

Πρωτεϊνική Μηχανική

Ιωάννης Παυλίδης
Τμήμα Χημείας | Πανεπιστήμιο Κρήτης

E-mail: ipavlidis@uoc.gr

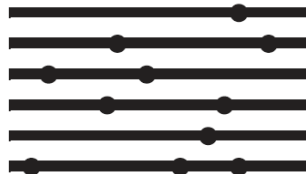
Τηλ.: +30 2810 54-5130 | Γραφείο Γ211

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

Κλάσεις βιβλιοθηκών

A. 

Τυχαία μεταλλαξιγένεση



B. 

Ανασυνδυασμός



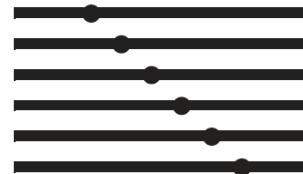
C. 

Τοποκατευθυνόμενη
διαφοροποίηση
(Site-directed
diversification)

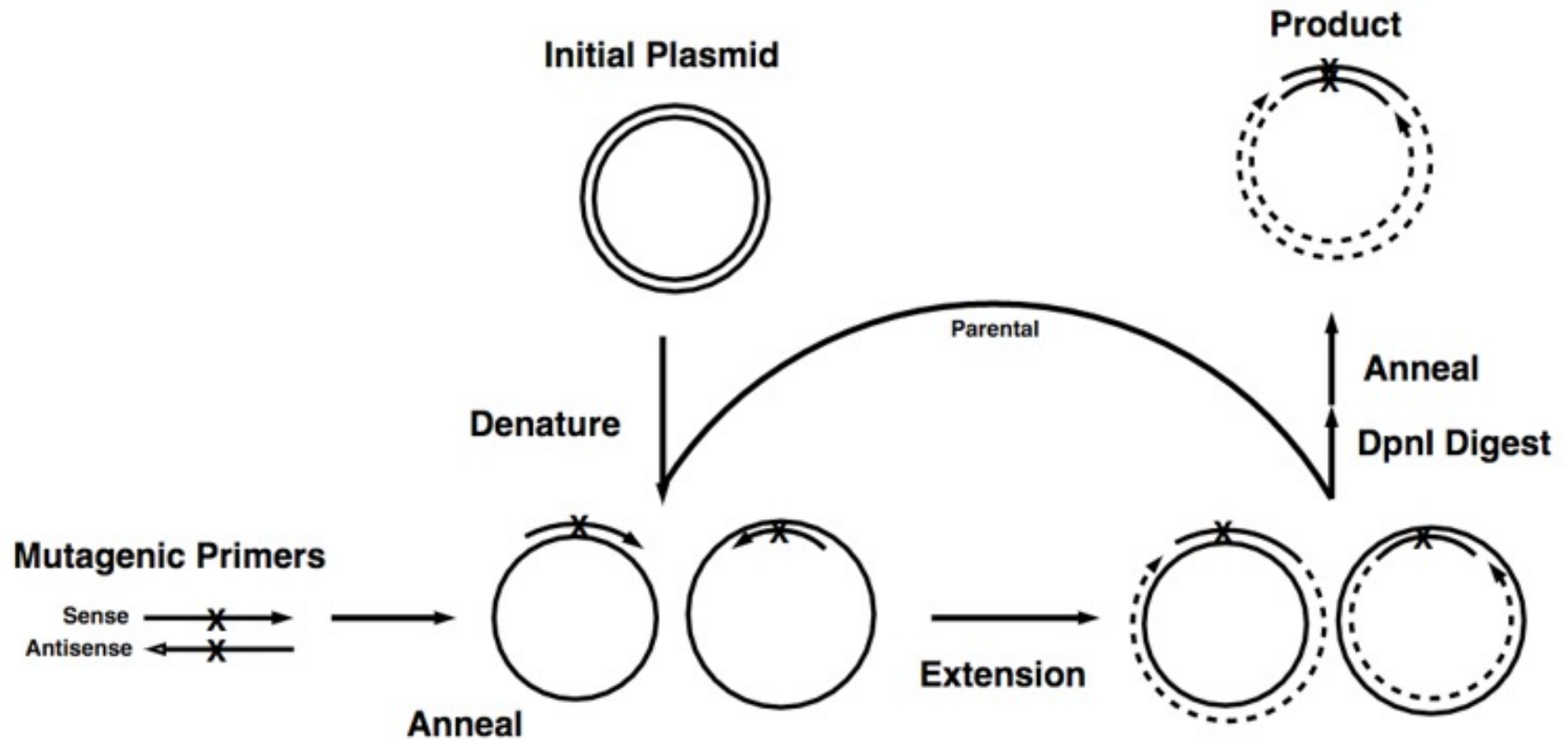


D. 

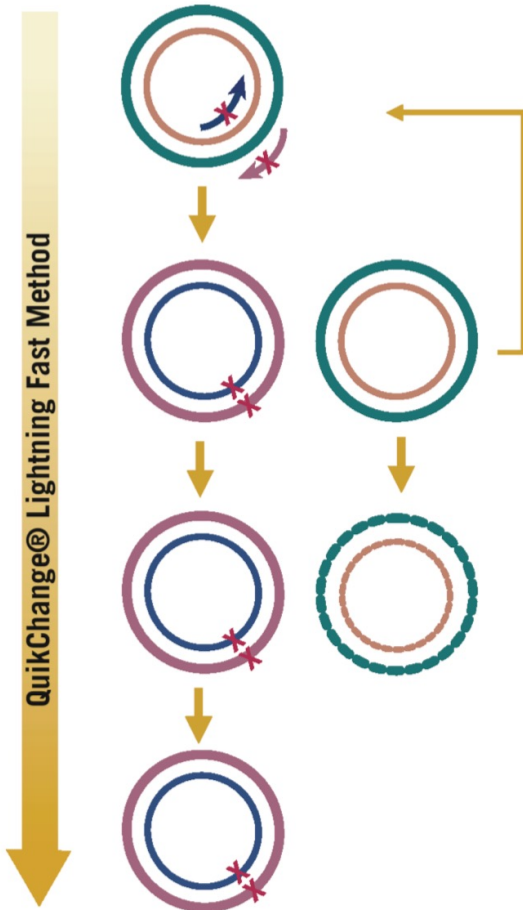
Μεταλλαξιγένεση
σάρωσης
(Scanning
mutagenesis)



Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση



Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγέννεση



1. Mutant Strand Synthesis

Perform thermal cycling to:

- Denature DNA template
- Anneal mutagenic primers containing desired mutation
- Extend and incorporate primers with our exclusive *Pfu*-based DNA Polymerase Blend
- **Total reaction time: 1 hour***

2. Faster *Dpn* I Digestion of Template

- Digest parental methylated and hemimethylated DNA with NEW *Dpn* I enzyme
- **Total reaction time: 5 minutes**

3. Transformation

- Transform mutated molecules into competent cells for nick repair
- **Total reaction time: 1.5 hours**

* Based on a 5-kb plasmid; excludes ramping time.

Nick ends

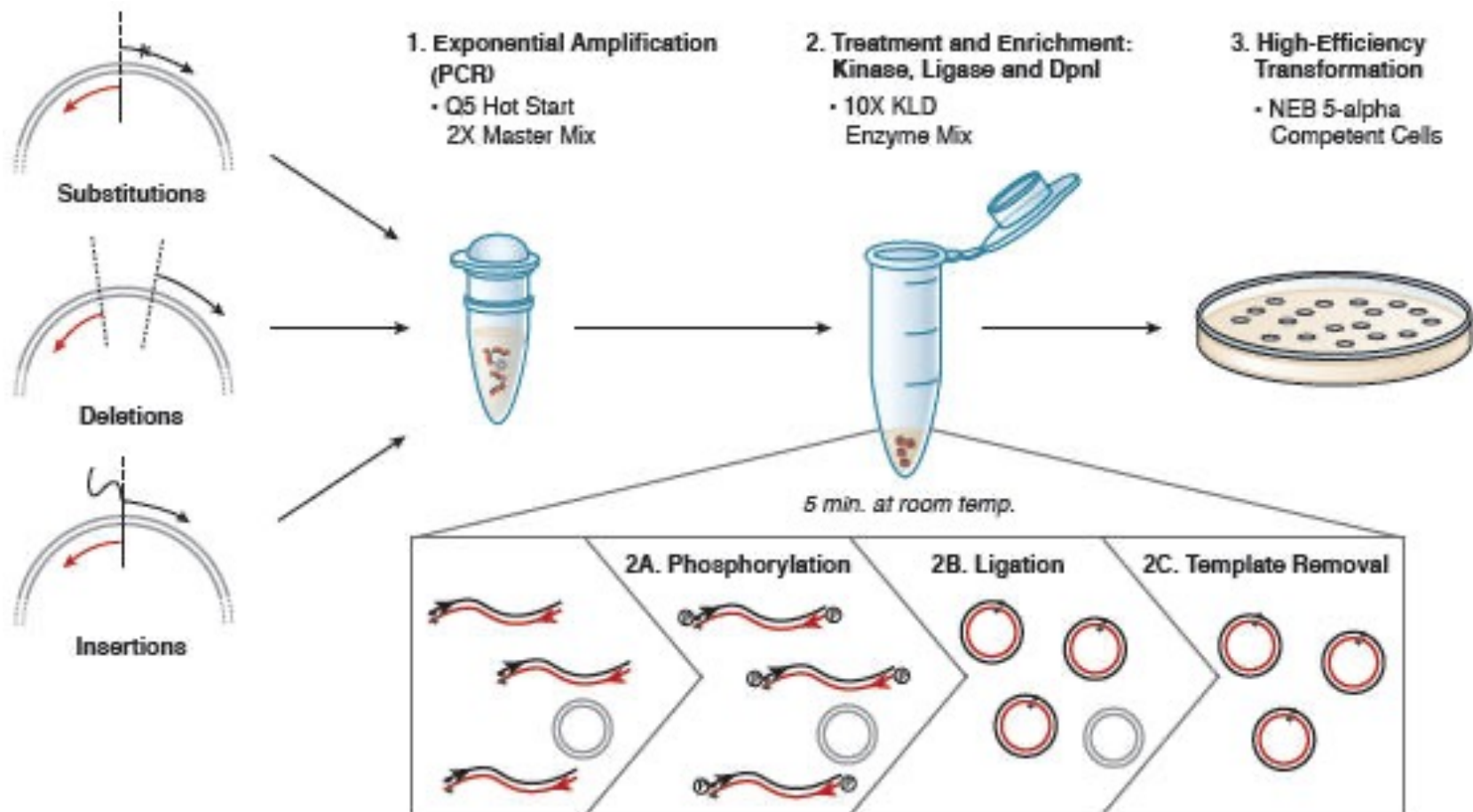
Μονήρεις εγκοπές σε διαφορετικά σημεία στο DNA

