

Πρωτεϊνική Μηχανική

Ιωάννης Παυλίδης
Τμήμα Χημείας | Πανεπιστήμιο Κρήτης

E-mail: ipavlidis@uoc.gr

Τηλ.: +30 2810 54-5130 | Γραφείο Γ211

ΕΠΙΣΗΜΗ ΣΕΛΪΔΑ: [HTTP://WWW.CHEMISTRY.UOC.GR/PAVLIDIS/](http://www.chemistry.uoc.gr/pavlidis/)

Γιατί πρωτεϊνική μηχανική;

Activity

Turnover frequency (k_{cat})

Specific activity (kat/kg, U/mg)

Temperature profile

Stability

Temperature stability

pH stability

Ingredient/byproduct stability

In the past, an enzyme-based process was designed around the limitations of the enzyme; today, the enzyme is engineered to fit the process specifications

Specificity

Substrate range

Substrate specificity (K_m , k_{cat}/K_m)

Substrate regioselectivity and enantioselectivity

Substrate conversion (%), yield

Efficiency

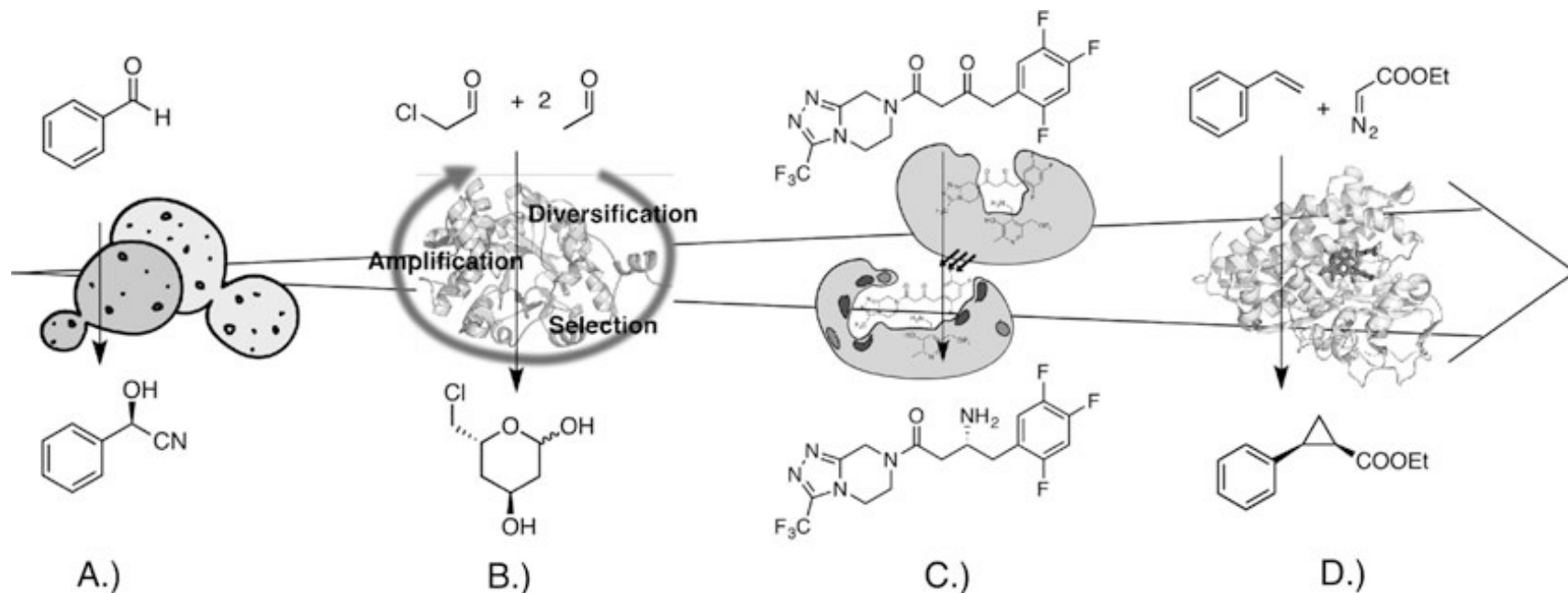
Space-time yield

Product inhibition

Byproduct/ingredient inhibition

Producibility/expression yield

Ανάπτυξη μέσω της μηχανικής

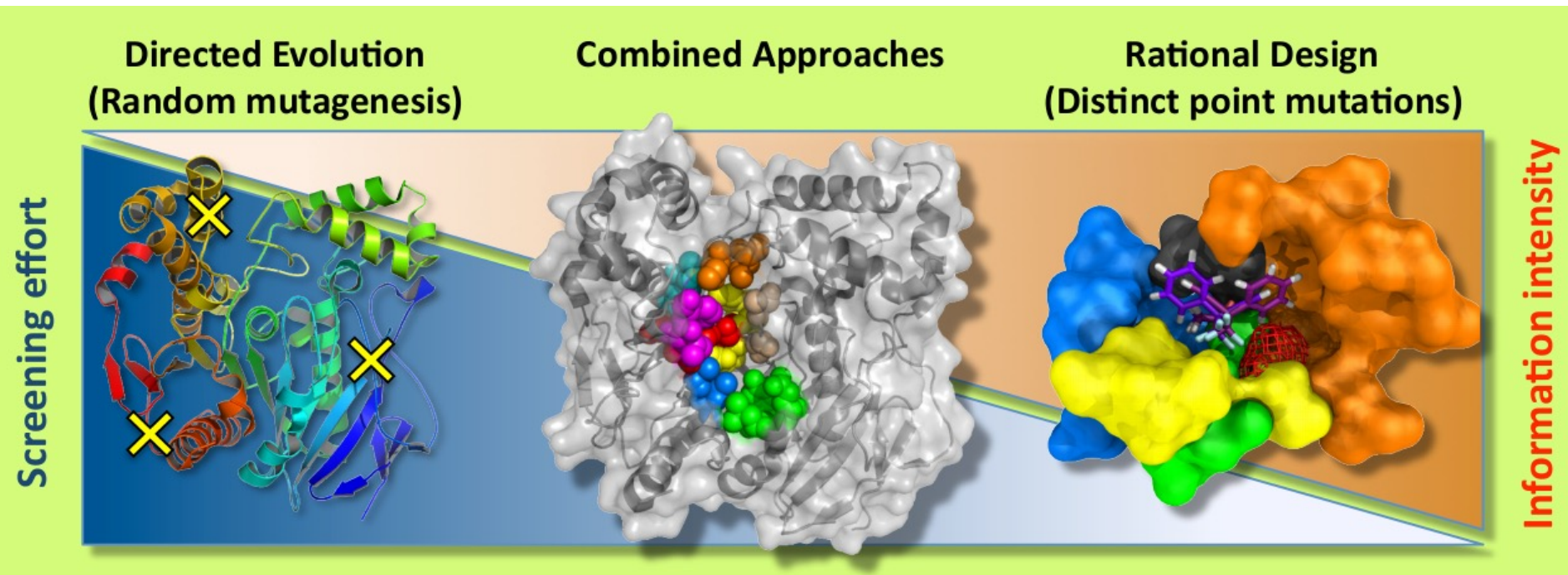


- (a) Rosenthaler (1908) used **crude enzyme preparation from almonds** to convert **benzaldehyde** to **mandelonitrile**.
- (b) In the 1980s, the introduction of directed evolution enabled generation of customized proteins as an **aldolase engineered for high selectivity** in the synthesis of the **atorvastatin side chain**.
- (c) Semirational and computer-guided engineering offers **transaminases** for the asymmetric synthesis of **sitagliptin**.
- (d) Most recent protein engineering efforts focus on adopting biocatalysts for **novel chemistry** such as **cyclopropanation** reactions

