—2000 bp standard molecular weight.

图 1 凡纳滨对虾总 RNA 提取电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the total RNA from various tissues of healthy *L. vannamei*



说明: M—100 bp DNA Ladder; 1—双链 cDNA。

Notes: M—100 bp standard molecular weight; 1—double-strand cDNA.

图 2 凡纳滨对虾双链 cDNA 电泳图

Fig.2 Electrophoretogram of the double-stranded cDNA from tissues of healthy *L. vannamei*

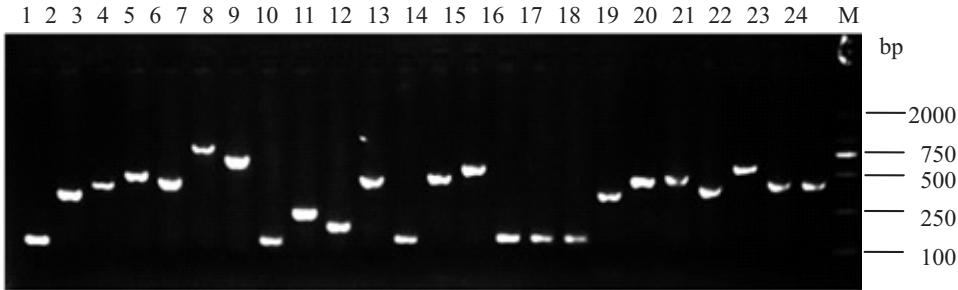
2.3 文库的库容

完成噬菌体体外包装后,用双层琼脂平板对所得噬菌体文库进行滴度测定。经统计,在稀释倍数为 10<sup>6</sup>的平板上长出 59 个噬菌斑,在稀释倍数为 10<sup>7</sup>的平板上长出 3 个噬菌斑。原 T7 噬菌体 cDNA 文库滴度为 3.1 × 10<sup>8</sup> pfu/mL,再乘以实际包装原产物体积 0.3 mL (25 μL 包装产物 + 5 μL 连接产物 + 270 μL 无菌培养基),最终得到的 cDNA 文库中噬菌体总数 (即文库容量) 为 9.3 × 10<sup>7</sup> pfu。

2.4 文库的片段大小分布及重组率

对随机挑取的 30 个噬菌斑用 T7 Select 上下游引物进行 PCR 扩增,之后通过琼脂糖凝胶电泳检测

插入片段的大小。结果表明，重组子片段大小分布主要在 100 ~ 1500 bp 之间，其中大于 250 bp 的片段占重组子总数的 70%（见图 3），经统计凡纳滨对虾 T7 噬菌体展示文库重组率为 97%。从结果可以看出，凡纳滨对虾 T7 噬菌体 cDNA 展示文库多样性较好，重组率高。



说明:数字 1 至 24 为随机挑取噬菌斑单克隆的 PCR 产物电泳结果;M—2000 bp 标准分子量核酸。  
Notes: Number 1–24 are PCR products from randomly selected clones; M—2000 bp standard molecular weight.

图 3 随机挑取的噬菌斑 PCR 电泳图谱  
Fig.3 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from randomly selected plaques

2.5 文库扩增后的滴度

构建好的 T7 噬菌体 cDNA 展示文库在筛选前需要经过一轮扩增培养，便于插入噬菌体的基因进行表达及成功在噬菌体表面展示。经液体扩增后，在稀释倍数为  $10^{10}$  的平板上长出 33 个噬菌斑，在稀释倍数为  $10^{11}$  的平板上长出 9 个噬菌斑，按照公式计算可知扩增后文库滴度增加至  $2.1 \times 10^{12}$  pfu/mL，表明扩增后重组噬菌体得到明显富集，可用于后续相互作用蛋白的淘选实验。

3 讨论

由于具有信息量大及便捷性的特点，T7 噬菌体 cDNA 展示文库已经在基因功能的研究、蛋白质相互作用的淘选等方面得到广泛应用。在 T7 噬菌体 cDNA 展示文库的构建过程中，mRNA 的质量是决定文库质量的关键环节。由于 mRNA 容易降解，在其分离纯化过程中，mRNA 常常得率较低，因此本实验在构建 T7 噬菌体 cDNA 展示文库时，选取 10 个未经刺激的凡纳滨对虾组织作为提取 RNA 的模板。这样，一是可以消除由于器官分化可能导致某些基因的组织特异性表达，有利于在最初的研究中获得更多的信息，为对虾基因功能及蛋白质相互作用研究奠定基础；二是使得总 RNA 量较高，可以获得足够量的 mRNA，为高质量文库的构建提供基础。另外，在以 mRNA 为模板，合成双链 cDNA 的过程中，由于随机引物可以在一条 mRNA 模板的多个位点上同时引发 cDNA 的合成，有利于控制 cDNA 的大小，提高文库质量，因此本研究选用随机引物进行 cDNA 的合成。