Χρήση στελέχους *E.coli* με ικανότητα επιδιόρθωσης (*recA*)

Αποφυγή χρήσης φωσφορυλάσης, λιγάσης κτλ

https://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes

Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση



Σχεδιασμός εκκινητών

Συνήθες μήκος: 20-30 νουκλεοτίδια

Θα πρέπει να έχει αρκετά νουκλεοτίδια που να υβριδίζονται, ειδικά προς το 3' άκρο

Προσοχή σε επίπεδο GC (%), θερμοκρασία τήξης και άκρα του εκκινητή

Βήμα στο επόμενο σεμινάριο – σχεδιασμός εκκινητών

Εισαγωγή 2-3 μεταλλάξεις σε επίπεδο αμινοξέος

Αν οι θέσεις είναι μακριά, πρέπει να γίνει σε διαδοχικές PCR

Κωδικοποίηση εκκινητών

- ❖ Οι εκκινητές συντίθενται χημικά από εταιρείες
- ❖ Μπορούμε να κωδικοποιήσουμε μείγμα βάσεων με συγκεκριμένους κωδικούς
- ❖ Η αναλογία των εκκινητών σε μείγμα είναι ισόποση

Symbol	Description	Bases represented				# of bases represented
A	Adenine	A				1
C	Cytosine		C			1
G	Guanine			G		1
T	Thymine				T	1
U	Uracil				U	1
S	Strong		C	G		2
W	Weak	A			T	2
K	Keto			G	T	2
M	Amino	A	C			2
R	Purine	A		G		2
Y	Pyrimidine		C		T	2
B	Not A (B comes after A)		C	G	T	3
D	Not C (D comes after C)	A		G	T	3
H	Not G (H comes after G)	A	C		T	3
V	Not T and U (V comes after T and U)	A	C	G		3
N	Any base	A	C	G	T	4

Εκφυλισμένα κωδικόνια

Για βιβλιοθήκες τοποκατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης χρησιμοποιούνται εκφυλισμένα κωδικόνια που δίνουν και τα 20 αμινοξέα

NNN: κωδικοποιεί 64 κωδικόνια (τρία κωδικόνια λήξης)

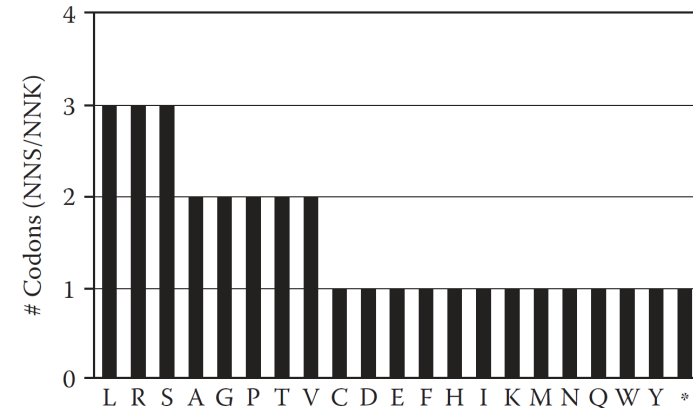
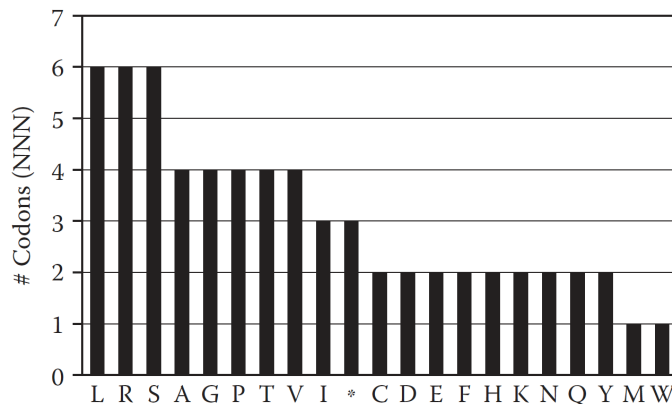
NNS: κωδικοποιεί 32 κωδικόνια (ένα κωδικόνιο λήξης)

NNK: κωδικοποιεί 32 κωδικόνια (ένα κωδικόνιο λήξης)

N: A, T, G, C

S: (strong) G, C

K: (keto) T, G



Εκφυλισμένα κωδικόνια - NNK

CODON USAGE IN *E. COLI* GENES¹

	Codon	Amino acid ²	% ³	Ratio ⁴	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	
U	UUU	Phe (F)	1.9	0.51	UCU	Ser (S)	1.1	0.19	UAU	Tyr (Y)	1.6	0.53	UGU	Cys (C)	0.4	0.43	U
	UUC	Phe (F)	1.8	0.49	UCC	Ser (S)	1.0	0.17	UAC	Tyr (Y)	1.4	0.47	UGC	Cys (C)	0.6	0.57	
	UUA	Leu (L)	1.0	0.11	UCA	Ser (S)	0.7	0.12	UAA	STOP	0.2	0.62	UGA	STOP	0.1	0.30	
	UUG	Leu (L)	1.1	0.11	UCG	Ser (S)	0.8	0.13	UAG	STOP	0.03	0.09	UGG	Trp (W)	1.4	1.00	
C	CUU	Leu (L)	1.0	0.10	CCU	Pro (P)	0.7	0.16	CAU	His (H)	1.2	0.52	CGU	Arg (R)	2.4	0.42	U
	CUC	Leu (L)	0.9	0.10	CCC	Pro (P)	0.4	0.10	CAC	His (H)	1.1	0.48	CGC	Arg (R)	2.2	0.37	
	CUA	Leu (L)	0.3	0.03	CCA	Pro (P)	0.8	0.20	CAA	Gln (Q)	1.3	0.31	CGA	Arg (R)	0.3	0.05	
	CUG	Leu (L)	5.2	0.55	CCG	Pro (P)	2.4	0.55	CAG	Gln (Q)	2.9	0.69	CGG	Arg (R)	0.5	0.08	
A	AUU	Ile (I)	2.7	0.47	ACU	Thr (T)	1.2	0.21	AAU	Asn (N)	1.6	0.39	AGU	Ser (S)	0.7	0.13	U
	AUC	Ile (I)	2.7	0.46	ACC	Thr (T)	2.4	0.43	AAC	Asn (N)	2.6	0.61	AGC	Ser (S)	1.5	0.27	
	AUA	Ile (I)	0.4	0.07	ACA	Thr (T)	0.1	0.30	AAA	Lys (K)	3.8	0.76	AGA	Arg (R)	0.2	0.04	
	AUG	Met (M)	2.6	1.00	ACG	Thr (T)	1.3	0.23	AAG	Lys (K)	1.2	0.24	AGG	Arg (R)	0.2	0.03	
G	GUU	Val (V)	2.0	0.29	GCU	Ala (A)	1.8	0.19	GAU	Asp (D)	3.3	0.59	GGU	Gly (G)	2.8	0.38	U
	GUC	Val (V)	1.4	0.20	GCC	Ala (A)	2.3	0.25	GAC	Asp (D)	2.3	0.41	GGC	Gly (G)	3.0	0.40	
	GUA	Val (V)	1.2	0.17	GCA	Ala (A)	2.1	0.22	GAA	Glu (E)	4.4	0.70	GGA	Gly (G)	0.7	0.09	
	GUG	Val (V)	2.4	0.34	GCG	Ala (A)	3.2	0.34	GAG	Glu (E)	1.9	0.30	GGG	Gly (G)	0.9	0.13	
	U				C				A				G				