Ιστορικές ανακαλύψεις



Στρατηγικές σχεδιασμού πρωτεϊνών



Bornscheuer U.T. et al. (2012) Nature 485: 185–194

Kazlauskas R.J., Bornscheuer U.T. (2009) Nature Chem. Biol. 5: 526-529

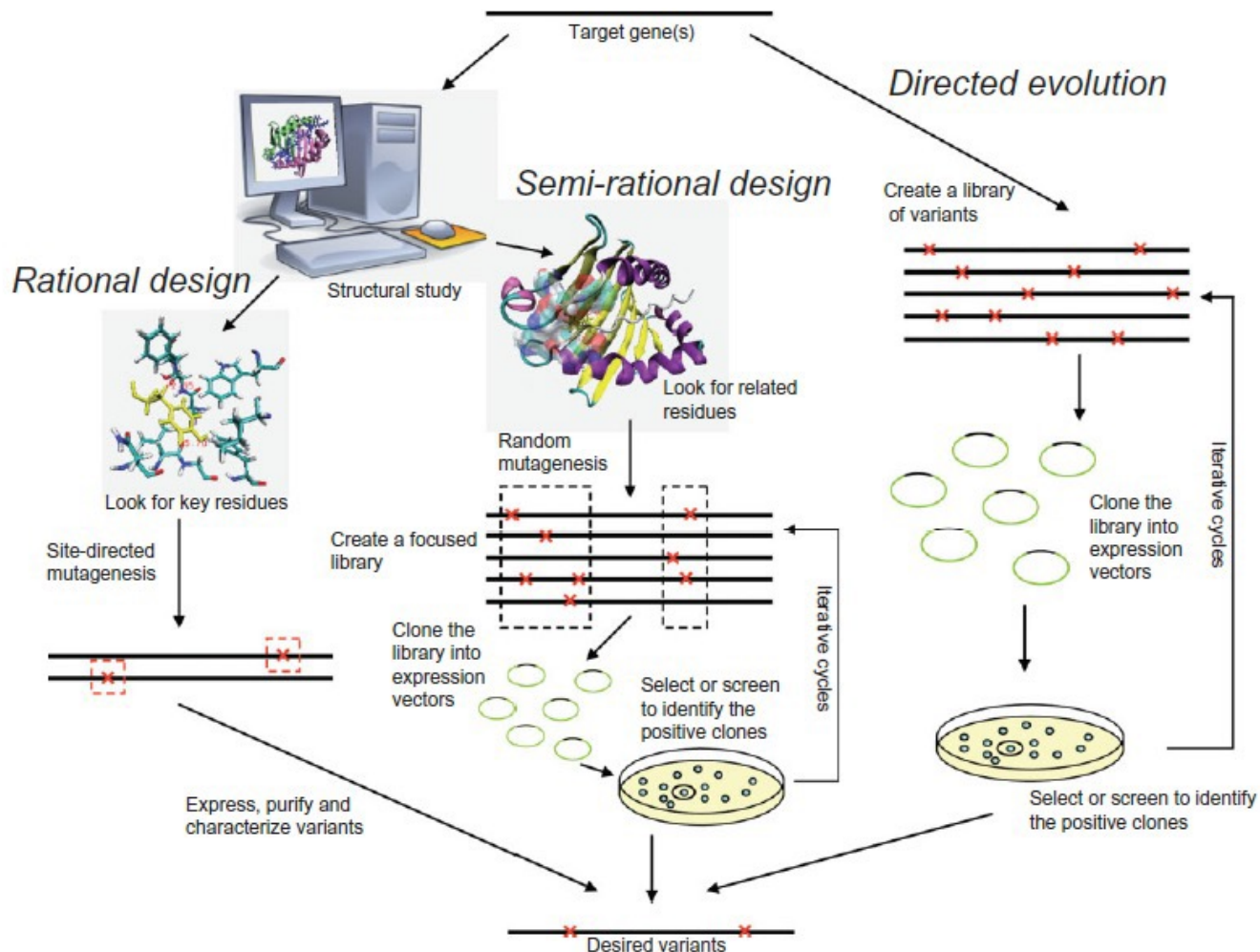
Lutz S., Bornscheuer U.T. (2009) Protein Engineering Handbook, Wiley-VCH, Weinheim

Kourist R., Brundiek H., Bornscheuer U.T., (2010) Eur. J. Lipid Sci. Technol. 112: 64-74

Ορθολογικός σχεδιασμός vs. Κατευθυνόμενη εξέλιξη

	Directed evolution	Rational design	Semi-rational design
Parental gene	A single gene or a group of homologous sequences	A single gene	A single gene
<i>A priori</i> knowledge requirement	Not required	Required	Required
Genetic diversity creation	Random mutagenesis or DNA recombination	Focused mutagenesis	Focused mutagenesis
Library size	Large	Small	Small to medium
Screening	High to ultra high throughput	Low to high throughput	Low to high throughput
Advantages	• No prior knowledge of the enzyme structure and mechanism is required. • Mutate the entire enzyme, and as such, it is possible to identify mutations distant to the active site that affect the enzymatic activity via allosteric interaction.	• Small library size. • Less time and effort on screening. • Particularly advantageous when there is no high-throughput screening system available.	• Library size is significantly reduced compared to directed evolution. • A larger portion of the protein sequence space is explored compared to rational design.
Disadvantages	• Large library size. • Impossible to explore the full protein sequence space, even with the most powerful selection or screening method. • Time consuming to develop an assay and to screen large library. • Resource intensive.	• <i>A priori</i> knowledge is required. • Mutations are mainly targeted at the active site.	• <i>A priori</i> knowledge is required. • Mutations are mainly targeted at the active site.

Στρατηγικές σχεδιασμού πρωτεϊνών



Πρώτα πειράματα

Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση - Site directed mutagenesis

Αρχές των 1980s

Με τη βοήθεια των τεχνικών
μοριακής βιολογίας

- ❖ PCR
- ❖ σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων
- ❖ περιοριστικά ένζυμα
- ❖ Αλληλούχιση DNA

Wild type	M	W	I	K	I	P	E	D	I	A	*
I5A	M	W	I	K	A	P	E	D	I	A	*
I5C	M	W	I	K	C	P	E	D	I	A	*
I5D	M	W	I	K	D	P	E	D	I	A	*
I5E	M	W	I	K	E	P	E	D	I	A	*
I5F	M	W	I	K	F	P	E	D	I	A	*
I5G	M	W	I	K	G	P	E	D	I	A	*
I5H	M	W	I	K	H	P	E	D	I	A	*
I5K	M	W	I	K	K	P	E	D	I	A	*
I5L	M	W	I	K	L	P	E	D	I	A	*
I5M	M	W	I	K	M	P	E	D	I	A	*
I5N	M	W	I	K	N	P	E	D	I	A	*
I5P	M	W	I	K	P	P	E	D	I	A	*
I5Q	M	W	I	K	Q	P	E	D	I	A	*
I5R	M	W	I	K	R	P	E	D	I	A	*
I5S	M	W	I	K	S	P	E	D	I	A	*
I5T	M	W	I	K	T	P	E	D	I	A	*
I5V	M	W	I	K	V	P	E	D	I	A	*
I5W	M	W	I	K	W	P	E	D	I	A	*
I5Y	M	W	I	K	Y	P	E	D	I	A	*

Πρώτο παράδειγμα συνθετικής βιολογίας

Σαμππιλυσίνη - Γνωστή δομή

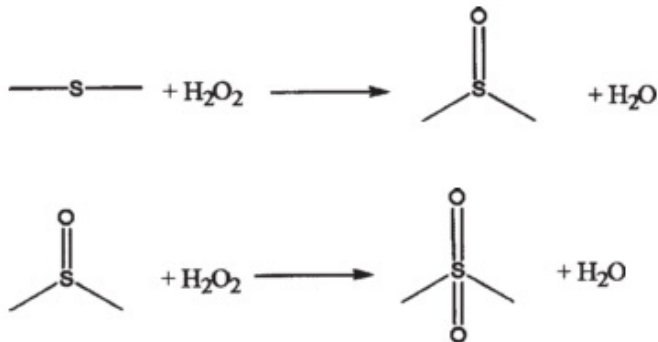
27.5 kDa - Μονομερής - S/H/D καταλυτική

Εξειδίκευση για υδρόφοβα αμινοξέα

Σταθερή σε pH 8-10.5

Ενεργή έως 65°C

Επιρρεπής στην οξείδωση



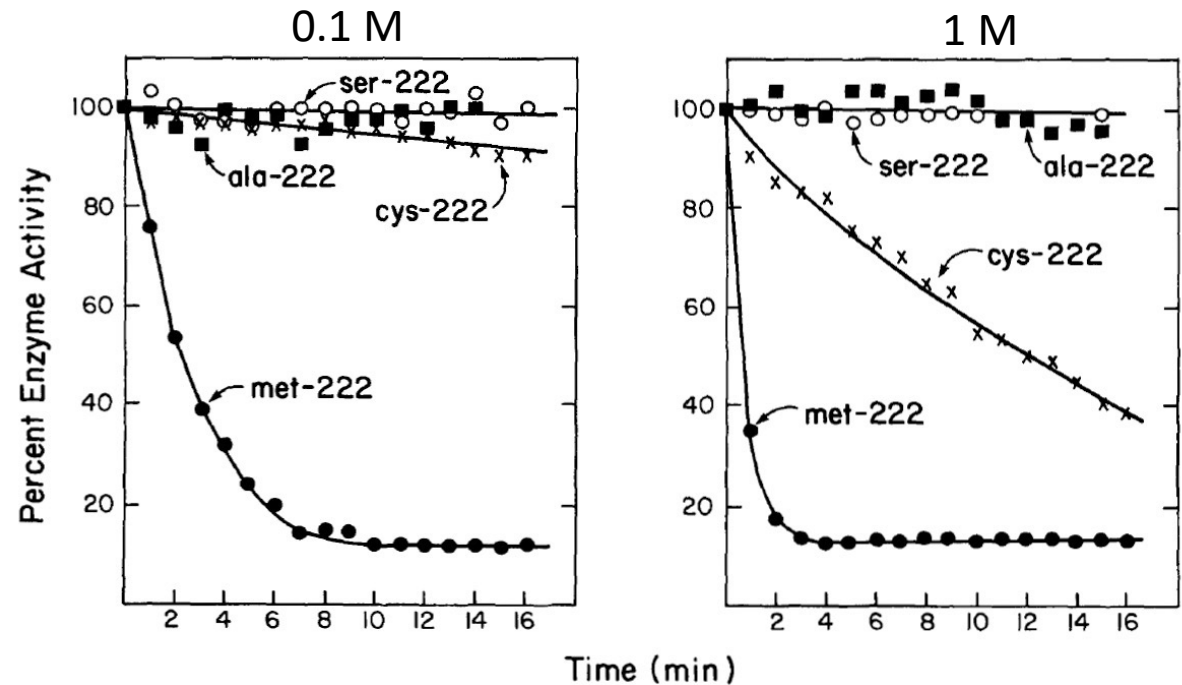
*Η M222 είναι το αμινοξύ που οξειδώνεται
Οξείδωση οδηγεί σε απώλεια δραστηριότητας >90 %*

