蛋白质多肽文库构建中限制性显示技术的接头设计 *

马文丽[1)**] 刘 佳[1,2)] 李 凌[1)] 张 宝[1)] 师永霞[1)] 郑文岭[1)]

([1)]南方医科大学基因工程研究所，广州 510515；[2)]广州军区广州总医院医学实验科，广州 510010)

摘要 为了探讨限制性显示 (RD) 技术在构建蛋白质多肽文库中灵活的接头设计，分别根据原核表达载体 pET22b 以及酵母表达载体 pNMT-TOPO 设计了三套接头，三套接头依次增加一个碱基以保证与之连接的片段总有可能表达正确的开放阅读框. 然后以 HIV-1 B 亚型代表株 U26942 全基因质粒 DNA 为对象，利用 RD 技术分别建立了相应的蛋白质多肽文库. 从每个库中各随机挑选 12 个克隆进行测序分析并进行蛋白质表达预测. 结果从原核表达文库中获得了一个可以表达 HIV Pol 多肽的克隆，SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 结果显示该克隆在细菌 BL21(DE3)中有较高的表达，蛋白质印迹为阳性，与理论预测相符. 这些结果提示，RD 技术是一种建立基因组随机多肽文库的新方法，该方法灵活的接头设计可以满足不同的表达载体需求.

关键词 限制性显示，接头设计，多肽文库

学科分类号 Q785

限制性显示 (restriction display，RD) 技术[1]是一种体外无性克隆系统，其基本原理是利用限制性核酸内切酶，消化基因组 DNA 或 mRNA 逆转录的 cDNA 而产生限制性片段，再将片段与接头连接，通过根据接头序列设计的通用引物(或分组引物，即在通用引物的 3′端延伸若干碱基的选择性引物)来扩增限制性片段. RD 技术最初应用于基因的差异表达分析[2]，后来逐渐在 DNA 芯片探针制备[3, 4]和样品标记[5]等方面广泛应用，由于 RD 技术中接头的设计非常灵活，可以加入酶切位点、增强子、起始密码子以及终止密码子等表达元件用于目的片段的表达，因此我们尝试将 RD 技术运用于构建蛋白质多肽文库中. 本文以原核表达载体 pET22b 以及酵母表达载体为例，重点介绍 RD 技术在构建表达文库中的接头设计，并进行构建多肽文库的初步研究.

1 材料与方法

1.1 接头的设计

在运用 RD 技术构建多肽文库中，接头可以根据选择载体的表达特征而进行多样的设计. 然而接头的设计有一个共同的原则，即每一种载体都需要设计 3 套接头，3 套接头依次增加一个碱基，以保证每一条酶切片段与两端的接头按照一定比例连接后，能够产生 3×3＝9 种不同的连接方式，其中至少有一种连接方式可以按照该目的片段在基因组中的开放阅读框 (ORF) 进行表达[6-8].

1.1.1 原核表达载体 pET22b 的接头设计. 由于 pET22b (Promega 公司) 载体带有起始密码子以及终止密码子，所以接头的设计比较简单，在接头的 N端，根据单链抗体(scFv)的设计引进了$(Gly)_3$-Ser-$(Gly)_2$ 来增加蛋白质的空间折叠，在引物设计中引入了 *Not* Ⅰ的酶切位点，使 PCR 产物能够直接克隆到 pET22b 载体中. 接头由两条互补的寡核苷酸链退火形成，接头的一个 5′端突出 GATC，目的是与目的片段 3′端连接，另一个 5′端突出 G，是为了避免接头之间互连而设计的. 三个接头的 3′端依次增加 0、1、2 个碱基 (见小写的碱基)，使目的片段与任意两个接头连接后(图 1)，克隆到 pET22b 载体中，可以表达不同的蛋白质多肽. 具体的接头设计如下：Ap1，5′ GCA *GGT GGA GGC TCA GGC GGA* 3′，3′ GT *CCA CCT CCG AGT CCG CCT* CTAG 5′；Ap2，5′ GCA *GGT GGA GGC TCA GGC GGA* t 3′，3′ GT *CCA CCT CCG AGT CCG CCT* a CTAG 5′；Ap3，5′ GCA *GGT GGA GGC TCA GGC GGA* ta 3′，3′ GT *CCA CCT CCG AGT*

*广州市重大科技攻关项目(2001-Z-005-01).