Εκφυλισμένα κωδικόνια - NNS

CODON USAGE IN *E. COLI* GENES¹

	Codon	Amino acid ²	% ³	Ratio ⁴	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	
U	UUU	Phe (F)	1.9	0.51	UCU	Ser (S)	1.1	0.19	UAU	Tyr (Y)	1.6	0.53	UGU	Cys (C)	0.4	0.43	U
	UUC	Phe (F)	1.8	0.49	UCC	Ser (S)	1.0	0.17	UAC	Tyr (Y)	1.4	0.47	UGC	Cys (C)	0.6	0.57	C
	UUA	Leu (L)	1.0	0.11	UCA	Ser (S)	0.7	0.12	UAA	STOP	0.2	0.62	UGA	STOP	0.1	0.30	A
	UUG	Leu (L)	1.1	0.11	UCG	Ser (S)	0.8	0.13	UAG	STOP	0.03	0.09	UGG	Trp (W)	1.4	1.00	G
C	CUU	Leu (L)	1.0	0.10	CCU	Pro (P)	0.7	0.16	CAU	His (H)	1.2	0.52	CGU	Arg (R)	2.4	0.42	U
	CUC	Leu (L)	0.9	0.10	CCC	Pro (P)	0.4	0.10	CAC	His (H)	1.1	0.48	CGC	Arg (R)	2.2	0.37	C
	CUA	Leu (L)	0.3	0.03	CCA	Pro (P)	0.8	0.20	CAA	Gln (Q)	1.3	0.31	CGA	Arg (R)	0.3	0.05	A
	CUG	Leu (L)	5.2	0.55	CCG	Pro (P)	2.4	0.55	CAG	Gln (Q)	2.9	0.69	CGG	Arg (R)	0.5	0.08	G
A	AUU	Ile (I)	2.7	0.47	ACU	Thr (T)	1.2	0.21	AAU	Asn (N)	1.6	0.39	AGU	Ser (S)	0.7	0.13	U
	AUC	Ile (I)	2.7	0.46	ACC	Thr (T)	2.4	0.43	AAC	Asn (N)	2.6	0.61	AGC	Ser (S)	1.5	0.27	C
	AUA	Ile (I)	0.4	0.07	ACA	Thr (T)	0.1	0.30	AAA	Lys (K)	3.8	0.76	AGA	Arg (R)	0.2	0.04	A
	AUG	Met (M)	2.6	1.00	ACG	Thr (T)	1.3	0.23	AAG	Lys (K)	1.2	0.24	AGG	Arg (R)	0.2	0.03	G
G	GUU	Val (V)	2.0	0.29	GCU	Ala (A)	1.8	0.19	GAU	Asp (D)	3.3	0.59	GGU	Gly (G)	2.8	0.38	U
	GUC	Val (V)	1.4	0.20	GCC	Ala (A)	2.3	0.25	GAC	Asp (D)	2.3	0.41	GGC	Gly (G)	3.0	0.40	C
	GUA	Val (V)	1.2	0.17	GCA	Ala (A)	2.1	0.22	GAA	Glu (E)	4.4	0.70	GGA	Gly (G)	0.7	0.09	A
	GUG	Val (V)	2.4	0.34	GCG	Ala (A)	3.2	0.34	GAG	Glu (E)	1.9	0.30	GGG	Gly (G)	0.9	0.13	G
	U				C				A				G				

Μέγεθος βιβλιοθηκών

Αριθμός πιθανών μεταλλαγμάτων με την
εισαγωγή M μεταλλάξεων σε N αμινοξέα:

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



Substitutions (M)	Length of protein sequence (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

Αριθμός κλώνων σε τοποκατευθυνόμενη μετάλλαξη με NNK: 32^M

Μέγεθος βιβλιοθηκών

Οι βιβλιοθήκες τυχαίας μεταλλαξιγένεσης είναι συνήθως τεράστιες και δε μπορεί να γίνει διαλογή. Καλά εργαλεία HTS απαιτούνται

Πως μειώνουμε το μέγεθος της βιβλιοθήκης;

**Combinatorial
Active
Site saturation
Test**



Manfred Reetz

- Το CAST-ing επιτρέπει ταυτόχρονο κορεσμό θέσεων, αλλά οι βιβλιοθήκες είναι ακόμα αρκετά μεγάλες
- Χρήση NDT-κωδικονίων μειώνει την βιβλιοθήκη (12 αντί για 20 αμινοξέα)
- Η ποιότητα (αντιπροσώπευση αμινοξέων) των βιβλιοθηκών μειώνεται

Μειώνοντας το μέγεθος βιβλιοθήκης

AA sites	NNK Codons/Colonies	NDT Codons/Colonies	22c trick Codons/Colonies
1	32 / 94	12 / 34	22 / 66
2	1.024 / 3.066	114 / 430	484 / 1.450
3	32.768 / 98.163	1.728 / 5.175	10.648 / 31.899

NNK

- ❖ Και τα 20 αμινοξέα
- ❖ 1 κωδικόνιο λήξης
- ❖ Εκφυλισμός κωδικονίων

NDT

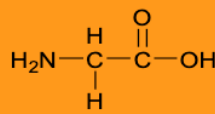
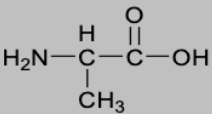
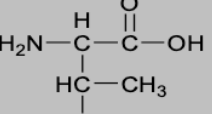
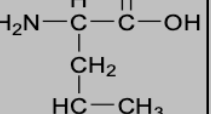
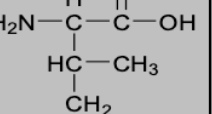
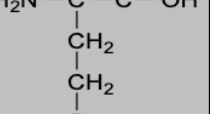
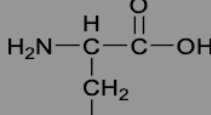
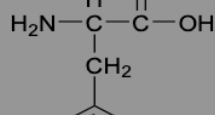
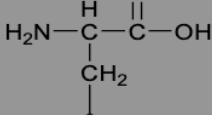
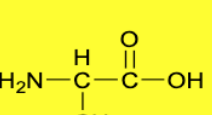
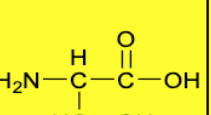
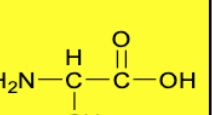
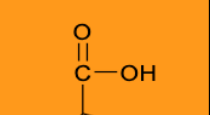
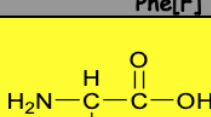
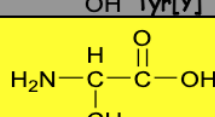
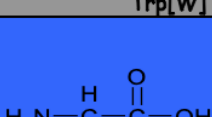
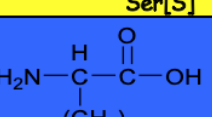
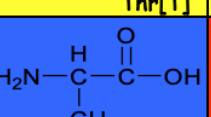
- ❖ 12 αμινοξέα
- ❖ χωρίς κωδικόνιο λήξης
- ❖ Καλύτερη κατανομή

22c trick

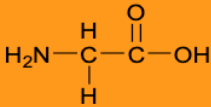
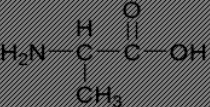
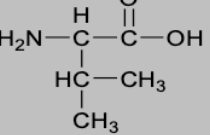
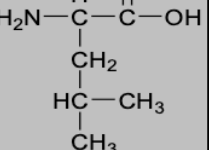
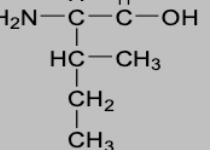
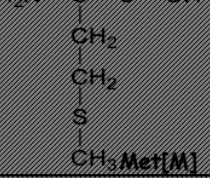
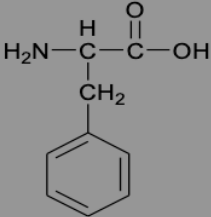
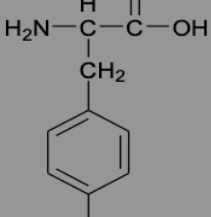
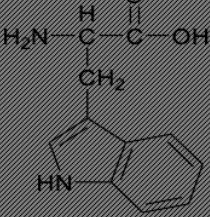
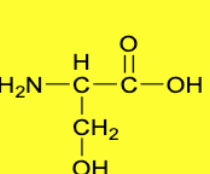
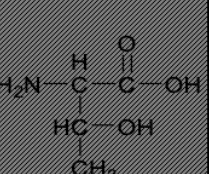
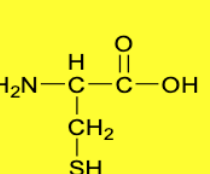
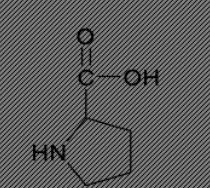
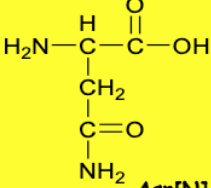
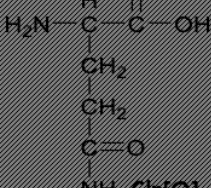
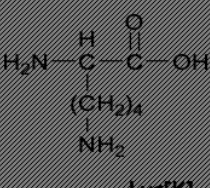
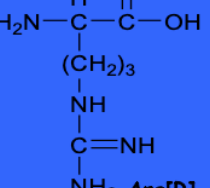
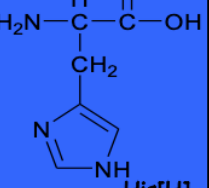
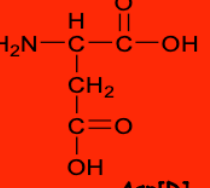
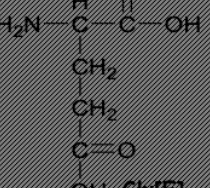
- ❖ 22 κωδικόνια
- ❖ όλα τα αμινοξέα
- ❖ χωρίς κωδικόνιο λήξης
- ❖ Καλύτερη κατανομή
- ❖ NDT/VHG/TGG