*Estell et al. (1985) J Biol Chem **260**:6518–6521*

Πρώτο παράδειγμα συνθετικής βιολογίας

Codon 222	Relative specific activity
	%
Cys	138
Met	100
Ala	53
Ser	35
Gly	30
Thr	28
Asn	15
Pro	13
Leu	12
Val	9.3
Gln	7.2
Phe	4.9
Trp	4.8
Asp	4.1
Tyr	4.0
His	4.0
Glu	3.6
Ile	2.2
Arg	0.5
Lys	0.3

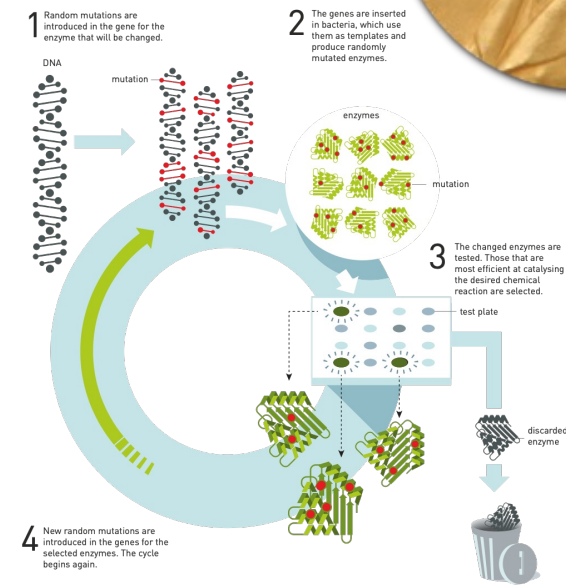
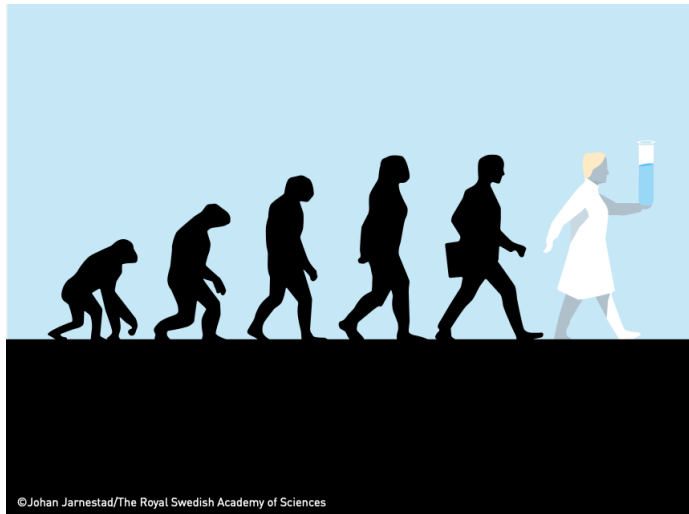
Estell et al. (1985)
J Biol Chem **260**:6518–6521



Codon 222	K_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m
	s^{-1}	M	$M^{-1} s^{-1}$
Met (wild-type)	$50 (\pm 1)$	$1.4 (\pm 0.05) \times 10^{-4}$	36×10^4
Cys	$84 (\pm 2)$	$4.8 (\pm 0.3) \times 10^{-4}$	20×10^4
Ser	$27 (\pm 1.8)$	$6.3 (\pm 0.6) \times 10^{-4}$	4×10^4
Ala	$40 (\pm 1)$	$7.3 (\pm 0.4) \times 10^{-4}$	5×10^4
Leu	$5 (\pm 0.1)$	$2.6 (\pm 0.2) \times 10^{-4}$	2×10^4

Επόμενο βήμα: κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση

“The Royal Swedish Academy of Sciences has decided to award the Nobel Prize in Chemistry 2018 with one half to **Frances H. Arnold**, CalTech, USA, “for the directed evolution of enzymes” ...”



©Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences

Κατευθυνόμενη εξέλιξη

Βασίζεται στις δύο βασικές δυνάμεις που παρατηρούνται και στην εξέλιξη στη φύση.

- 1) διαφοροποίηση μέσω τυχαίων μεταβολών στο γονίδιο
- 2) επιλογή για τον κατάλληλο φαινότυπο

Παραδείγματα εξέλιξης στη φύση μέχρι σήμερα:

- ❖ “Υπερμικροοργανισμοί” ανθεκτικοί σε αντιβιοτικά
- ❖ Φυτά ανθεκτικά σε ζιζανιοκτόνα
- ❖ Μικροοργανισμοί που καταναλώνουν συνθετικά πολυμερή

Τυχαία μεταλλαξιγένεση

- ❖ Δεν απαιτείται γνώση δομής ή μηχανισμού
- ❖ Σχετικά εύκολες μέθοδοι εισαγωγής μεταλλάξεων
(ακτινοβολήση με UV, χημικά μεταλλαξιγόνα, *error-prone PCR*)
- ❖ Ο ρυθμός μεταλλάξεων πρέπει να ρυθμιστεί
- ❖ Μεροληψία μεταλλάξεων
- ❖ Η πιθανότητα να συμβούν δύο συνεχόμενες μεταλλάξεις είναι χαμηλή

Τι χρειαζόμαστε;

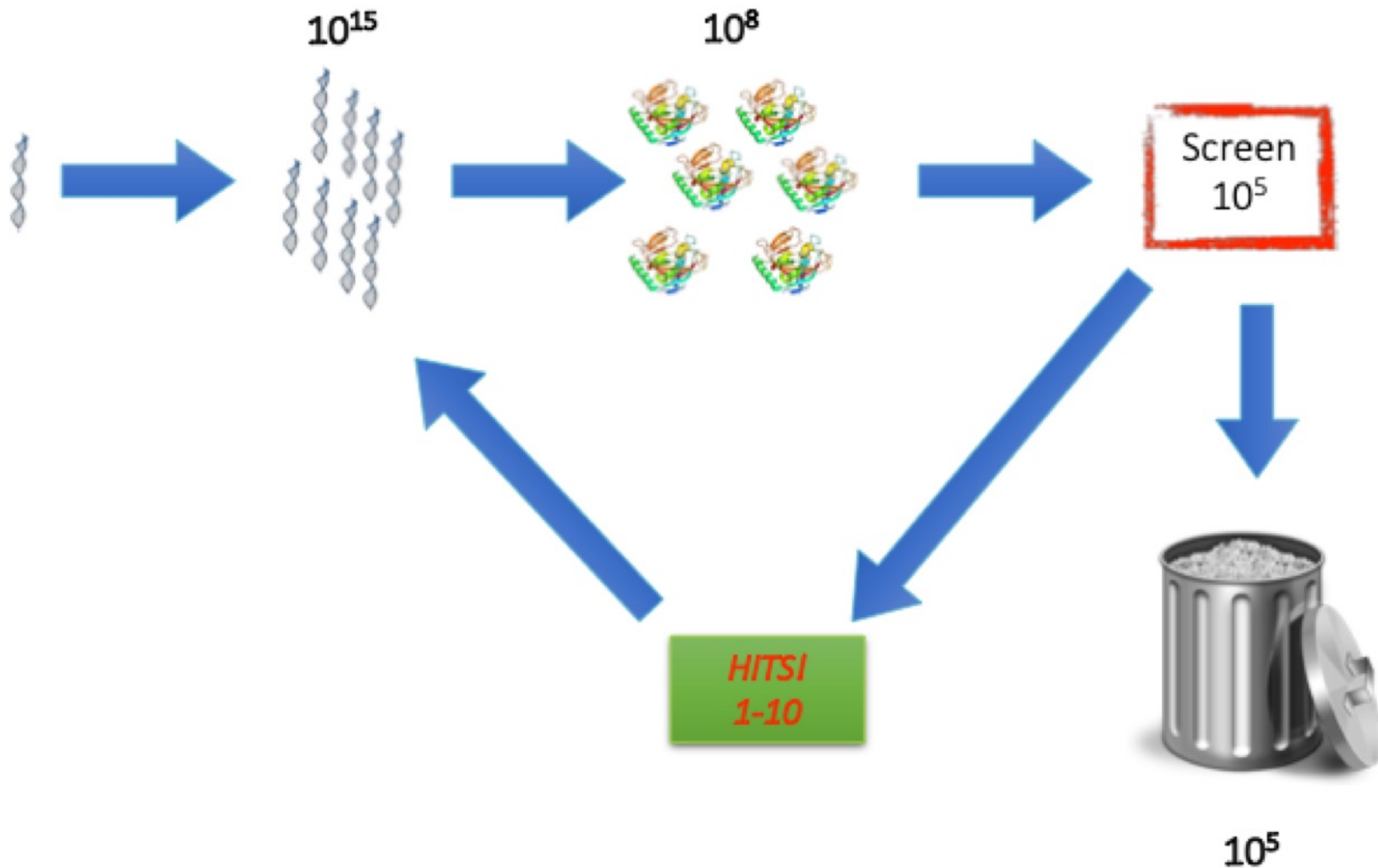
- ❖ Γονίδιο
- ❖ Λειτουργική έκφραση σε ένα ξενιστή (βακτηριακό)
- ❖ Αποδοτική στρατηγική μεταλλάξεων
- ❖ Γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδος διαλογής

