

# DNA突变文库应用手册

· 抗体工程    · 酶工程    · 衣壳蛋白工程



# 目录

前沿	1
蛋白质工程设计策略	2
不同突变文库的选择	3
<b>突变文库应用案例</b>	<b>5</b>
抗体亲和力成熟	6
酶分子优化	10
AAV衣壳蛋白优化	12
<b>突变文库合成类型</b>	<b>15</b>
不同突变文库合成方法比较	16
金斯瑞突变文库服务优势	19
<b>参考文献</b>	<b>20</b>

# 01

## 前沿

蛋白质工程设计策略

不同突变文库的选择



# 蛋白质工程设计策略

蛋白质工程是为了改善蛋白的特定特性，如亲和力、特异性和功能活性等。所以在设计的时候，一般有两个基本策略，理性设计和定向进化<sup>1</sup>。

理性的设计策略需要通过实验或计算预测获得蛋白质结构和功能，并在特定位点引入靶向突变，因此通常得到的突变体库较小<sup>1,2</sup>。另一方面，在定向进化领域中，关于蛋白质结构和功能的信息很少，所以需要使用大型突变体库，在不同区域内随机引入突变，以此实现突变体序列的多样性<sup>1,3</sup>。

随着文库库容量的增加，高通量筛选的难度也会增加，此时可以结合合理的设计策略，利用2个策略的优势，设计中等大小的突变文库，以此减轻大型文库的筛选难度（图1）。然后通过适当的平台筛选出文库中具有改良特性的突变体，并可以通过多轮突变和筛选进一步改进。