一个多样性不足或库容量不够的文库会影响噬菌体文库展示成功的几率<sup>[8]</sup>。本研究构建的凡纳滨对虾 T7 噬菌体展示文库的原始容量为  $9.3 \times 10^7$  pfu，重组率为 97%，且大于 250 bp 的片段占 70%，表明文库构建成功，多样性较好。经过液体扩增后的凡纳滨对虾 T7 噬菌体 cDNA 文库滴度达到  $2.1 \times 10^{12}$  pfu/mL，表明插入的重组噬菌体得到了明显的富集，可用于后续的生物淘选实验。在日本囊对虾中，Song 等人<sup>[5]</sup>成功地构建了血细胞的 T7 噬菌体 cDNA 展示文库，其原始库容量为  $1.4 \times 10^6$  pfu，扩增后的文库滴度为  $5.4 \times 10^8$  pfu/mL。刘宁<sup>[2]</sup>构建的细菌刺激后中国明对虾血细胞的 T7 噬菌体 cDNA 展示文库的原始库容为  $1.88 \times 10^5$  pfu，经扩增后噬菌体文库的滴度达到  $10^{11}$  pfu/mL。相对于其他对虾，本研究所得文库库容较大，重组率较高，可能与 RNA 提取质量较高以及混合组织中包含有更多的基因信息相关。然而，在哺乳动物中，Li 等人<sup>[17]</sup>构建了 30 例肺癌病人的 T7 噬菌体 cDNA 展示文库，所得原始文库库容为  $2.0 \times 10^8$  pfu，扩增后的滴度为  $4.6 \times 10^{12}$  pfu/mL。与之相比，本研



究构建的凡纳滨对虾 T7 噬菌体展示文库库容较小,这可能与不同类型的生物样本有关。

综上所述,本研究成功构建了一个凡纳滨对虾的 T7 噬菌体展示文库,相对于其他对虾,其重组率较高,库容量较大,为对虾基因功能及蛋白质相互作用的研究奠定了技术基础。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] 蒂姆·克拉克森. 通用实验指南: 噬菌体展示 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 16-17.
- [2] 刘宁. 对虾血细胞 T7 噬菌体展示文库构建及功能基因淘选 [D]. 济南: 山东大学, 2006: 25-30.
- [3] 胡翠美, 王菲, 宋亮, 等. 家蚕中肠 cDNA T7 噬菌体展示文库的构建和免疫相关基因的淘选 [J]. 蚕业科学, 2011, 37(4): 642-649. DOI:10.3969/j.issn.0257-4799.2011.04.008.
- [4] 任文陟. 安氏隐孢子虫 T7 噬菌体展示文库的构建及免疫相关蛋白基因研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2010: 43-53.
- [5] SONG K K, LI D F, ZHANG M C, et al. Cloning and characterization of three novel WSSV recognizing lectins from shrimp *Marsupenaeus japonicas* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(4): 596-603. DOI:10.1016/j.fsi.2009.12.015.
- [6] 于俊媛, 周莹冰, 张雯庆. 金黄色葡萄球菌 N315 T7 噬菌体 cDNA 展示文库的构建 [J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(13): 1350-1353.
- [7] 袁丽. 应用噬菌体展示技术对对虾白斑综合症病毒 (WSSV) 中和抗体及感染相关蛋白的研究 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2006: 84-85.
- [8] WRIGHT M J, DEONARAIN M P. Phage display of chelating recombinant antibody libraries [J]. Molecular Immunology, 2007, 44(44): 2860-2869. DOI:10.1016/j.molimm.2007.01.026.
- [9] 袁水林, 李欣, 陈红兵, 等. 噬菌体展示技术定位主要食物过敏原表位的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(3): 379-385. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2015.03.074.
- [10] 向征, 刘北一, 侯晓睿, 等. 麻痹性贝类毒素 GTX2, 3 模拟表位的初步研究 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(6): 530-532. DOI:1007/8738(2010)06-0530-03.
- [11] OHTANI M, HIKIMA J, JUNG T S, et al. Variable domain antibodies specific for viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) selected from a randomized IgNAR phage display library [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(2): 724-728. DOI:10.1016/j.fsi.2012.11.041.
- [12] YUAN L, ZHANG X, XIAO N, et al. Identification of a WSSV neutralizing scFv antibody by phage display technology and *in vitro* screening [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2006, 72(2): 93-99. DOI:10.3354/dao072093.
- [13] OJEDA N, CARDENAS C, GUZMAN F, et al. Chemical synthesis and *in vitro* evaluation of a phage display-derived peptide active against infectious salmon anemia virus (ISAV) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(8): 2563-2571. DOI:10.1128/AEM.00184-16.
- [14] JI P F, YAO C L, WANG Z Y. Two types of calmodulin play different roles in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) defenses against *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV infection [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(2): 260-268. DOI:10.1016/j.fsi.2011.05.011.
- [15] YAO C L, JI P F, KONG P. Arginine kinase from *Litopenaeus vannamei*: cloning, expression and catalytic properties [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 3(26): 553-558. DOI:10.1016/j.fsi.2009.02.012.
- [16] YAO C L, JI P F, WANG Z Y. Molecular cloning and expression of NOS in shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 3(28): 453-460. DOI:10.1016/j.fsi.2009.12.002.
- [17] LI H M, GUO K, YU Z, et al. Diagnostic value of protein chips constructed by lung-cancer-associated markers selected by the T7 phage display library [J]. Thoracic Cancer, 2015, 6(4): 469-474. DOI:10.1111/1759-7714.12215.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 马 英)