** 通讯联系人.

Tel: 020-61648210, E-mail: wenli@fimmu.com

收稿日期：2005-03-04, 接受日期：2005-05-08

CCG CCT at CTAG 5′；引物 Pp，5′ GGAATAAT **GCGGCCGC**A GGT GGA GG 3′.

下横线的序列为引物与接头的互补部分，接头的斜体为$(Gly)_3$-Ser-$(Gly)_2$ 序列，引物引入了 *Not* Ⅰ酶切位点 (GCGGCCGC)，酶切位点前为保护碱基.

Pp: GGA----GCAGGTGGAGG
Ap1 5′ GCAGGTGGAGG-----GGA[GATC-------]GATC aTCC----CCTCCACCTG 3′ Ap2
Ap1 3′ GTCCACCTCC------CCTCTAG[-------CTAG] tAGG----GGAGGTGGACG 5′ Ap2
GGAGGTGGACG---AGG:Pp

Fig.1 Sketch of ligation products of HIV fragments with Ap adapters and Pp primer annealing site

Frame part present HIV digested DNA fragments. Any of three Ap adpter could ligate to both sides of fragments.

1.1.2 真核酵母载体 pNMT-TOPO 的接头设计.

pNMT-TOPO 载体 (Invitrogen 公司) 本身带有 6 个组氨酸标签，位于目的片段的 C 端，所以有可能由于加入的目的片段不是三联密码而破坏其表达. 于是设计时在接头的 5′端引入了 5 个编码组氨酸的碱基，它们与通用引物序列互补，并与引物序列一起在目的片段的 N 端表达 6 个组氨酸标签 (图 2)，用于筛选目的多肽. 另外载体本身不带有终止密码子，所以要在组氨酸序列之后加入 3 个终止密码子的互补序列，具体的接头设计如下：Ay1，5′ CAT CAT CAC CAT CAT *TTA* C *TCA* C *CTA* 3′，3′ A GTA GTG GTA GTA *AAT* G *AGT* G *GAT* CTAG 5′；Ay2，5′CAT CAT CAC CAT CAT t *TTA* C *TCA* c *CTA* 3′，3′ A GTA GTG GTA GTA a *AAT* G*A GT* G *GA T* CTAG 5′；Ay3，5′ CAT CAT CAC CAT CAT cc *TTA* C *TCA* G *CTA* 3′，3′ A GTA GTG GTA GTA gg *AAT* G *AGT* G *GAT* CTAG 5′；引物 Py，5′ GAA **ATG** GCA CATCATCATCACC 3′.

引物的 GAA**ATG**GCA 序列是根据 pNMT-TOPO 载体本身的要求设计的 (见 pNMT-TOPO 载体说明书). 接头的斜体序列为终止密码子，3 个终止密码子之间加入碱基可以保证任何一个目的片段都可以被其中一个终止密码子中止 (图 2). 接头 1、2、3 分别在组氨酸序列后加入了 0、1、2 个碱基 (见接头中小写的碱基)，是为了保证目的片段能够按照需要的开放阅读框进行表达. 同样，接头的一个 5′端突出 GATC，另一个 5′端突出 CA.

(a) Ay1 5′ CAT----AT*TTACTCACCTA*[GATC-------] GATC*TAGGTGAGTAA*aAT----A 3′ Ay2
Ay1 3′ A--- TA*AATGAGTGGATC*TAG[-------CTAG]*ATCCACTCATT*t TA----TAC 5′ Ay2

(b) Py:GAA--------CATCATCATCACC
Ay1 5′ CATCATCACCATCAT----[---]----aATGATGGTGATGA 3′ Ay2
Ay1 3′ AGTGAGGTAGTA----[---]----tTACTACCACTACTAC 5′ Ay2
CCACTACTACTAC-----AAAG:Py

Fig.2 Sketch of ligation products of HIV fragments with Ay adapters and Py primer annealing site

(a) Frame part present HIV digested DNA fragments. Italic sequence showed three tandem termination codes which could terminate any insert fragment. (b) Frame part present HIV fragments and part of adpter. Underlined sequence showed the encoded N-terminal 6×His tag.