CASTER Tool

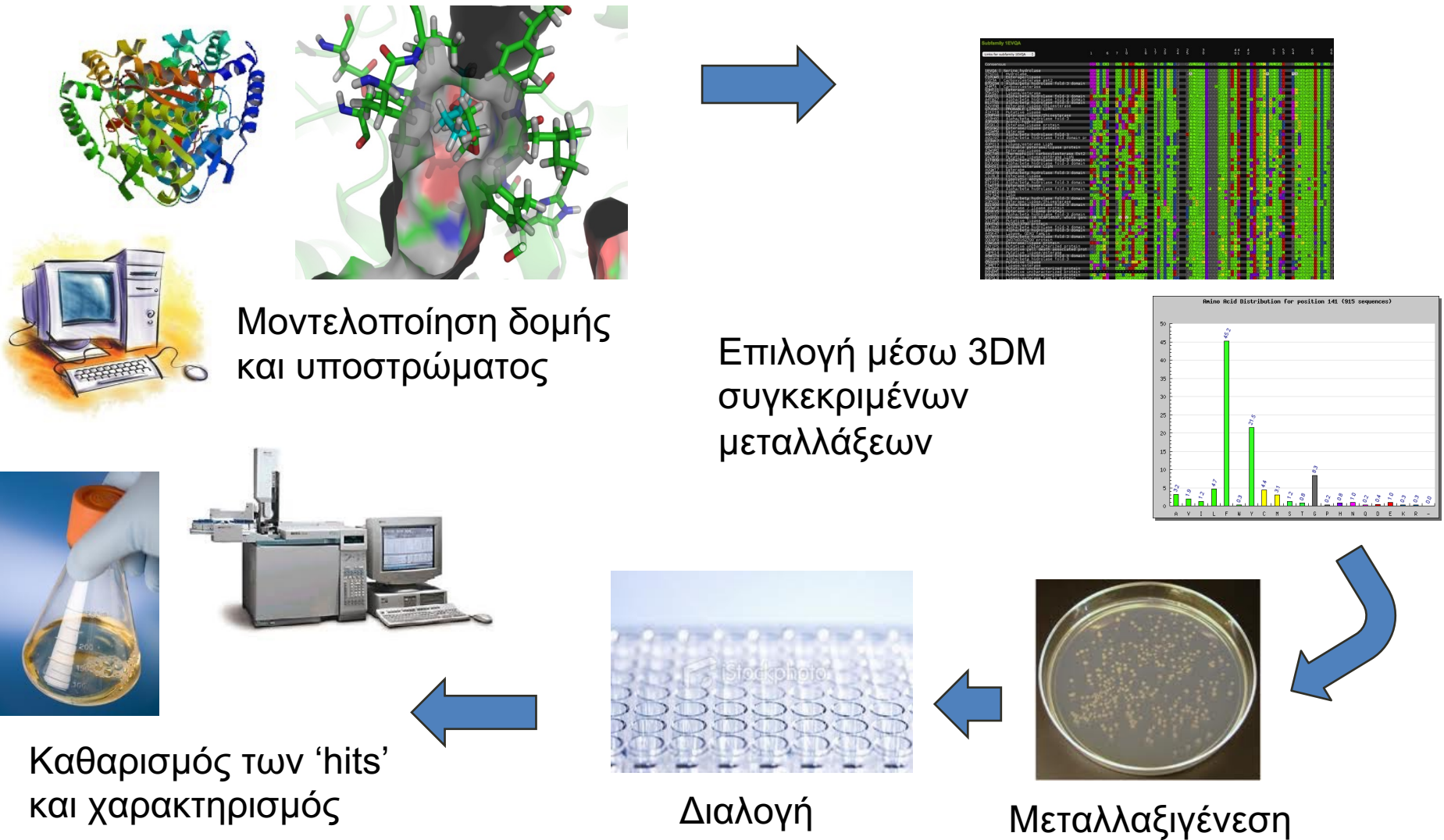
NNK βιβλιοθήκη - αντιπροσώπευση

STRUCTURES OF THE AMINOACIDS ENCODED WITH THE SELECTED DEGENERACY						
CODON	N	N	K	▶▶▶▶▶▶▶▶	[Select Degenerate Codon]	
Amino acid Structures	 Gly[G]	 Ala[A]	 Val[V]	 Leu [L]	 Ile[I]	 Met[M]
	 Phe[F]	 Tyr[Y]	 Trp[W]	 Ser[S]	 Thr[T]	 Cys[C]
	 Pro[P]	 Asn[N]	 Gln[Q]	 Lys[K]	 Arg[R]	 His[H]
Color Code		% Codons		Not Selected Amino acids		
Acidic [-]		6,3				
Basic [+]		15,6				
Non-polar aliphatic		28,1				
Aromatic		9,4				
Polar		25,0				
Special Features		12,5				

NDT βιβλιοθήκη - αντιπροσώπευση

STRUCTURES OF THE AMINOACIDS ENCODED WITH THE SELECTED DEGENERACY						
CODON	N	D	T	▶▶▶▶▶▶▶▶ [Select Degenerate Codon]		
Amino acid Structures	 Gly[G]	 Ala[A]	 Val[V]	 Leu [L]	 Ile[I]	 Met[M]
 Phe[F]	 Tyr[Y]	 Trp[W]	 Ser[S]	 Thr[T]	 Cys[C]	 Pro[P]
 Asn[N]	 Gln[Q]	 Lys[K]	 Arg[R]	 His[H]	 Asp[D]	 Glu[E]
Color Code	% Codons	.. NNK ..	 Not Selected Amino acids			
Acidic [-]	8,3	6,3				
Basic [+]	16,7	15,6				
Non-polar aliphatic	25,0	28,1				
Aromatic	16,7	9,4				
Polar	25,0	25,0				
Special Features	8,3	12,5				

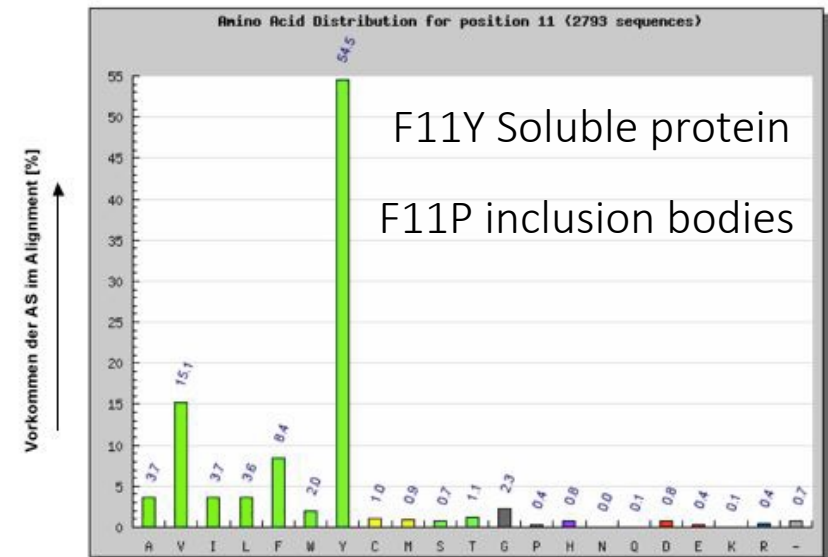
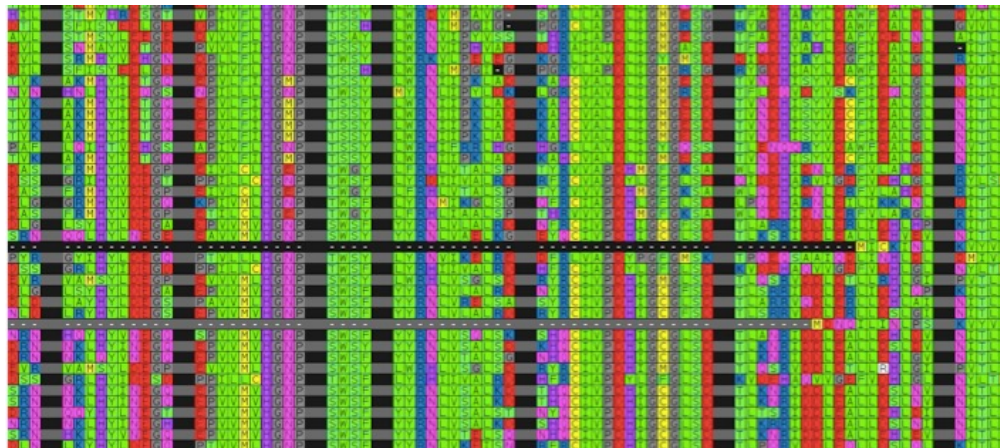
Ημι-ορθολογικός σχεδιασμός



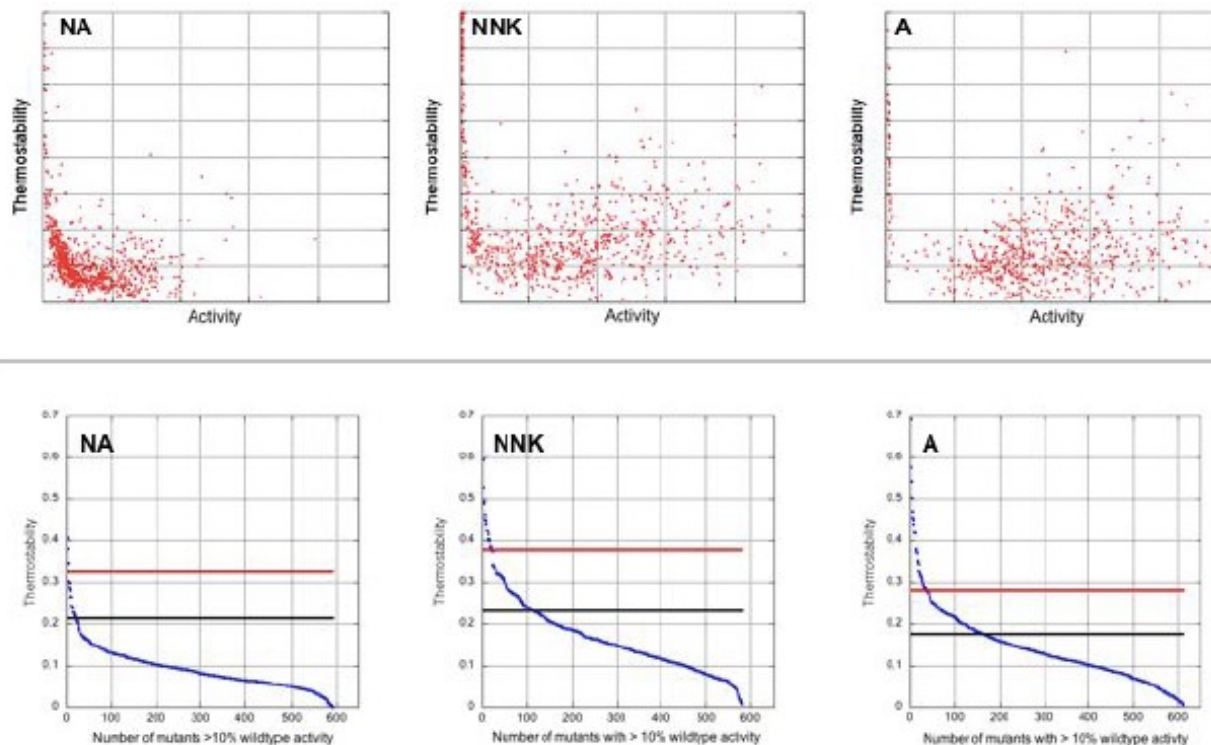
Ημι-ορθολογικός σχεδιασμός

Χρήση πολλαπλής αντιστοίχισης αλληλουχιών βασισμένη σε δομές

- ❖ Αναγνώριση της διασποράς των αμινοξέων σε κάθε θέση
- ❖ Εξελικτικά επιτρεπτά και μη επιτρεπτά αμινοξέα μπορεί να ανιχνευτούν σε κάθε θέση
- ❖ Συνεργατικά φαινόμενα μπορεί να βρεθούν
- ❖ Η φυσική μεταβλητότητα δεν σημαίνει ότι το ένζυμο μπορεί να καταλύσει την αντίδραση