Τυχαία μεταλλαξιγένεση σε κώδικα

1. Παρήγαγε ένα εύρος μεταλλαγμάτων από αυτο-πολλαπλασιαζόμενες μήτρες
2. Διαχώρισε και κλωνοποίησε τα μοναδικά μεταλλάγματα
3. Αυξήστε/πολλαπλασιάστε τους κλώνους
4. Εκφράστε τους κλώνους
5. Δοκιμάστε για τον επιθυμητό φαινότυπο
6. Προσδιορίστε την μετάλλαξη που οδηγεί στον επιθυμητό φαινότυπο
7. Επιστρέψτε στο **1.** με το δείγμα του βέλτιστου γονότυπου

M. Eigen, W. Gardiner (1984), Pure Appl. Chem. 56, 967-978.

Κατευθυνόμενη εξέλιξη



Το πρόβλημα των βιβλιοθηκών

Αριθμός πιθανών μεταλλαγμάτων με την εισαγωγή

M μεταλλάξεων σε αλληλουχία N αμινοξέων:

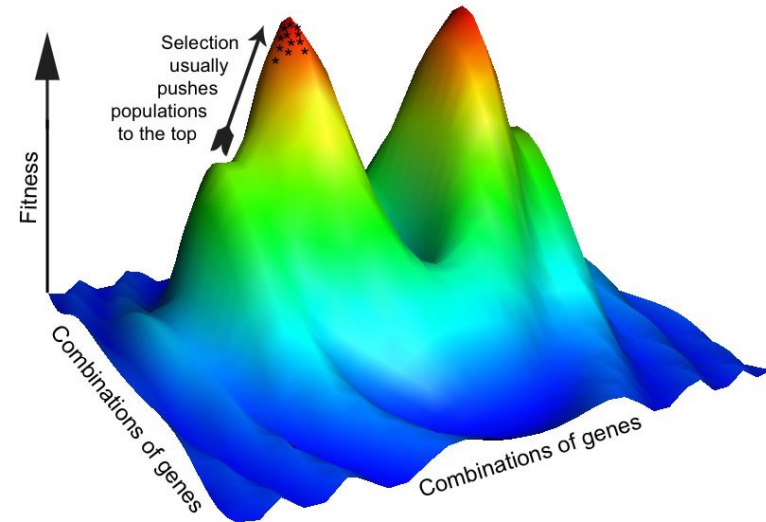
$$19^M [N! / (N-M)! M!]$$



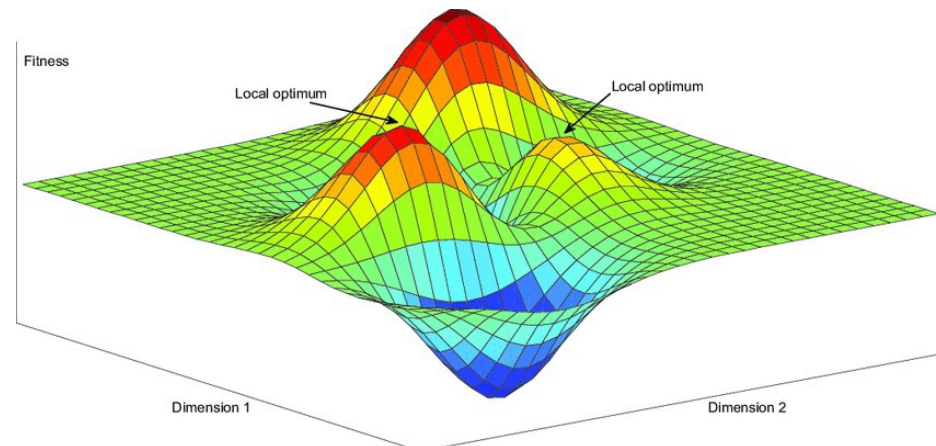
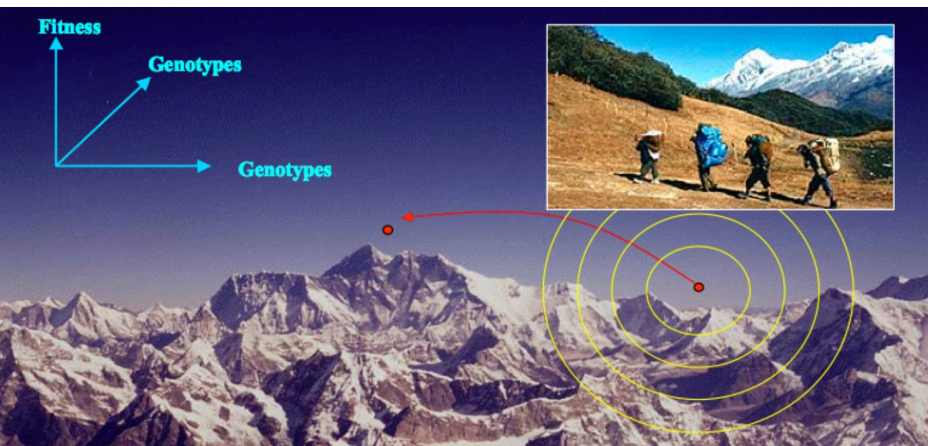
Μεταλλάξεις (M)	Μήκος αλληλουχίας (N)	
	10	200
1	190	3.800
2	16.245	7.183.900
3	823.080	9.008.610.600
4	27.367.410	8.429.807.368.950

Βασικές αρχές

- ❖ Κάθε πρωτεΐνη έχει σχετική «καταλληλότητα» για μία συγκεκριμένη λειτουργία (**Fitness**)
- ❖ Κάθε «κορυφή» αντιπροσωπεύει μια αλληλουχία με βέλτιστη καταλληλότητα για τη συγκεκριμένη λειτουργία.
- ❖ Δαρβινική «καταλληλότητα»: Επιβίωση ενός οργανισμού



fitness landscape



Μέθοδοι τυχαίας μεταλλαξιγένεσης

<i>Method</i>	<i>Pros</i>	<i>Cons</i>
Error-prone PCR	Easy to perform, mutation rate adjustable	Non-biased amino acid substitutions Only point mutations accessible
Mutator strains	Easy to perform	Entire organism/plasmid is mutated Only point mutations accessible
DNA-shuffling	Modest sequence homology sufficient Several parent genes can be used Creation of chimeras possible Useful mutations are combined, harmful ones lost	Requires sequence homology
StEP	Similar to DNA-shuffling, more simple No fragment purification necessary	Requires sequence homology PCR protocol must be specifically adapted
SHIPREC	No sequence homology required	Low diversity library in single round (might be repeated) Limited to two parents of similar length Deletions/duplications possible
ITCHY	Similar to SHIPREC	Similar to SHIPREC
THIO-ITCHY	Similar to ITCHY, but more efficient/easier	Similar to ITCHY
GSSM	All single amino acid substitutions are covered	Technically out of reach for most researchers

Μέθοδοι τυχαίας μεταλλαξιγένεσης

Error-prone PCR (επιρρεπής σε λάθη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

PCR με πολυμεράση χαμηλής πιστότητας

✓ εύκολη μέθοδος, στοχευμένες μεταλλάξεις σε περιοχές, αριθμός μεταλλάξεων ρυθμίζεται

Χ προβλήματα με κλωνοποίηση, όχι-στατιστική αλλαγή νουκλεοτιδίων

DNA- (gene-) shuffling

Πέψη και ανασυνδυασμός των κομματιών ενός γονιδίου

✓ μεταλλάξεις μόνο στα επιλεγμένα κομμάτια, συνεργατική επίδραση μέσω της χρήσης ομόλογων γονιδίων

Χ δύσκολη εφαρμογή/επαναληψιμότητα. συχνά προβλήματα με κλωνοποίηση

Μετάλλαξη στελεχών (χημικά / UV)

Φθορές στο DNA- Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης εισάγουν μεταλλάξεις

✓ εύκολη μέθοδος, ~ 1 μετάλλαξη ανά 1000 βάσεις

Χ Όλο το πλασμίδιο ή το γονιδίωμα δέχεται μεταλλάξεις

epPCR

- ❖ Αναπτύχθηκε από τους Leung et al. (1989) και τροποποιήθηκε από τους Cadwell & Joyce (1992)
- ❖ Αρχή: PCR κάτω από συνθήκες που αυξάνουν το ρυθμό λάθους (χρήση πολυμερασών χαμηλής πιστότητας ή μη βέλτιστων συνθηκών)
- ❖ Ποσοστό εισαγωγής λάθους 0.5-2.0%
- ❖ Η epPCR είναι μια αρκετά μεροληπτική τεχνική
- ❖ Λάθος υπόθεση: όλες οι μεταλλάξεις συμβαίνουν με τον ίδιο ρυθμό, και για αυτό όλες οι μεταλλάξεις αντιπροσωπεύονται σε μία βιβλιοθήκη ισότιμα.