1.2 材料

1.2.1 质粒和菌株. 实验中选用的基因组为 HIV-1 B 亚型 U26942 全基因 DNA，该质粒由美国 Carr 博士馈赠. 菌株 *E.coli* XL-1 和 *E.coli* BL21(DE3) 为本室保存.

1.2.2 酶和主要试剂. 切胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、PCR 纯化试剂盒购自申能博彩生物有限公司；限制性内切酶 *Sau*3A Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Not* Ⅰ、DNA 连接试剂盒、premix *taq*(Ex version)；CAIP (碱性磷酸酶) 购自大连宝生物工程有限公司；丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、Tris、SDS、考马斯亮蓝 R-250 均为 Pharmacia 产品；Anti-His6 (C-term) 单克隆购自 Invitrogen 公司；Western Blotting 试剂盒购自武汉博士德公司；转膜的蛋白

marker 为 BlueRanger Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix (PIERCE 公司).

1.2.3 主要仪器. 测序仪 3730 (ABI 公司); SDS-PAGE 电泳仪以及转印仪 (以及相关设备) 均为 Bio-Rad 公司.

1.3 方法

以下方法参照文献[9].

1.3.1 目的片段的获得. HIV-1 B 亚型基因质粒转化感受态细菌，挑取单个克隆，提取 HIV-1 B 亚型基因质粒，*Xba* Ⅰ酶切质粒，电泳并切胶回收 9 000 bp 的目的片段.

1.3.2 RD 技术制备 HIV 基因片段文库. HIV-1 B 亚型全基因 DNA 9 000 bp 用 *Sau*3A Ⅰ (识别位点 GATC) 酶切，37℃反应 3 h；制备接头：将各个接头的两条寡核苷酸单链配制成浓度为 50 μmol/L，各取 10 μl，90℃ 3.6 min，80℃ 3.6 min，70℃ 3.6 min，60℃ 3.6 min，50℃ 3.6 min，40℃ 3.6 min，30℃ 3.6 min，20℃ 3.6 min，4℃保持；将 Ap1、Ap2、Ap3 按等摩尔比两两混合 (共分 9 组)，取混合液 1.5 μl 与 5 μl 酶切产物进行 16℃连接过夜 (Ay1、Ay2、Ay3 的连接同上)；纯化连接产物，分别利用引物 Pp、Py 进行 PCR 扩增. 以 Pp 为引物扩增时设立退火温度 55℃，60℃以及梯度退火(55℃ 20 s，58℃ 20 s， 62℃ 20 s)；反应条件：72℃延伸 15 min，95℃变性 2 min， 94℃ 30 s，55℃ 30 s (60℃ 30 s，梯度退火)，72℃ 1 min，30 个循环；72℃延伸 10 min，4℃保持. 以 Py 进行 PCR 时，直接利用梯度退火(55℃ 20 s，58℃ 20 s， 62℃ 20 s)，其余反应条件同上.

1.3.3 蛋白质多肽文库的建立. a.酵母 pNMT-TOPO 载体表达文库的建立：PCR 产物经过纯化试剂盒纯化后与载体连接(见 pNMT-TOPO 载体说明书)，转化感受态细菌. b. 原核 pET22b 载体表达文库的建立：PCR 产物经过纯化试剂盒纯化后 *Not* Ⅰ酶切，37℃反应过夜；pET22b 载体去磷酸化，与酶切后的 HIV 片段库 16℃连接过夜. 连接产物转化感受状态的大肠杆菌 XL-1.

1.3.4 从各文库中随机挑取 12 个克隆，菌落 PCR 鉴定，并进行测序分析. pNMT-TOPO 载体测序引物 (Nf：TTTCAATCTCATTCTCACTTTCTGA；Ur：ACAAGGCATCGACTTTTTCAATA). pET22b 载体的测序引物 (T7p：TAATACGACTCACTATAGGG；T7T GCTAGTTATTGCTCAGCGG) 由本室合成. 测序结果通过 DNASTAR 分析，将原核表达库中获得的可以表达 HIV 基因的克隆提取质粒，并转化 BL21 (DE3) 细菌，挑取阳性克隆诱导表达并检测.