Γενετική ουδέτερη μετατόπιση



Top: Thermostability vs. activity in the 3 libraries (thermostability = activity after/before heat treatment)

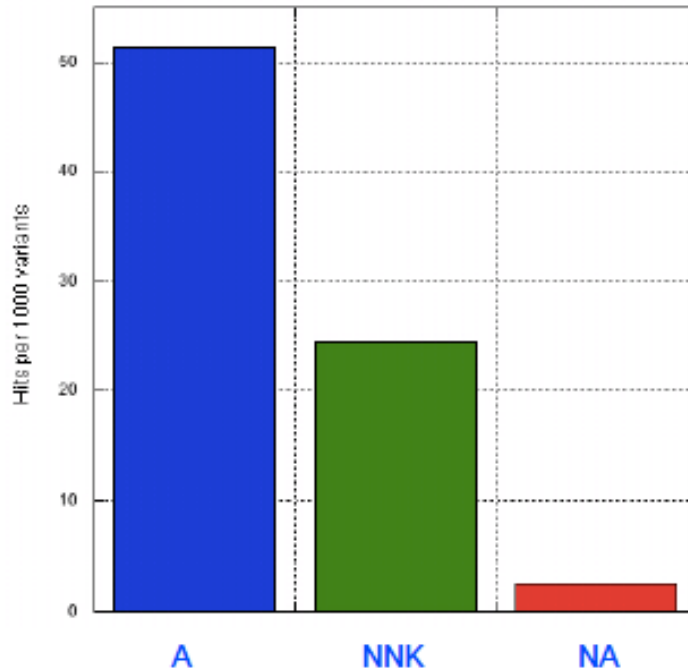
Bottom: Thermostability vs. the number of clones screened (those w/ >10% of wildtype activity)

Top: Clear shift from less active to more active mutants detectable

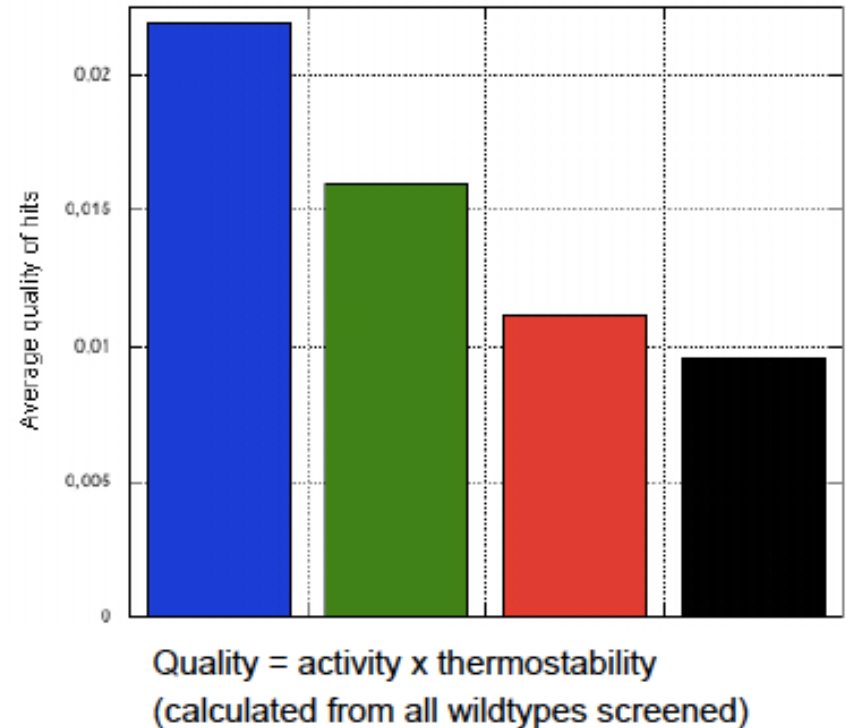
Bottom: more hits above the threshold line

Γενετική ουδέτερη μετατόπιση

Number of hits per 1 000 clones



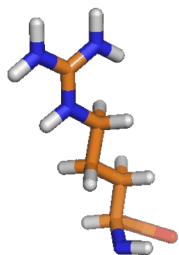
Average quality of hits



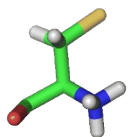
Number of hits derived from library **A** is more than twice higher compared to **NNK**
Limiting the combinations does not go to the expense of quality

Μεταλλαξιγένεση σάρωσης

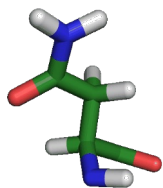
- ❖ Χρησιμοποιείται όταν θέλουμε να ελέγξουμε τις θέσεις που είναι δεκτικές σε μεταλλάξεις και έχουν κάποια επίδραση.
- ❖ Καθώς δεν μπορούμε να ελέγξουμε όλα τα αμινοξέα, δοκιμάζουμε με ένα αμινοξύ για να δούμε την επίδραση στο χαρακτηριστικό που μελετάμε
 - ❖ Glycine Screening
 - ❖ Alanine Screening
- ❖ Η γλυκίνη είναι επιρεπής σε β-στροφές και για αυτό προτιμάται η αλανίνη ως πιο σταθερό αμινοξύ (για δευτεροταγείς δομές)



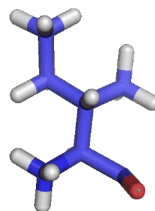
ARG



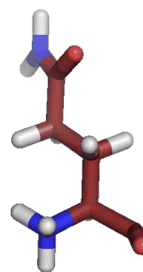
CYS



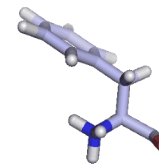
ASN



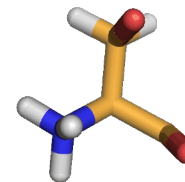
ILE



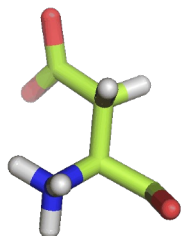
LEU



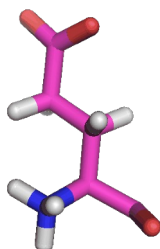
PHE



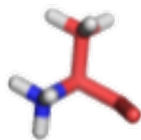
SER



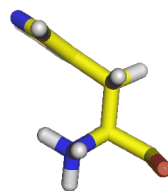
ASP



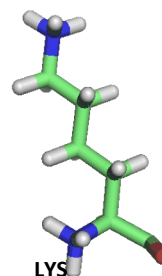
GLU



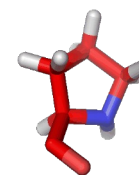
ALA



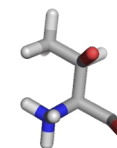
HIS



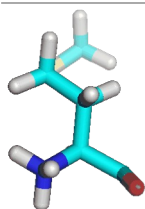
LYS



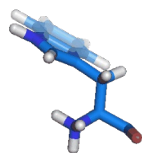
PRO



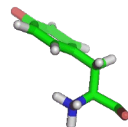
THR



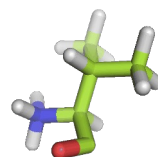
MET



TRP



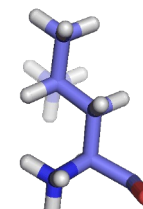
TYR



VAL



GLY



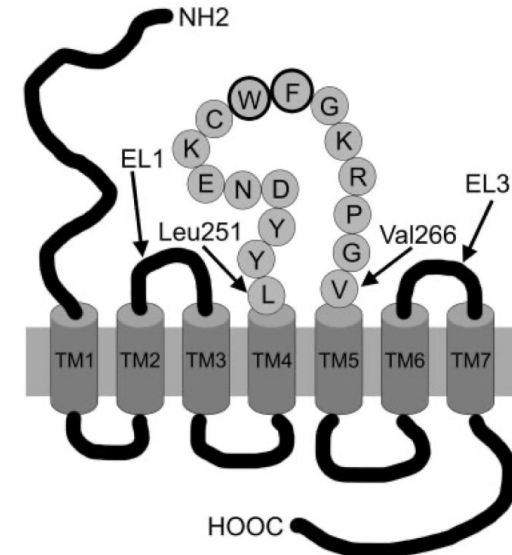
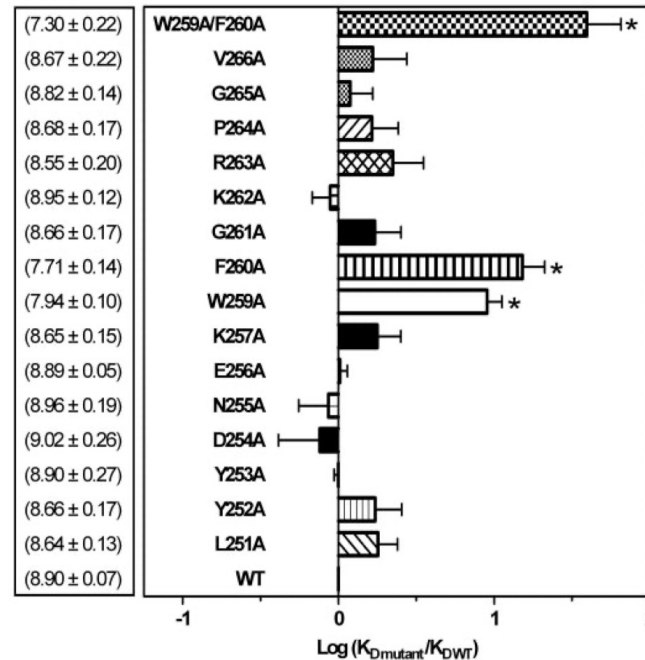
GLN