Μεροληψία κωδικονίου

Μεροληψία πολυμεράσης

Μεροληψία πολλαπλασιασμού

epPCR

Step 1: Set up reactions for PCR

- 1.1 Add to a 0.2 ml PCR tube on ice:
- 100 ng template DNA
 - 10 μ l 10X polymerase buffer
 - 10 μ l 2 mM dNTP mix
 - 1 μ l 100 μ M Forward primer
 - 1 μ l 100 μ M Reverse primer
 - 1 μ l 5 U/ μ l polymerase
 - water to 100 μ l

Step 2: Generate additional template for mutagenesis

- 2.1 Run PCR with the following conditions:
- | | |
|------------|-----------------|
| 94°C | 5 min |
| 10 cycles: | |
| 94°C | 30 sec |
| 55-65°C | 30 sec |
| 72°C | 30 sec to 5 min |

Step 3: Perform mutagenic PCR

- 3.1 Add 1 μ l 500 μ M MnCl₂ to the PCR reaction
Mix well

- 3.2 Return tube to thermocycler and continue PCR with the following conditions:
- 30 cycles:
- | | |
|---------|-----------------|
| 94°C | 30 sec |
| 55-66°C | 30 sec |
| 72°C | 30 sec to 5 min |
| 72°C | 5-10 min |
| 4°C | hold |

Step 4: Subclone and sequence the PCR products

- 4.1 Run 10 μ l of the PCR products on an agarose gel

Single band of correct size

4.2 Check the purity of the PCR products

Multiple bands

- 4.2 Clean up PCR reaction using a PCR purification kit

ή ανασυνδυαστικές τεχνικές όπως
MEGAWHOP

- 4.2 Run remainder of PCR reaction on an agarose gel
Isolate the correct band using a DNA gel extraction kit

- 4.3 Digest purified PCR product and vector DNA
Add to a 1.5 ml tube:
- | | |
|-------------------------------|------------------|
| DNA | 1-2 μ g |
| 10X restriction enzyme buffer | 5 μ l |
| 10X BSA | 5 μ l |
| Restriction enzyme(s) | 1 μ l |
| Water | up to 50 μ l |
- Incubate at 37°C, 1-2 h

- 4.4 Run digested DNAs on an agarose gel
Isolate bands using a DNA gel extraction kit

- 4.5 Ligate PCR product and vector
Add to a 1.5 ml tube:
- | | |
|--------------------------|------------------|
| 10X T4 DNA ligase buffer | 2 μ l |
| Digested vector DNA | 50-100 ng |
| Digested PCR products | 100-300 ng |
| T4 DNA ligase | 1 μ l |
| Water | up to 20 μ l |
- Incubate at room temperature, 1-2 h or O/N at 16°C

- 4.6 Transform competent *E. coli* and spread on selective plates
Grow O/N at 37°C

- 4.7 Pick single colonies into 5 ml LB + antibiotic
Grow O/N at 37°C with shaking

- 4.8 Isolate plasmid DNA using a plasmid miniprep kit
Sequence inserts to determine whether they contain mutations

epPCR

Step 1: Set up reactions for PCR

- 1.1 Add to a 0.2 ml PCR tube on ice:
- 100 ng template DNA
 - 10 μ l 10X polymerase buffer
 - 10 μ l 2 mM dNTP mix
 - 1 μ l 100 μ M Forward primer
 - 1 μ l 100 μ M Reverse primer
 - 1 μ l 5 U/ μ l polymerase
 - water to 100 μ l

Step 2: Generate additional template for mutagenesis

- 2.1 Run PCR with the following conditions:
- | | |
|------------|-----------------|
| 94°C | 5 min |
| 10 cycles: | |
| 94°C | 30 sec |
| 55-65°C | 30 sec |
| 72°C | 30 sec to 5 min |

Step 3: Perform mutagenic PCR

- 3.1 Add 1 μ l 500 μ M $MnCl_2$ to the PCR reaction
Mix well

- 3.2 Return tube to thermocycler and continue PCR with the following conditions:
- | | |
|------------|-----------------|
| 30 cycles: | |
| 94°C | 30 sec |
| 55-66°C | 30 sec |
| 72°C | 30 sec to 5 min |
| 72°C | 5-10 min |
| 4°C | hold |

Step 4: Subclone and sequence the PCR products

- 4.1 Run 10 μ l of the PCR products on an agarose gel

Single band of correct size

4.2 Check the purity of the PCR products

Multiple bands

- 4.2 Clean up PCR reaction using a PCR purification kit

- 4.2 Run remainder of PCR reaction on an agarose gel
Isolate the correct band using a DNA gel extraction kit

Random fragment



Specific fragment



Fragment having homologous ends



Megaprimer

MEGAWHOP



Template vector



MEGAWHOP

1. Megaprimer hybridization to a vector
2. Whole plasmid amplification by PCR
3. *DpnI* treatment
4. Transformation

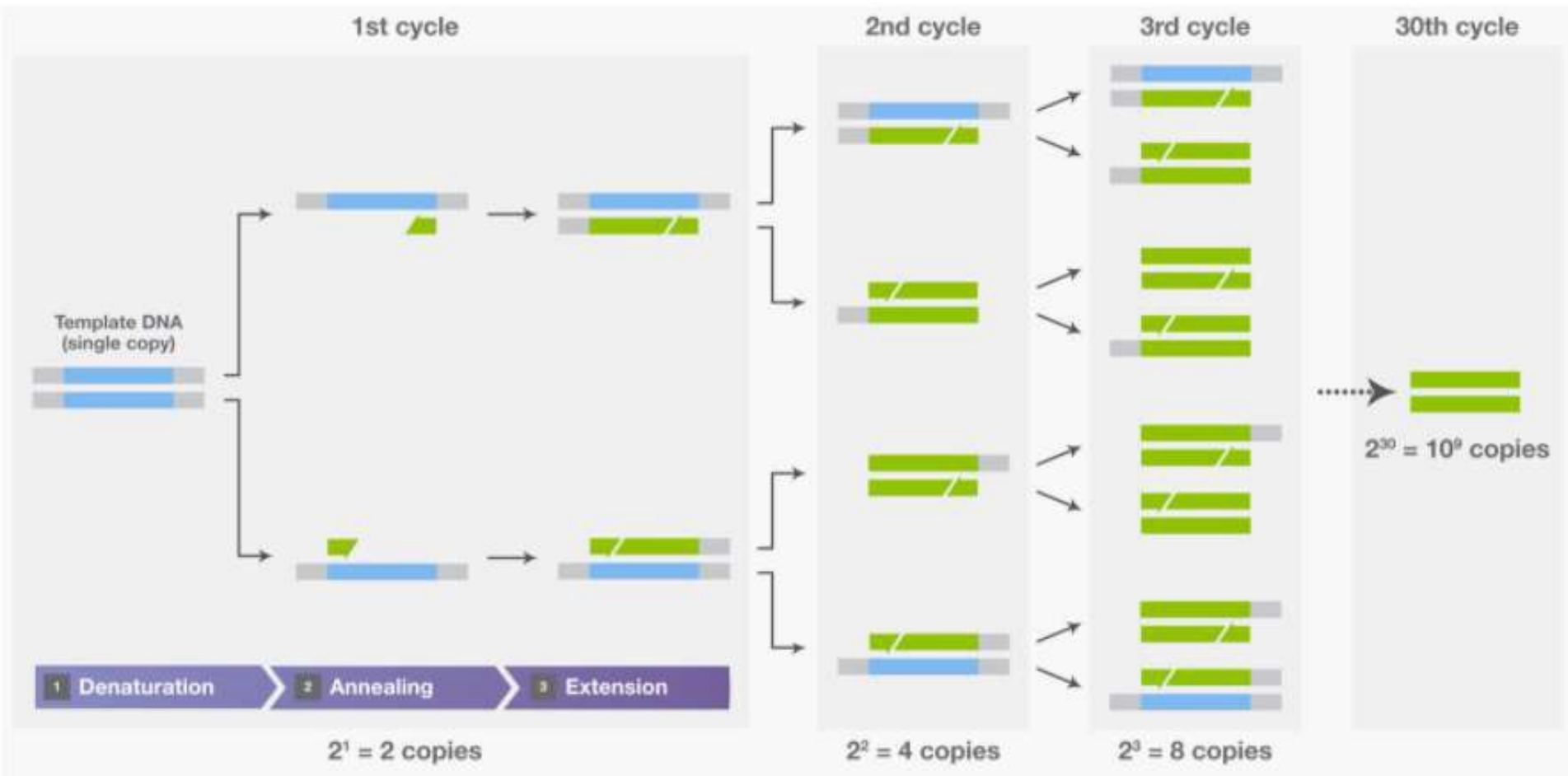


Recombinant vector

- 4.7 Pick single colonies into 5 ml LB + antibiotic
Grow O/N at 37°C with shaking