2 结 果

2.1 DNA 片段文库的构建

质粒酶切后获得 9 000 bp 的 HIV-1 B 亚型代表株 U26942 的目的片段以及 2 700 bp 的 pNoTA/T7 载体(图 3). HIV 基因经过 *Sau*3A Ⅰ酶切后，分别加入两套不同的接头，再分别以 Py 和 Pp 进行不同反应条件的 PCR 扩增，获得 HIV DNA 片段库 (图 4).

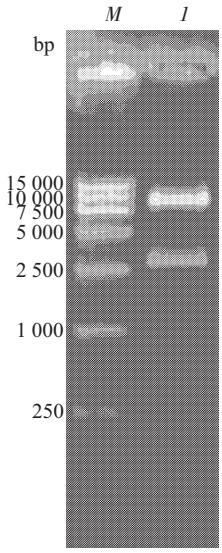

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of plasmid digested by *Xba* Ⅰ

1: HIV genome DNA and pNoTA/T7 vector; *M*: DNA marker DL15000.

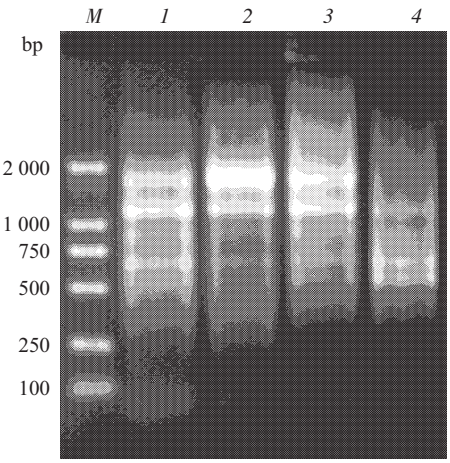

Fig.4 RD-PCR products of HIV DNA fragments ligating with two series of adapters

1~3: RD-PCR products with corresponding primer Pp while annealing temperature at 55℃, 60℃, and gradient temperature (55℃ 20 s, 58℃ 20 s, 62℃ 20 s) respectively; *4*: RD-PCR products with primer Py with gradient annealing temperature; *M*: DNA marker DL2000.

2.2 测序分析结果

2.2.1 酵母 pNMT-TOPO 载体表达库中随机挑取的 12 个克隆测序结果及其 DNASTAR 分析，结果见表 1.

2.2.2 pET22b 载体表达库中随机挑取的 12 个克隆测序结果及 DNASTAR 分析，结果见表 2.

Table 1 Sequence analysis of 12 clones randomly obtained from HIV-pNMT-TOPO vector library

Clone	5′ adapter	3′ adapter	Inserted fragment location in HIV genome	Fragment length	Insert direction	Encoded protein
Clone1	Ay1	Ay1	1 808 ~ 2 390	583 bp	forward	RP
Clone2	Ay3	Ay2	5 220 ~ 5 675	456 bp	reverse	RP
Clone3	Ay2	Ay1	4 405 ~ 4 845	441 bp	forward	RP
Clone4	Ay1		7 867 ~	553 bp#		SI
Clone5	Ay3	Ay1	1 808 ~ 2 390	583 bp	forward	RP
Clone6	Ay1		394 ~	1 064 bp#	forward	SI
Clone7	Ay3	Ay1	5 220 ~ 5 675	456 bp	reverse	RP
Clone8	Ay2	Ay1	7 867 ~ 8 419	553 bp	reverse	RP
Clone9						NI
Clone10	Ay1	Ay1	6 410 ~ 6 989	580 bp	reverse	RP
Clone11	Ay3	Ay1	1 808 ~ 2 390	583 bp	forward	RP
Clone12*	Ay2	Ay2	1 475 ~ 1 807	333 bp	reverse	RP

RP: random peptide; SI: sequencing incompletely; NI: none HIV fragment insertion. 553 bp# and 1 064 bp# is theoretical HIV digested fragments by *Sau*3AⅠ. Inserted fragments in Clone12* is half-digested product constituted with two completely digested fragments.