Μεταλλαξιγένεση σάρωσης

Alanine Scanning Library



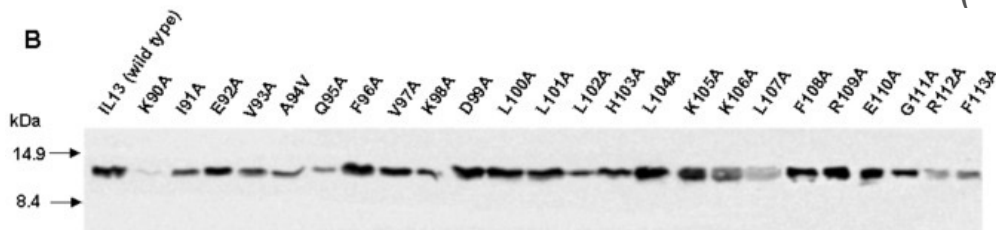
$-(\text{Log} K_D \pm \text{S.E.})$



Finding important interaction partners

Gkountelias et al. (2009) Mol. Pharmac. 75: 793-800

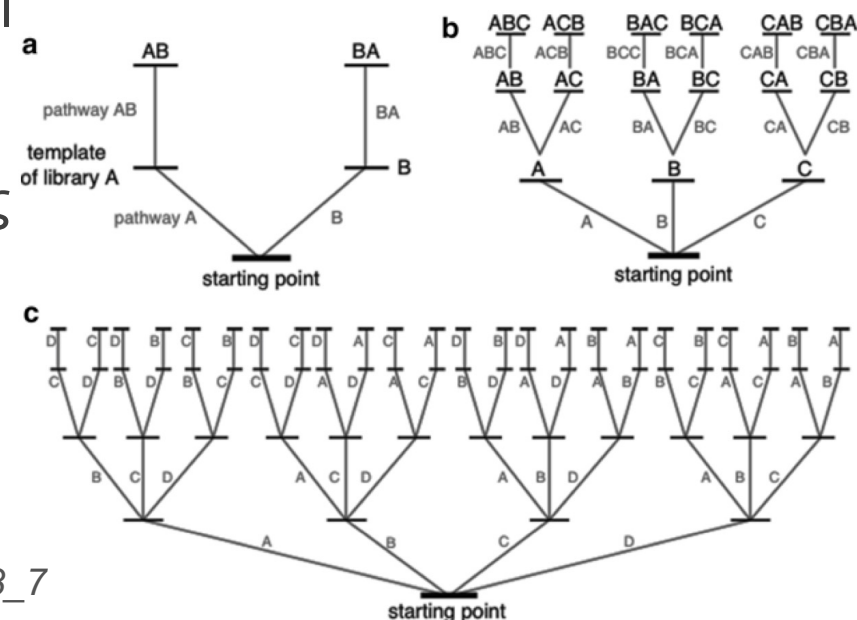
B



Western Blot of IL13 variants
Madhankumar et al. (2002) Prot. Struct. Fold. 277: 43194-205

Iterative Saturation Mutagenesis

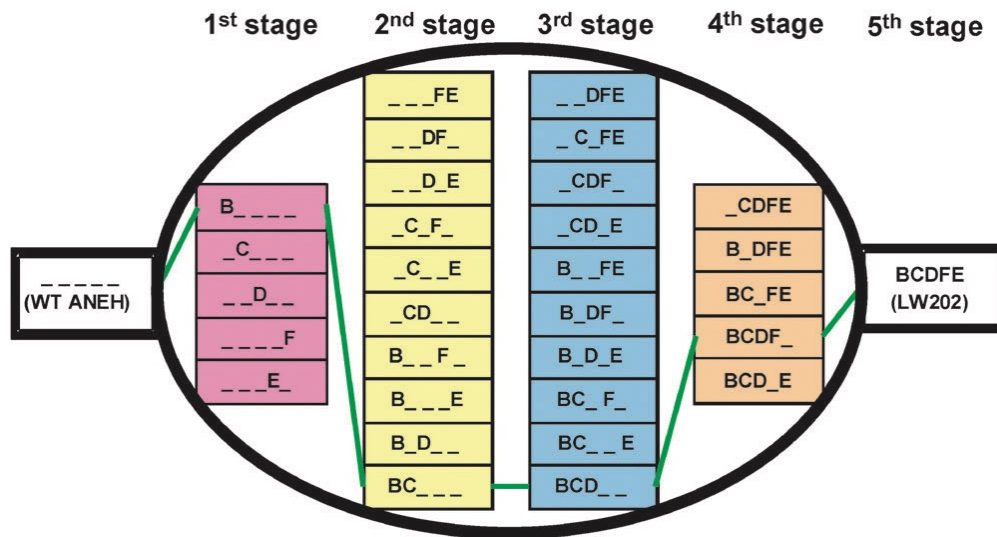
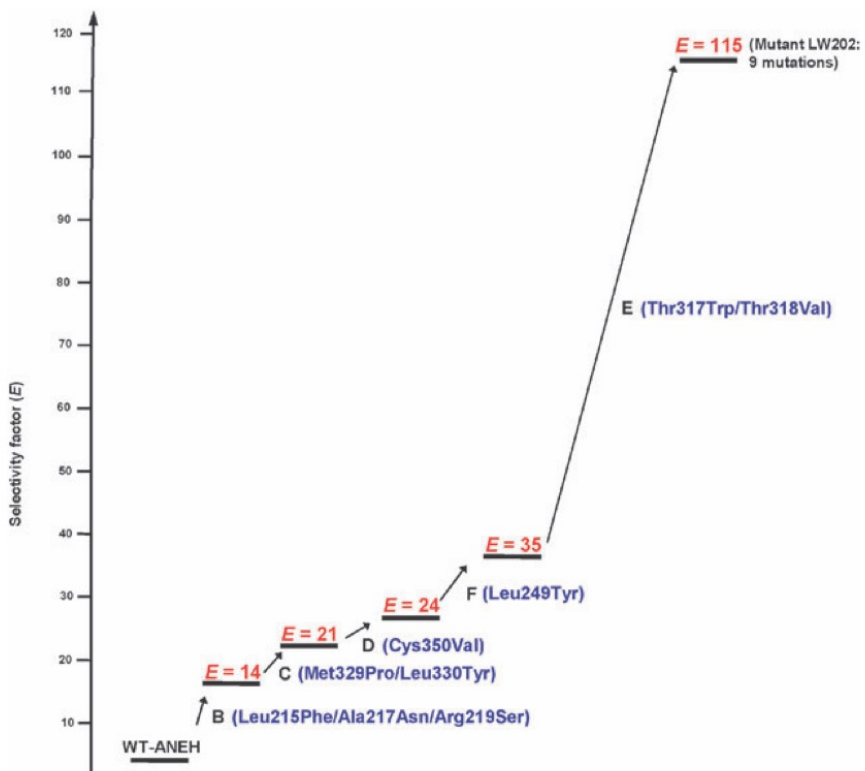
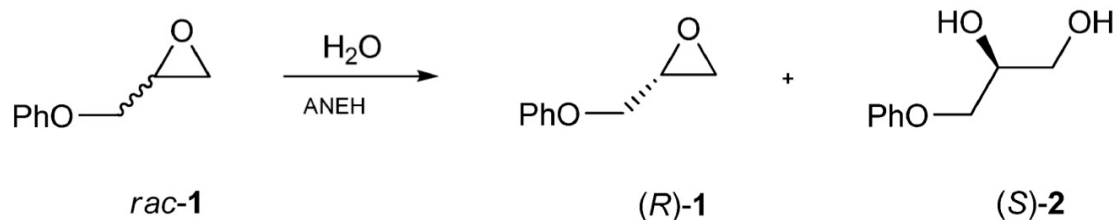
- ❖ Χρησιμοποιείται για να ελεγχθούν πολλές θέσεις σε μία πρωτεΐνη.
- ❖ Οι θέσεις μεταλλάσσονται μία-μία (για να μειωθεί το μέγεθος της βιβλιοθήκης, αλλά με διαφορετική σειρά).
- ❖ Στον δεύτερο γύρο μεταλλάσσεται η δεύτερη θέση (τυχαία), με template το hit της πρώτης φάσης
- ❖ Συστηματικός τρόπος διαλογής