- 4.8 Isolate plasmid DNA using a plasmid miniprep kit
Sequence inserts to determine whether they contain mutations

PCR

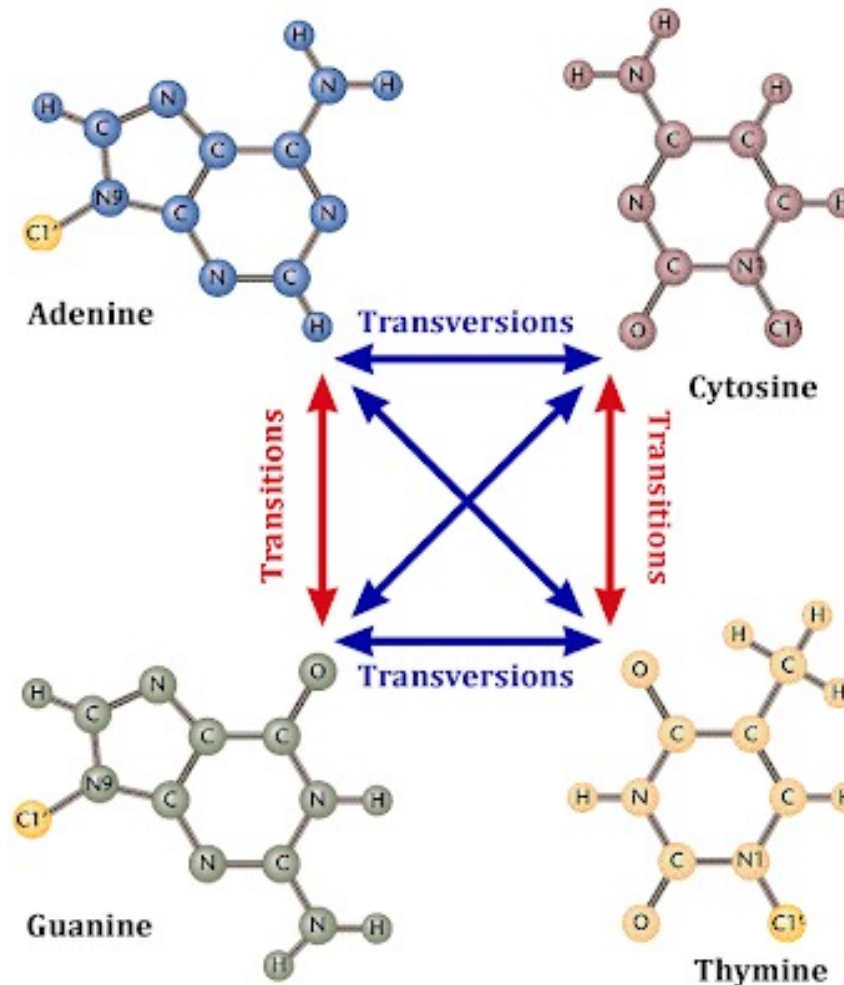


Transversions / Transitions

Μεταστροφές / Μεταβάσεις

Πουρίνες

Πυριμιδίνες



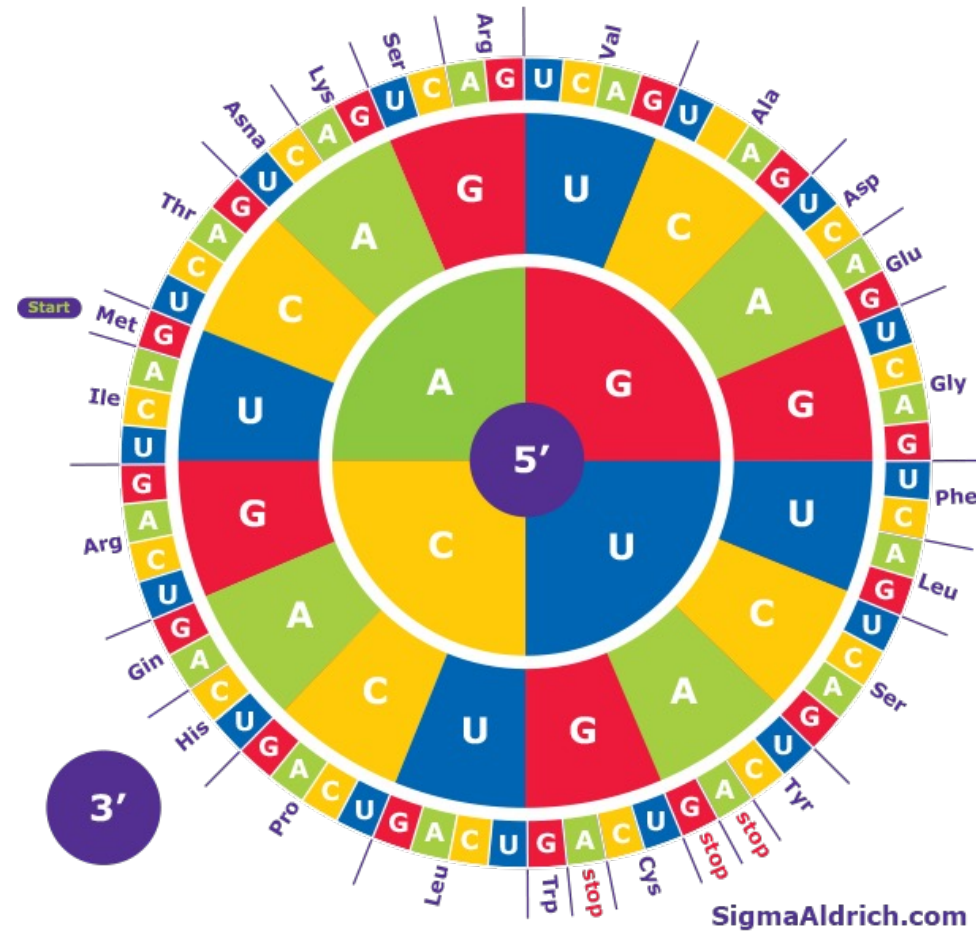
Μεροληψία κωδικονίου (codon bias)

Εκφυλισμένος γενετικός κώδικας

$4^3 = 64$ κωδικόνια

πολλά κωδικόνια κωδικοποιούν
ένα αμινοξύ

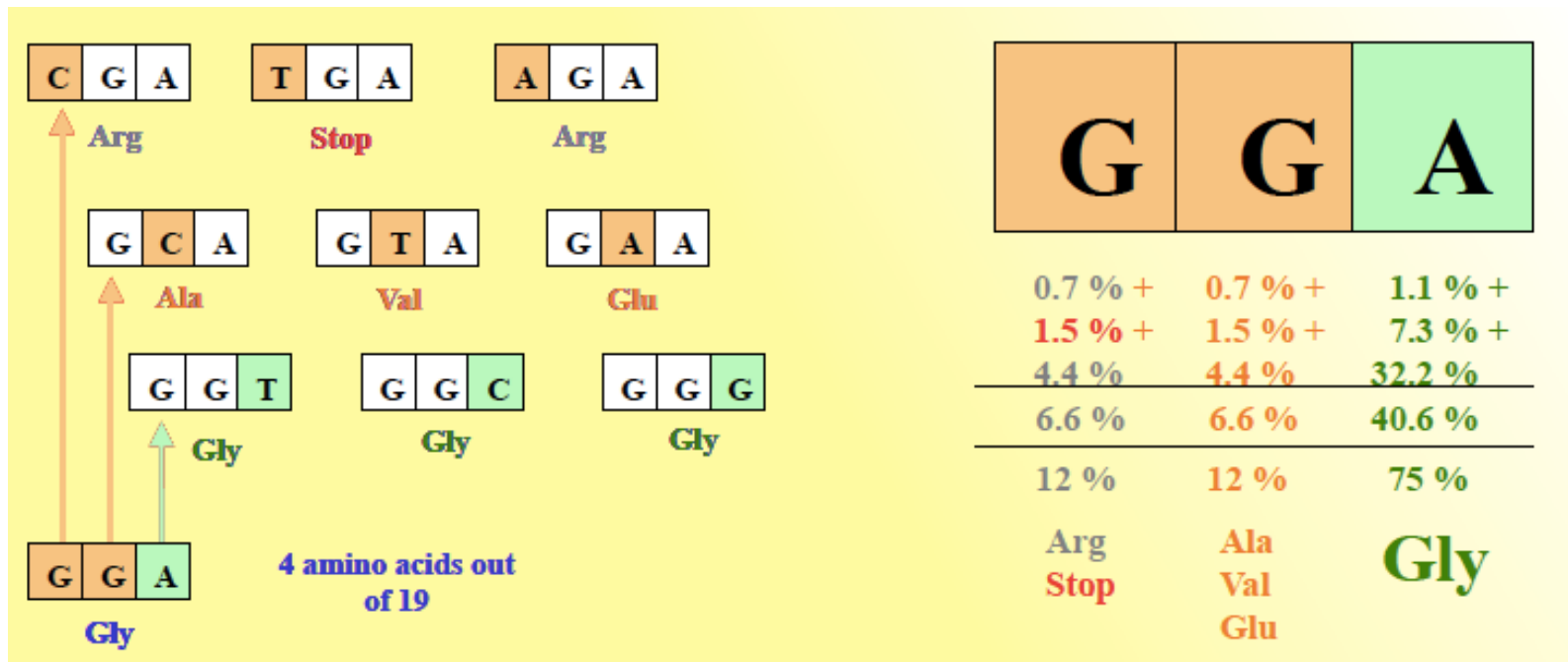
Στατιστικά έχει αποδειχθεί πως
μόνο 5.7 αμινοξέα είναι
προσβάσιμα από τα 20 αμινοξέα