Table 2 Sequence analysis of 12 clones randomly obtained from HIV-pET22b vector library

Clone	5′ adapter	3′ adapter	Inserted fragment location in HIV genome	Fragment length	Insert direction	Encoded protein
Clone1	Ap3	Ap1	5 935 ~ 6 409	475 bp	reverse	RP
Clone2						NI
Clone3	Ap1	Ap2	4 405 ~ 4 846	441 bp	forward	RP
Clone4	Ap3	Ap3	6 410 ~ 6 989	580 bp	forward	RP
Clone5*	Ap2	Ap1	5 676 ~ 5 934; 7 844 ~ 7 866	282 bp	reverse	RP
Clone6	Ap2	Ap3	5 220 ~ 5 675	456 bp	forward	RP
Clone7						NI
Clone8#	Ap1		397 ~	1 064 bp	forward	SI
Clone9	Ap2	Ap1	5 220 ~ 5 675	456 bp	forward	RP
Clone10	Ap1	Ap1	1 808 ~ 2 390	583 bp	forward	Pol peptide and C terminal His6
Clone11						NI
Clone12#	Ap3		−1 474	1 064 bp	reverse	SI

Inserted fragments in Clone5* is two digested fragments ligation product. Clone8# and Clone12# are incompletely sequenced and their length is theoretic value.

12个克隆的分析结果：接头与引物的序列基本比较完整，与设计相符，原核文库中有个别克隆的引物序列有 1、2 个碱基的缺失. 接头与目的片段的连接方式比较随机，当合适的接头与目的片段连接后，可以表达 HIV 本身编码的蛋白质，而其他的连接方式则产生随机多肽. 因此，RD 技术构建的表达文库实质上是基于 HIV 基因组遗传信息的随机肽库，该文库中包括 HIV 基因组本身编码的蛋白质多肽. 另外，结果显示有一些目的片段插入载体的概率比较高，可能与 PCR 时的优势扩增有关，正向插入与反向插入的概率基本相当.

2.3 原核表达库中克隆 10 的蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳以及蛋白质印迹检测

原核表达库中的克隆 10 表达 HIV Pol 蛋白第 116~309 位氨基酸，同时也可以表达 pET22b 载体上的 6 个组氨酸标签，所以我们用 His 抗体进行检测. 但并不是所有的可以表达插入片段的克隆都可以表达载体自带的标签，只有插入的片段中没有终止密码子，且与合适的接头连接，才可以表达 C 端的 His 标签 (图 5 和图 6).

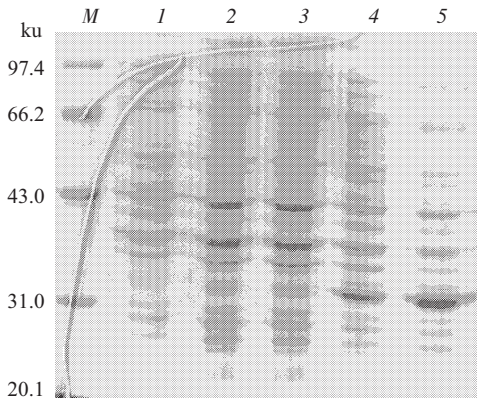

Fig.5 Protein analyzed by SDS-PAGE

1: BL21(DE3) cell lysis; *2*: cell lysis of BL21(DE3) with pET22b vector; *3*: cell lysis of BL21 (DE3) with clone 10 plasmid from prokaryote library before induced with IPTG; *4*: cell lysis of clone 10 plasmid induced with IPTG at 30℃ for 1 h; *5*: cell lysis of clone 10 plasmid induced with IPTG at 30℃ for 2 h; *M*: low protein molecular mass marker.