Acevedo-Rocha et al. (2014) doi:10.1007/978-1-4939-1053-3_7

Iterative Saturation Mutagenesis

Εξέλιξη υδρολάσης εποξειδίου - εκλεκτικότητα

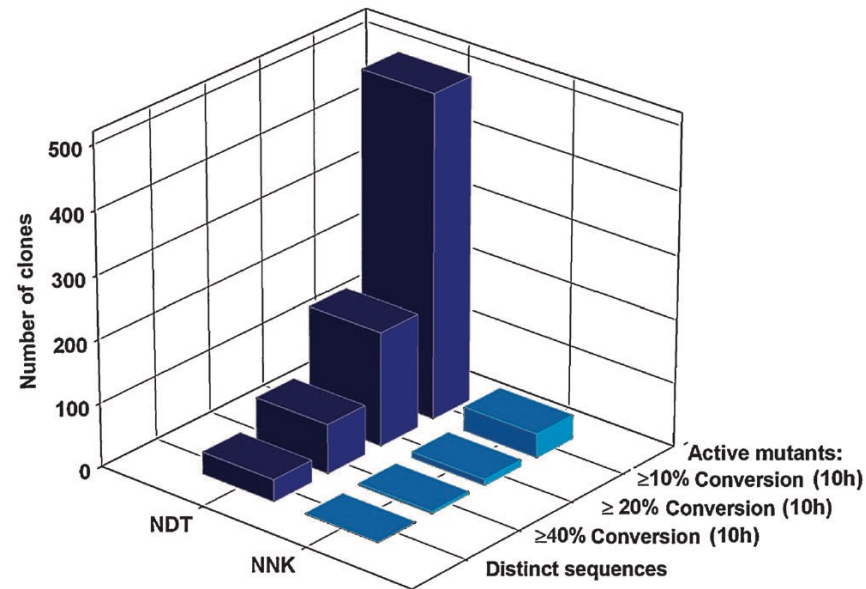
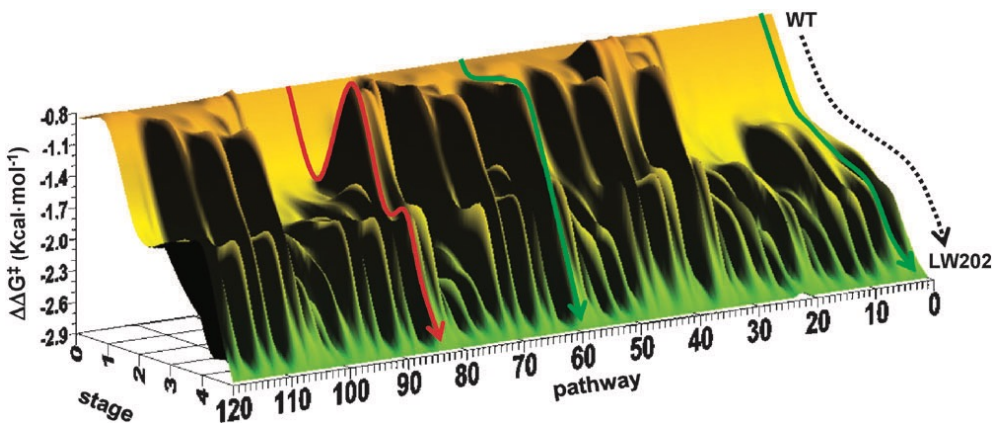


Reetz et al. (2009) *Mol. Biosyst.* **5**: 115-122

Iterative Saturation Mutagenesis

Δύο μοναδικά μονοπάτια οδηγούν
στην βελτίωση μεταξύ 120
πιθανών συνδυασμών

Οι βιβλιοθήκες NDT οδηγούσαν σε
περισσότερες ενεργές πρωτεΐνες



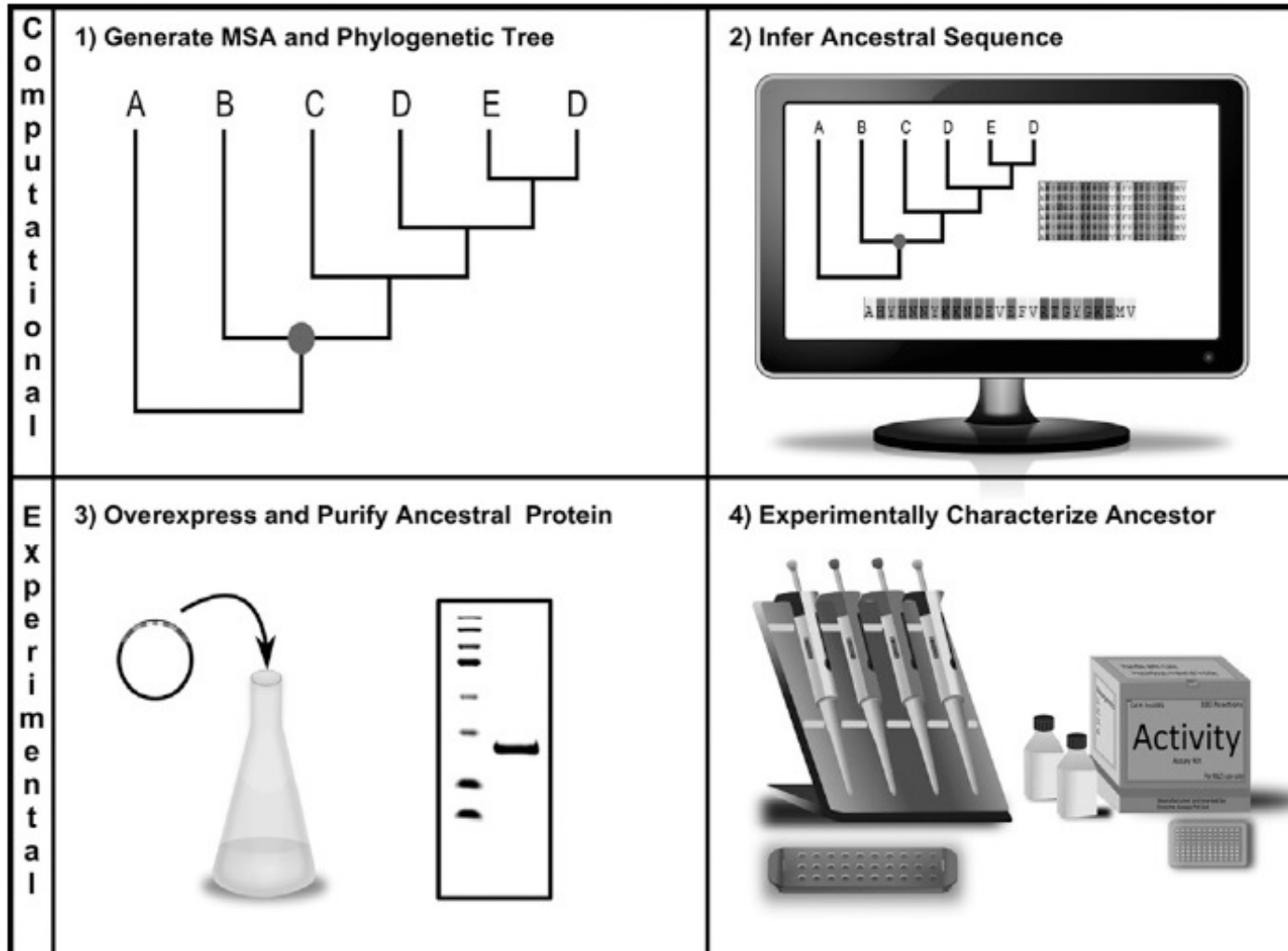
Reetz et al. (2009) *Mol. Biosyst.* **5**: 115-122

Ανακατασκευή προγονικής αλληλουχίας

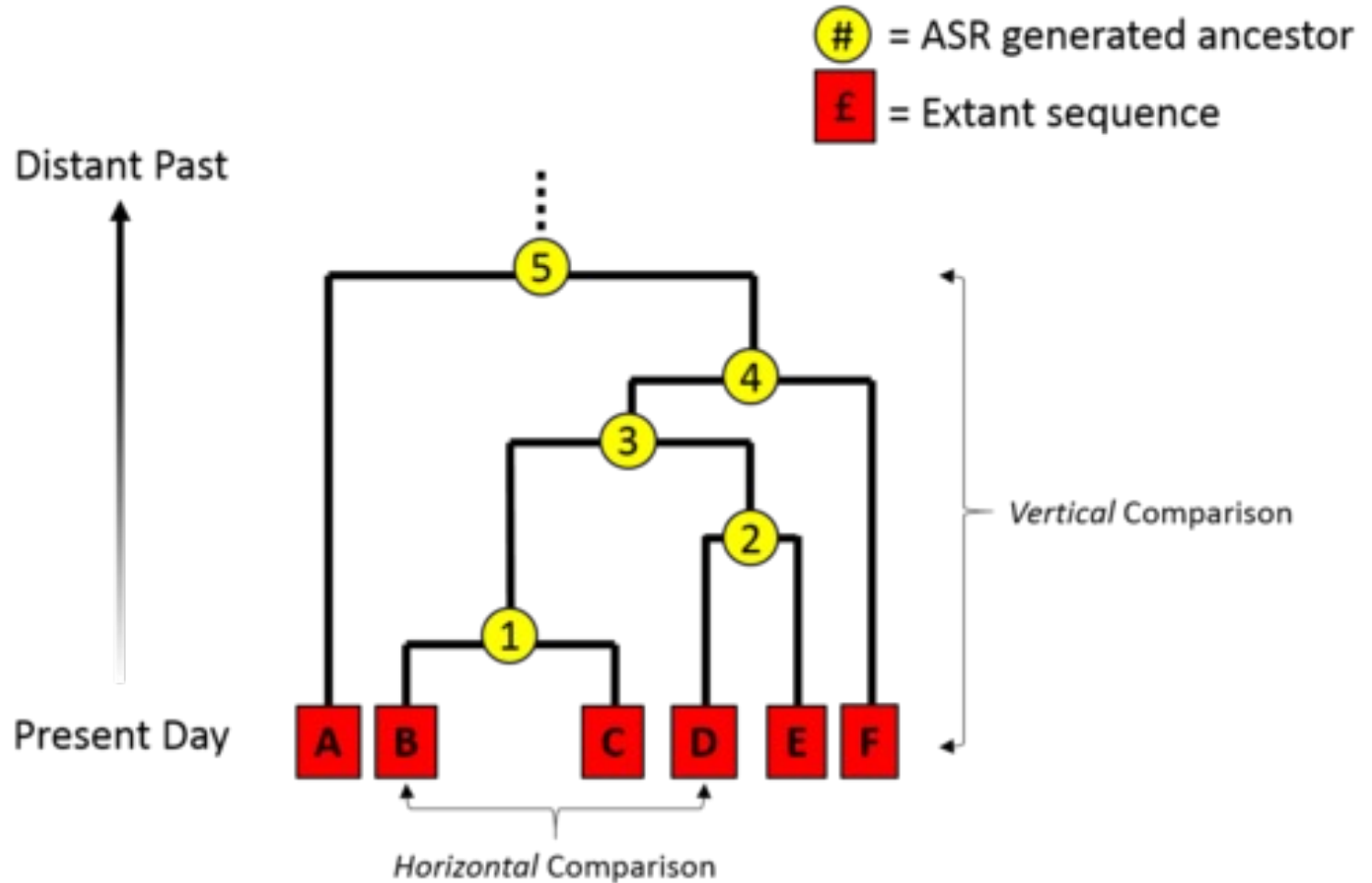
Ancestral sequence reconstruction

- ❖ Προσπάθεια “ανάστασης” προγονικών πρωτεϊνών
- ❖ Θεωρία των “generalist proteins”
- ❖ Σταθερότερες πρωτεΐνες
- ❖ Ανάλυση σε δύο στάδια:
 1. Βιοπληροφορική ανάλυση ομόλογων πρωτεϊνών και ένταξη σε ένα φυλογενετικό δέντρο
 2. Σύνθεση γονιδίων, έκφραση και χαρακτηρισμός