Lutz, Patrick (2004), *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 291.
Neylon (2004), *Nucl. Acid Res.* 32, 1448.

Μεροληψία κωδικονίου

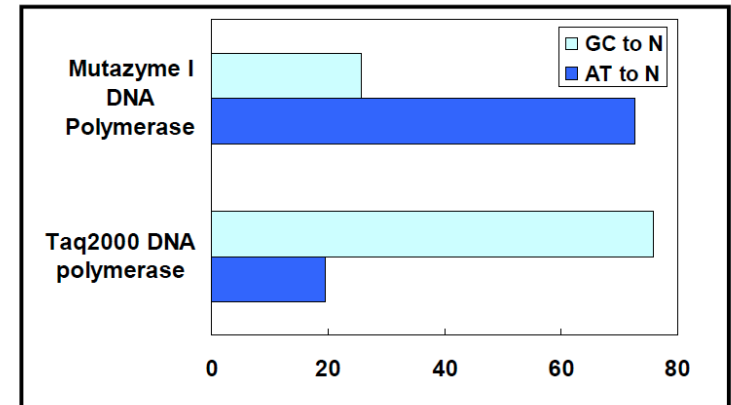
- ❖ Οι πολυμεράσες μπορεί να έχουν προτίμηση σε κάποιες μεταλλάξεις
- ❖ Ο εκφυλισμός γενετικού κώδικα δίνει αρκετές σιωπηρές μεταλλάξεις
- ❖ Δυσκολία να εισαχθούν 2-3 μεταλλάξεις στο ίδιο κωδικόνιο.



Μεροληψία πολυμεράσης

Κάτω από ίδιες συνθήκες, διαφορετικές πολυμεράσες εισάγουν διαφορετικές βάσεις (ακόμα και Taq πολυμεράσες)

Μπορεί να μειωθεί η μεροληψία δουλεύοντας με μείγμα πολυμερασών



Mutation frequencies and spectra resulting from *Taq*- and Mutazyme-based error-prone PCR and subsequent StEP shuffling

	Number of mutations (19,120 bp sequenced)	Mutation frequency ^a	Substitution (%)						Insertion (%)	Deletion (%)	Bias indicators			
			AT → GC	GC → AT	AT → TA	AT → CG	GC → CG	GC → TA			Ts/Tv	AT → GC/ GC → AT	AT changes (%)	GC changes (%)
<i>Taq</i> error-prone PCR	216	1.13% (0.98;1.29)	51.8	11.1	22.7	5.6	1.8	2.8	1.4	2.8	1.9	4.7	80.1	15.7
Mutazyme error-prone PCR	36	0.19% (0.13;0.26)	22.2	27.8	13.9	5.6	2.8	19.4	0.0	8.3	1.2	0.8	41.7	50
StEP shuffling	121	0.63% ^b (0.53;0.76)	50.4	13.2	17.4	5	4.1	4.1	0.8	5	2.1	3.8	72.8	21.4

Vanhercke et al. (2005) *Anal Biochem* **339**: 9-14

Πολυμεράσες για PCR

Taq polymerase fidelity 1(error):3700

■ Table 5.5 DNA polymerases and their properties, arranged in the order of increasing fidelity

DNA polymerases	Extension rate	3'→5' exonuclease activity	Fidelity (vs Taq)
Taq	1 min/kb	×	1×
OneTaq	1 min/kb	✓	2×
Platinum Taq HiFi	1 min/kb	✓	6×
KOD	7–20 sec/kb	✓	12×
PfuUltra	1 min/kb	✓	19×
PfuUltra II Fusion HS	15 sec/kb	✓	20×
AccuPrime Pfx	1 min/kb	✓	26×
Phusion	15–30 sec/kb	✓	39–50×
Q5	20–30 sec/kb	✓	280×
Platinum SuperFi II	15–30 sec/kb	✓	300×

Μεροληψία πολλαπλασιασμού

εκθετική φύση της PCR

Υπερ-παρουσίαση κάποιων μεταλλάξεων

Κάποια μετάλλαξη που εισήχθηκε στον πρώτο κύκλο μπορεί να υπάρχει στο 25% της βιβλιοθήκης

Πιθανές λύσεις:

- ❖ Σπάσιμο του όγκου της αντίδρασης σε πολλά δείγματα, ώστε να δημιουργηθούν πολλές βιβλιοθήκες και να τις αναμείξουμε μετά
- ❖ Μείωση του αριθμού των κύκλων της PCR

Αποτελέσματα μεροληψιών

Methods	Transitions		Transversions				InDel	T _f /T _v	Reference
	AT → GC	GC → AT	AT → TA	AT → CG	GC → CG	GC → TA			
Ideal method	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	0.0	0.5	Wong et al. (2006a), Wong et al. (2006b)
Taq/MnCl ₂ and imbalanced dNTP concentration	38.1	19.0	27.8	4.0	0.0	6.3	4.8	1.5	Rasila et al. (2009)
Taq/8-oxo-dGTP and dPTP	65.4	27.5	1.6	4.4	0.0	0.0	1.1	15.5	Rasila et al. (2009)
Mutazyme/Amplicon	14.0	32.5	15.1	2.3	5.8	22.1	8.3	1.0	Rasila et al. (2009)
Mutazyme/Cycle	17.1	25.7	28.6	2.9	0.0	14.3	11.4	0.9	Rasila et al. (2009)
XL1-Red	0.0	60.0	10.0	0.0	0.0	0.0	30.0	6.0	Rasila et al. (2009)
NH ₂ OH-HCl	15.4	76.9	7.7	0.0	0.0	0.0	0.0	12.0	Rasila et al. (2009)
DuARChEM	13.5	26.9	1.9	5.8	42.3	9.6	0.0	0.7	Mohan and Banerjee (2008)
Taq/D ₂ O	50.0	37.5	12.5	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0	Minamoto et al. (2012)
Taq/D ₂ O and MnCl ₂	60.0	12.0	8.0	8.0	4.0	8.0	0.0	2.6	Minamoto et al. (2012)
dITP and endonuclease V	38.4	39.7	4.6	8.6	4.6	4.0	0.0	3.6	Wang et al. (2013c)
epRCA with Cre/loxP recombination	6.7	86.7	0.0	0.0	6.7	0.0	0.0	13.9	Huovinen et al. (2011)
SeSaM-Tv-II	15.2	18.3	1.8	1.8	33.9	29.1	0.0	0.5	Mundhada et al. (2011)
TaGTEAM	6.1	10.2	18.4	0.0	14.3	26.5	24.5	0.3	Finney-Manchester and Maheshri (2013)

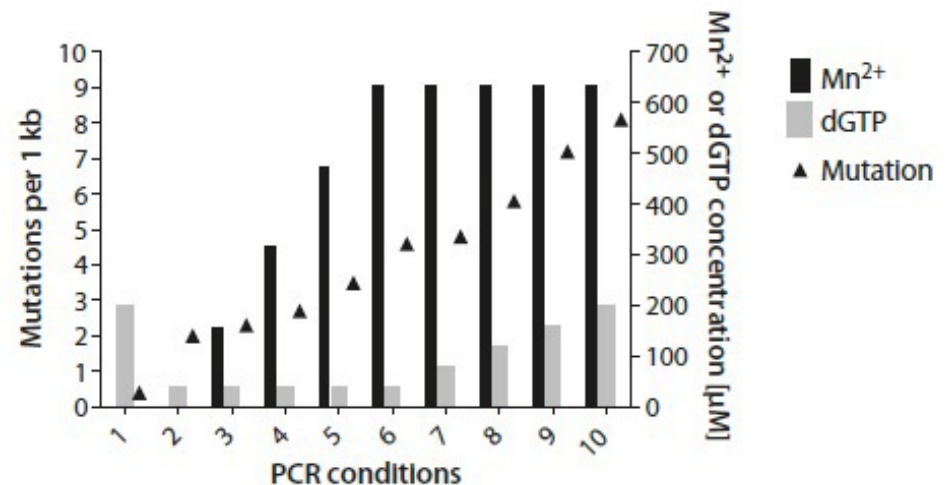
Μέθοδοι εισαγωγής μεταλλάξεων

Οι συγκεντρώσεις των μετάλλων επηρεάζουν την πιστότητα της πολυμεράσης.