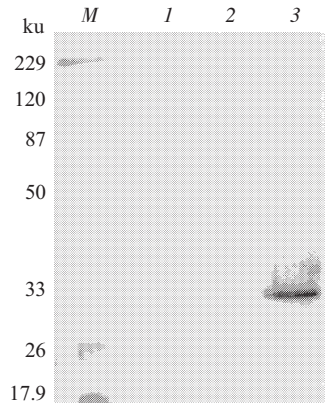

Fig.6 Result of Western blot

1: BL21 (DE3) cell lysis; *2*: cell lysis of BL21 (DE3) with clone 10 plasmid before induced with IPTG; *3*: cell lysis of clone 10 induced with IPTG at 30℃ for 2 h. *M*: BlueRanger prestained protein molecular mass marker mix.

3 讨 论

RD 技术构建的表达文库，有其自身的特点：

a. 构建的文库为小片段文库. 由于 RD 技术产生的目的片段是由限制性内切酶酶切产生的随机片段[10]，以 *Sau*3A Ⅰ为例，如果酶切的片段足够大(如基因组)，产生的目的片段应该是集中在 4^4＝256 bp 的一个正态分布曲线，所以表达的蛋白质是一些小肽或者是蛋白质的结构域，而不是完整的蛋白质，这与 cDNA 文库不同. 但片段文库又有一些优点：RD 技术通过 PCR 扩增目的片段，使得一些 cDNA 文库不能得到的低拷贝数片段能够表达. 另外与 cDNA 表达的全长蛋白质相比，小肽易于表达及空间折叠，更适合于建立表达文库.

b. RD 技术构建的片段文库为随机的片段文库. 三套接头的加入，以及目的片段的正反向插入，就使得一个酶切片段有 3×3×2＝18 种表达方式，而 5′端的接头对于片段是否表达基因组本身编码蛋白质尤其重要，而 3′端的接头作用则较小. 因此，基因组蛋白质多肽表达的概率为 1/6，随机蛋白质表达概率为 5/6. 我们从两个文库中分别挑取 12 个克隆，结果在原核表达文库中获得了一个可以表达 HIV pol 蛋白多肽的克隆，另外还获得了 6 个经 DNASTAR 分析表达随机多肽的克隆，在真核文库

中获得了 9 个随机多肽，估计与抽样的随机性以及某些克隆的重复出现相关，相信进一步大样本量的文库结果能与理论预计相符. 原核文库中的阳性克隆由于其 3′端合适的接头使得其可以表达 C 端的 6 个 His 标签，因此，3′端的接头决定 C 端的标签是否表达，原核文库中既能表达 HIV 蛋白多肽又能表达 His 标签的克隆概率为 1/18. 此外，我们利用 RD 技术构建文库中的随机多肽，可以通过与某一目标蛋白相互作用，用于文库的筛选，获得的阳性克隆则可以进行进一步的表达分析.

本研究选用 HIV 病毒基因组作为研究对象，首先是因为其基因组较小，构建的片段文库易于与理论值进行分析. 如果酶切的目的片段足够大 (如真核酵母基因组 DNA 等)，则可以产生一个基于遗传信息的庞大的随机肽库，用于研究小肽与蛋白质以及小肽与小肽之间的相互作用. 另外，对于病毒基因组，其本身没有内含子，但是有重叠基因，通过三套接头的移码可以表达重叠基因的两种蛋白质. RD 技术在该方面的应用研究更有优势.

c. RD 技术接头的设计非常灵活. 根据不同的表达载体可以设计不同的接头，本文以实验室现有的两个载体为例，分别设计了两套接头，建立了表达文库，从每个库中随机挑取了 12 个克隆进行抽样分析，并对原核表达库中获得的可以表达 HIV Pol 蛋白质多肽的克隆进行了诱导表达，对接头的设计进行了验证. 同一个载体也可以根据需要设计不同的接头，例如 pET22b 载体可以在接头中设计 6 个组氨酸，使表达的蛋白质 N 端带有组氨酸的标签. 利用 RD 技术灵活的接头设计可以满足各种载体的需求，可以避免将目的片段克隆到三种载体中进行表达 (三种载体移码表达蛋白) 以及重新构建载体或购买新的载体.