Ανακατασκευή προγονικής αλληλουχίας



Ανακατασκευή προγονικής αλληλουχίας



Τι στόχο έχουμε;

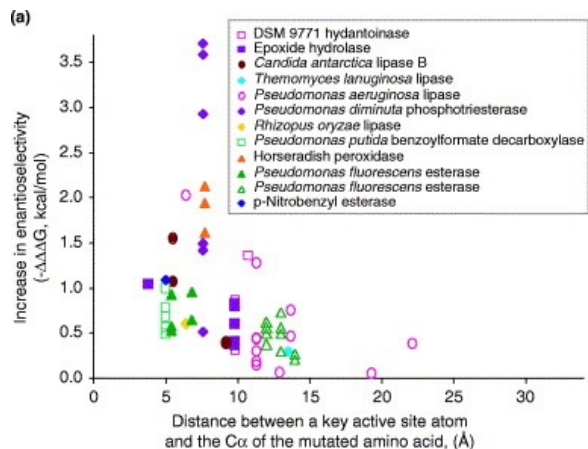
- ❖ Βελτίωση ενεργότητας;
 - ❖ Ορθολογικός σχεδιασμός στο ενεργό κέντρο
- ❖ Αλλαγή προφίλ υποστρωμάτων;
 - ❖ Εξαρτάται από την αλλαγή
 - ❖ Ορθολογικός σχεδιασμός ή τυχαία μεταλλαξιγένεση
- ❖ Βελτιωμένη σταθερότητα;
 - ❖ Στρατηγικές τυχαίας μεταλλαξιγένεσης
 - ❖ Προσθήκη δισουλφιδικών δεσμών σε ευέλικτες περιοχές



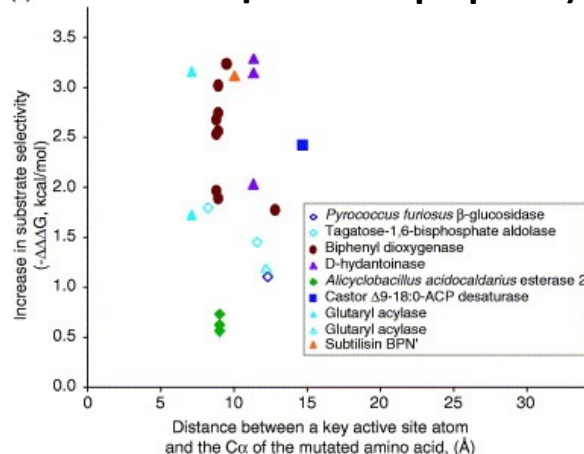
"There are lots of ways to evolve a protein," says Frances Arnold at California Institute of Technology. "If one doesn't work, you can try another."

Rational design - closer = better?

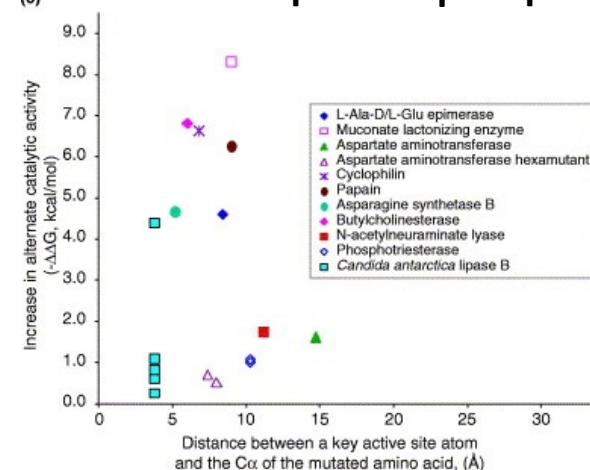
Εναντιοεκλεκτικότητα



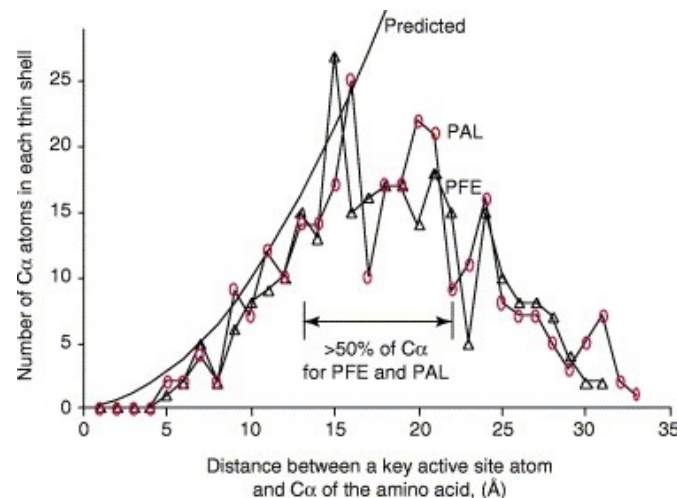
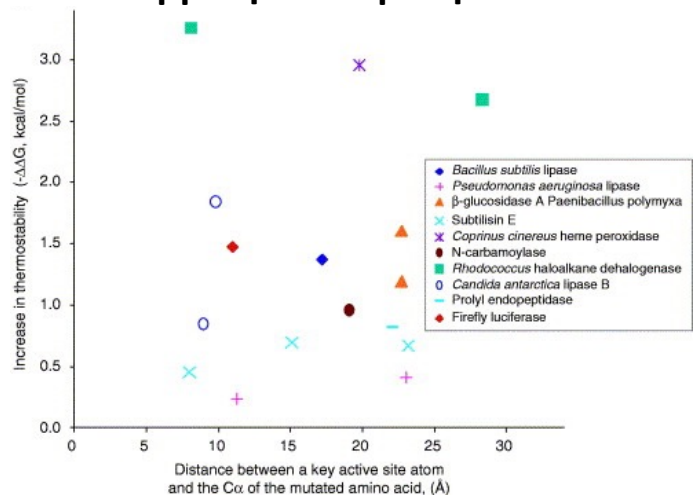
(b) Εκλεκτικότητα υποστρώματος



(c) Καταλυτική ελευθεριότητα



Θερμική σταθερότητα



Morley & Kazlauskas (2005) Trends Biotechnol. 23:231-237

Στρατηγικές σχεδιασμού πρωτεϊνών

Θέση

- ❖ σε όλη την πρωτεΐνη
- ❖ επιλεγμένες περιοχές
 - κοντά στο ενεργό κέντρο
 - σε ευέλικτες περιοχές
 - περιοχές από βιοπληροφορική ανάλυση
 - περιοχές από σύγκριση αλληλουχιών

Μέθοδος διαλογής

- ❖ αυξοτροφίες (μεγάλες βιβλιοθήκες)
- ❖ διαλογή με υψηλή ρυθμοαπόδοση
- ❖ με το υπόστρωμα ή ανάλογο
- ❖ πραγματικές συνθήκες ή απλοποιημένο σύστημα
- ❖ πλήρης ή μερική διαλογή βιβλιοθήκης

Πως κάνουμε τις αλλαγές;

- ❖ αλλαγή αμινοξέων
- ❖ διαγραφές ή προσθήκες
- ❖ κυκλική μετάθεση
- ❖ ομόλογος ανασυνδυασμός

Μέθοδοι μεταλλαξιγένεσης

- ❖ πρώτα σταθεροποίηση πρωτεΐνης;
- ❖ απλές αλλαγές
 - *epPCR*
 - μεταλλαγή κορεσμού θέσεως
 - ορισμένες αλλαγές αμινοξέων
- ❖ πολλαπλές αλλαγές
 - συνθετικά γονίδια
 - *DNA shuffling*
 - σταδιακή πρόσθεση σημειακών μεταλλάξεων

Συμβιβασμοί

- ❖ Αναγνώριση της μεροληψίας της μεθόδου που χρησιμοποιούμε
- ❖ Αναγνώριση της ανικανότητας μας να μπορέσουμε να μελετήσουμε όλες τις παραλλαγές μίας πρωτεΐνης (τεράστια βιβλιοθήκη, δεν έχουμε τα εργαλεία για αυτό)
- ❖ Αναγνώριση ότι αφήνουμε πληροφορία εκτός με τις μικρότερες βιβλιοθήκες, αλλά επενδύουμε περισσότερο στον ποιοτικό έλεγχο της βιβλιοθήκης
- ❖ Αναγνώριση ότι χρησιμοποιώντας τη φυσική διαφοροποίηση, οδηγούμαστε προς μία πρωτεΐνη με γενικές ιδιότητες

**Η γνώση των μειονεκτημάτων της τεχνικής μας, μας βοηθά στον
σχεδιασμό των επόμενων βημάτων της έρευνας μας**

Σύνδεσμοι

CASTER-B-FITTER:

<https://www.kofo.mpg.de/en/research/biocatalysis>

3DM:

<https://3dm.bio-prodict.com>