MgCl₂: σταθεροποιεί τα μη συμπληρωματικά ζεύγη. Είναι απαραίτητο για την πολυμεράση.

MnCl₂: προστίθεται για να μειώσει την εξειδίκευση της πολυμεράσης (συσχετίζεται και με την θερμοκρασία υβριδισμού)

Συγκεκριμένες πολυμεράσες επηρεάζονται από τη συγκέντρωση του DNA εκμαγείου

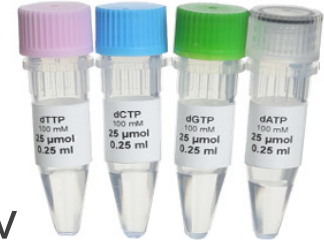


Μέθοδοι εισαγωγής μεταλλάξεων

Μη ισόποση προσθήκη dNTPs

Σε κλασική PCR προστίθενται σε ίση συγκεντρωση

Μεταλλάξεις έως 10% της αλληλουχίας μπορούν να επιτευχθούν



dNTP/μM				Mn ²⁺ mM	Colonies sequenced	No. mut. ^a	Ti/Tv ^b	N→A,T ^c	N→G,C ^d	Mutation frequency ^e
C	T	A	G							
1	1000	50	50	–	37 trim ^R	126	125/1	121	5	1.5×10^{-2}
1	1000	50	50	–	24 ampi ^R	162	157/5	157	5	2.9×10^{-2}
3	1000	50	50	–	20 trim ^R	24	22/2	24	0	5.2×10^{-3}
3	1000	50	50	–	20 ampi ^R	29	27/2	28	1	6.3×10^{-3}
10	1000	50	50	–	20 trim ^R	15	12/3	12	3	3.2×10^{-3}
10	1000	50	50	–	22 ampi ^R	21	16/5	19	2	4.1×10^{-3}
5	1000	5	1000	–	18 trim ^R	3	3/0	3	0	7.2×10^{-4}
5	1000	5	1000	–	18 ampi ^R	0	0/0	0	0	$\leq 10^{-4}$
30	1000	30	1000	–	18 ampi ^R	4	4/0	1	3	10^{-3}
30	1000	30	1000	0.5	34 ampi ^R	755	521/234	256	499	10^{-1}
100	1000	100	1000	0.5	18 trim ^R	19	16/3	8	11	4.5×10^{-3}
100	1000	100	1000	0.5	24ampiR	41	33/8	11	30	7.4×10^{-3}

Vartanian et al. (1996) Nucl Acids Res **24**: 2627-31

Μέθοδοι εισαγωγής μεταλλάξεων

Protocol	A	B	C	D	E	F
MgCl ₂	8.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
MnCl ₂	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
dATP	40	20	4	200	20	20
dGTP	40	20	200	20	200	20
dCTP	200	200	200	200	200	200
dTTP	200	200	200	200	200	200
dITP		200				
Clones sequenced	4	4	10	6	6	5
Transitions	2.5	2.75	17.7	3.67	3.5	3.8
Transversions	2.5	3.0	1.4	2.5	2.17	3.0
Mutation rate	2.1	2.6	7.1	2.5	2.3	2.5

Brakmann & Lindemann, (2004) in *Evolutionary Methods in Biotechnology. Clever Tricks for Directed Evolution* (Brakmann, S. & Schwienhorst, A., eds) pp. 5-11

Types of mutations	Ideal	GeneMorph II random mutagenesis kit ^a	Taq, 0 mM Mn ²⁺ , 7 mM Mg ²⁺ , 0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 1 mM dTTP, 1 mM dCTP ^b	Taq, 0.15 mM Mn ²⁺ , 7 mM Mg ²⁺ , 0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 1 mM dTTP, 1 mM dCTP ^b	Taq, 0.5 mM Mn ²⁺ , 7 mM Mg ²⁺ , 0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 1 mM dTTP, 1 mM dCTP ^b	Diversify PCR random mutagenesis kit (0 μM Mn ²⁺ , 40 μM dGTP) ^f	Diversify PCR random mutagenesis kit (640 μM Mn ²⁺ , 40 μM dGTP) ^f	Diversify PCR random mutagenesis kit (640 μM Mn ²⁺ , 200 μM dGTP) ^c
Bias indicators								
Ts/Tv	0.5	0.8	1.1	1.2	0.8	0.9	1.3	3.9
AT→GC/ GC→AT	1.0	0.6	1.5	2.1	2.0	4.0	3.7	15.1
A→N, T→N	50%	50.7%	70.0%	80.0%	75.8%	77.8%	77.0%	91.9%
G→N, C→N	50%	43.7%	26.7%	22.5%	19.5%	8.3%	17.8%	7.3%
Transitions, Ts								
A→G, T→C	16.7%	17.5%	30.0%	37.5%	27.6%	33.3%	42.7%	74.0%
G→A, C→T	16.7%	25.5%	20.0%	17.5%	13.6%	8.3%	11.5%	4.9%
Transversions, Tv								
A→T, T→A	16.7%	28.5%	33.3%	37.5%	40.9%	16.7%	26.0%	13.8%
A→C, T→G	16.7%	4.7%	6.7%	5.0%	7.3%	27.8%	8.3%	4.1%
G→C, C→G	16.7%	4.1%	0.0%	0.0%	1.4%	0.0%	0.0%	1.6%
G→T, C→A	16.7%	14.1%	6.7%	5.0%	4.5%	0.0%	6.3%	0.8%
Insertions and deletions (InDel)								
Insertions (In)	0.0%	0.7%	0.0%	0.0%	0.3%	2.8%	2.1%	0.0%
Deletion (Del)	0.0%	4.8%	3.3%	0.0%	4.2%	11.1%	3.1%	0.8%
Mutation frequency								
Mutations/ kb	N/A	3.0–16.0	1.1	1.9	4.9	2.0	4.6	8.1



Κατευθυνόμενη εξέλιξη

Προβλήματα epPCR:

- Πόσες μεταλλάξεις είναι αναγκαίες για να φτάσουμε στο επιθυμητό αποτέλεσμα;
- Αρνητικές μεταλλάξεις μπορεί να κρύβουν μία επιθυμητή μετάλλαξη

Μία πιθανή λύση : **Casting epPCR (2017)**

	Mutation load ^a (mutations/kb target region)	Average ^{a1} mutations/fragment	Mutation load ^{a2} (mutations/kb entire gene)	Number of mutations	Consecutive mutation ratio ^b	TS/TV ratio	Number of nucleotides sequenced (kb)	Active fraction of the population ^d (%)
Fragment 1 (147 bp) cepPCR	21.7	3.2 (Fragment 1)	5.9	576	0.052	1.8	26.46	18
Fragment 2 (192 bp) cepPCR	31.2	6.2 (Fragment 2)	11.2	624	0.077	2.3	19.39	15
Fragment 3 (204 bp) cepPCR	33.3	6.8 (Fragment 3)	12.5	611	0.075	1.5	18.36	15
epPCR-low ^c (543 bp)	3.1	1.7 (bsla)	3.0	1000	0.000	4.6	318	55
epPCR-high ^c (543 bp)	11.7	6.3 (bsla)	11.6	1000	0.028	2.9	85	15



Βιβλιογραφία

- ❖ J.S. Dymond (2013) PCR-Based random mutagenesis, *Methods in Enzymology*, **529**: 249-258.
- ❖ T.S. Wong and K.L. Tee (2020) A practical guide to protein engineering. Springer
- ❖ K.L. Tee, T.S. Wong (2013) Polishing the craft of genetic diversity creation in directed evolution. *Biotechnology Advances*, **31**: 1707-1721.
- ❖ K. Miyazaki (2011) MEGAWHOP cloning: A method of creating random mutagenesis libraries via megaprimer PCR of whole plasmids. *Methods in Enzymology*, 498: 399-406.
- ❖ Ενδιαφέροντα παραδείγματα εφαρμογής epPCR για την εξέλιξη πρωτεϊνών από τον Aurelio Hidalgo (Autonomous University of Madrid).