运用 RD 技术构建多肽文库，对于研究蛋白质之间的相互作用有较大价值. 但是 RD 技术与传统的物理方法和酶切法一样，在构建基因组文库时，并不能识别内含子和外显子，因此 RD 技术用于含有较少内含子的基因组为较好，尤其适用于病毒基因组. 另外，由于 RD 技术过程中存在 PCR 扩增的步骤，因此可能会出现一些优势扩增的现象，这对于构建较大基因组的片段文库有一定的影响. 这方面的工作还有待于进一步的研究.

参 考 文 献

1 马文丽, 郑文岭, James F B, 等. 限制性显示(RD-PCR): 一种新的差异显示技术. 孙志贤, 主编. 全军生物化学与分子生物学研究进展. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 113～114
Ma W L, Zheng W L, James F B, *et al*. Restriction display: a kind of new technology of differential display. In: Sun Z X, ed. Progress in Biochemistry and Molecular Biology of Army. Beijing:Uniform Medical Scinece Press, 1998. 113～114

2 Jiang L, Ma W L, Zheng W L, *et al*. Preliminary study of the differentiation-related genes from K562 cells induced by Hemin with the method of RD-PCR. Acta Anat Sini, 2001, **32**: 35～360

3 李 凌, 马文丽, 祝 骥, 等. 应用 RD-PCR 技术制备 HIV 基因芯片探针. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, **18** (1): 105~109
Li L, Ma W L, Zhu J, *et al*. Chin J Biochem and Mol Biol, 2002, **18** (1): 105~109

4 毛向明, 马文丽, 姜 立, 等. 应用 RD-PCR 方法制备 K562 细胞表达谱芯片基因探针. 第一军医大学学报, 2002, **22** (6): 548～550
Mao X M, Ma W L, Jiang L, *et al*. J First Mil Med Univ, 2002, **22** (6): 548～550

5 Li L, Ma W L, Zhu J, *et al*. A modified restriction display PCR methods in sample-labelling of DNA microarray. J Virol Methods, 2003, **114** (1): 71～75

6 Davis C A, Benzer S. Generation of cDNA expression libraries enriched for in-frame sequences. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94** (6): 2128～2132

7 Farabaugh P J. Programmed translational Frameshifting. Microbiological Review, 1996, **60** (1): 103～134

8 zur Megede J, Otten G R, Doe B, *et al*. Expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 subtype B pol and gagpol DNA vaccines. J Virol, 2003, **77** (11): 6197～6207

9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989. 16～572

10 Bao Z, Wenli M, Qinghua W, *et al*. Construction of a cDNA fragment library from SH-SY5Y cells using restriction display PCR. Br J Biomed Sci, 2002, **59** (1): 35～37

The Flexible Adapter Design of Restriction Display Technique in Constructing Peptide Library*

MA Wen-Li[1)**], LIU Jia[1,2)], LI Ling[1)], ZHANG Bao[1)], SHI Yong-Xia[1)], ZHENG Wen-Ling[1)]

([1)] *Institute of Genetic Engineering, Southern Medical University, Guangzhou* 510515, China;

[2)] *Center of Medical Research, General Hospital of Guangzhou Military Commander, Guangzhou* 510010, China)

Abstract To show the flexible adapter design of restriction display (RD) technique in constructing peptide library, two series of adapters were designed according to vector pET22b in *E.coli* and vector pNMT-TOPO in *S.pombe*. Each series of adapter has three in turn one-base-increment adapters, which allowed the inserted DNA fragment probably expressed in the correct reading frame. HIV-1 subtype B whole gene was used as an example, and fragments expression libraries with two different adapters were constructed by RD technique, randomly 12 clones from each library were sequenced for translation analysis. As a result, a clone from the prokaryotes library was obtained, which could encode HIV Pol peptide. Then the positive plasmid was induced to express protein in *E.coli* BL21(DE3). SDS-PAGE and Western blot showed positive result, which is consistent with expected. It can be concluded that RD technique is a new approach for constructing genome random peptide library, and its flexible adapters design can meet with kinds of expression vectors.

Key words restriction display, flexible adapter design, peptide library

---

*This work was supported by a grant from The Key Scientific and Technological Programs of Guangzhou City (2001-Z-005-01).

**Corresponding author . Tel: 86-20-61648210, E-mail: wenli@fimmu.com

Received: March 4, 2005 Accepted: May 8, 2005