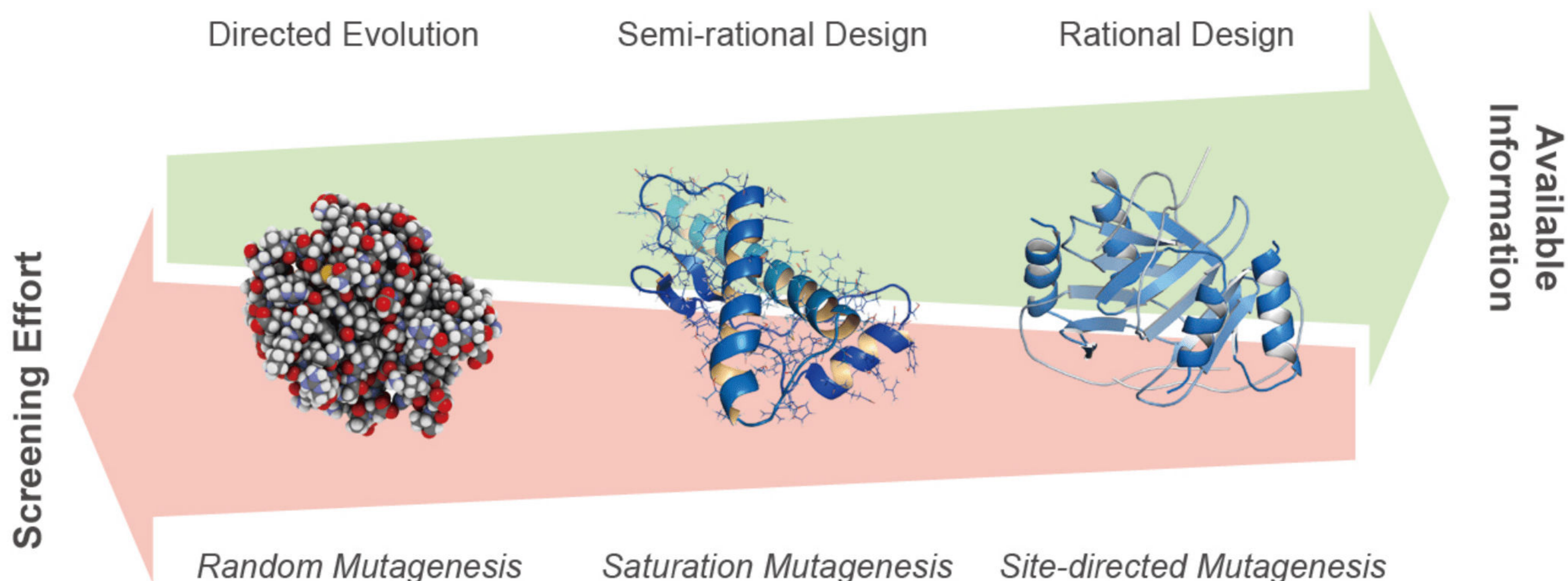


图1.工程策略、可用信息/知识以及所需的相应筛选工作之间的相关性

关于目标蛋白的可用信息/知识越少，合理设计就越困难，因此文库规模就变得越大；文库规模越大，筛选工作量就越大。

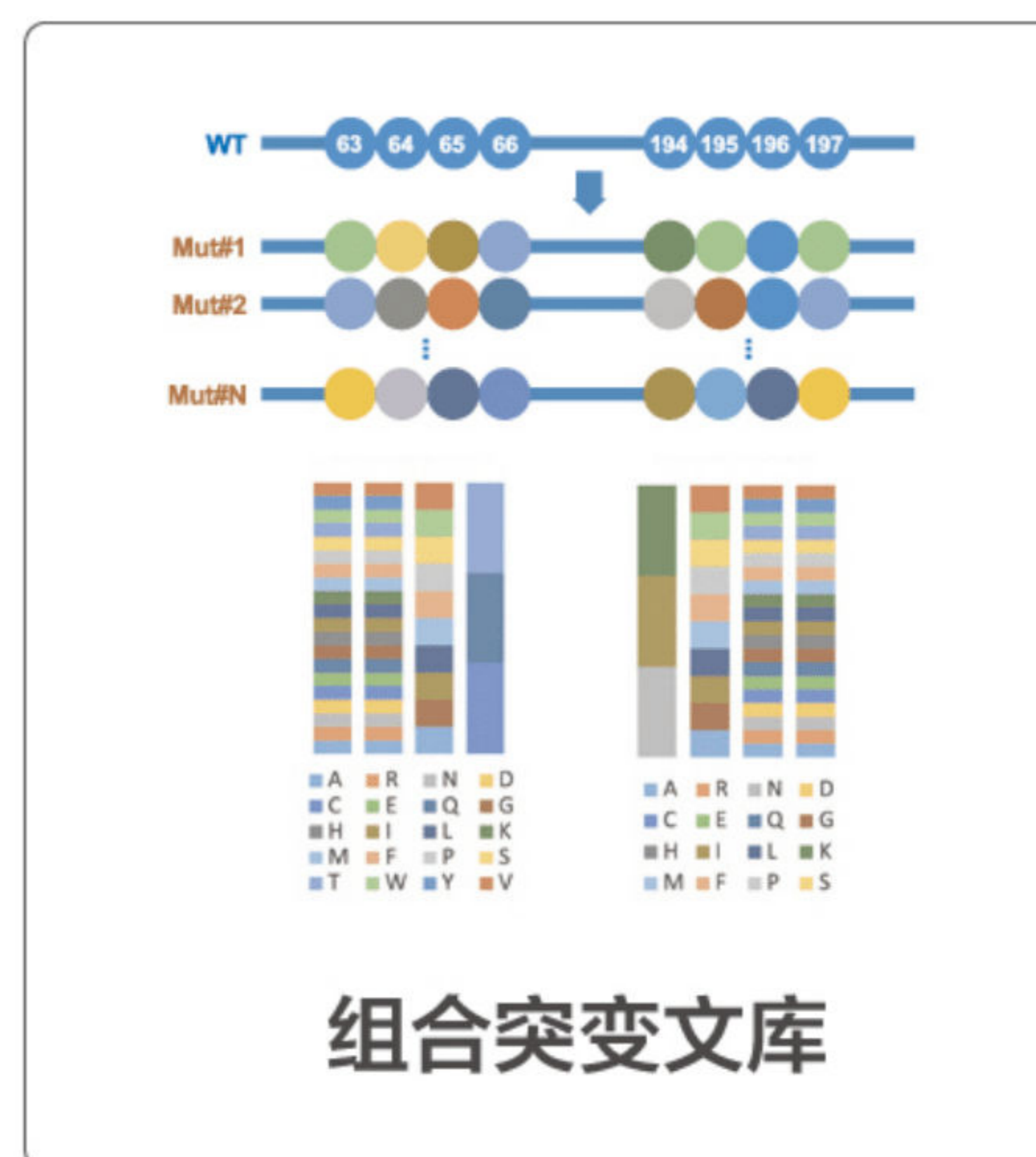
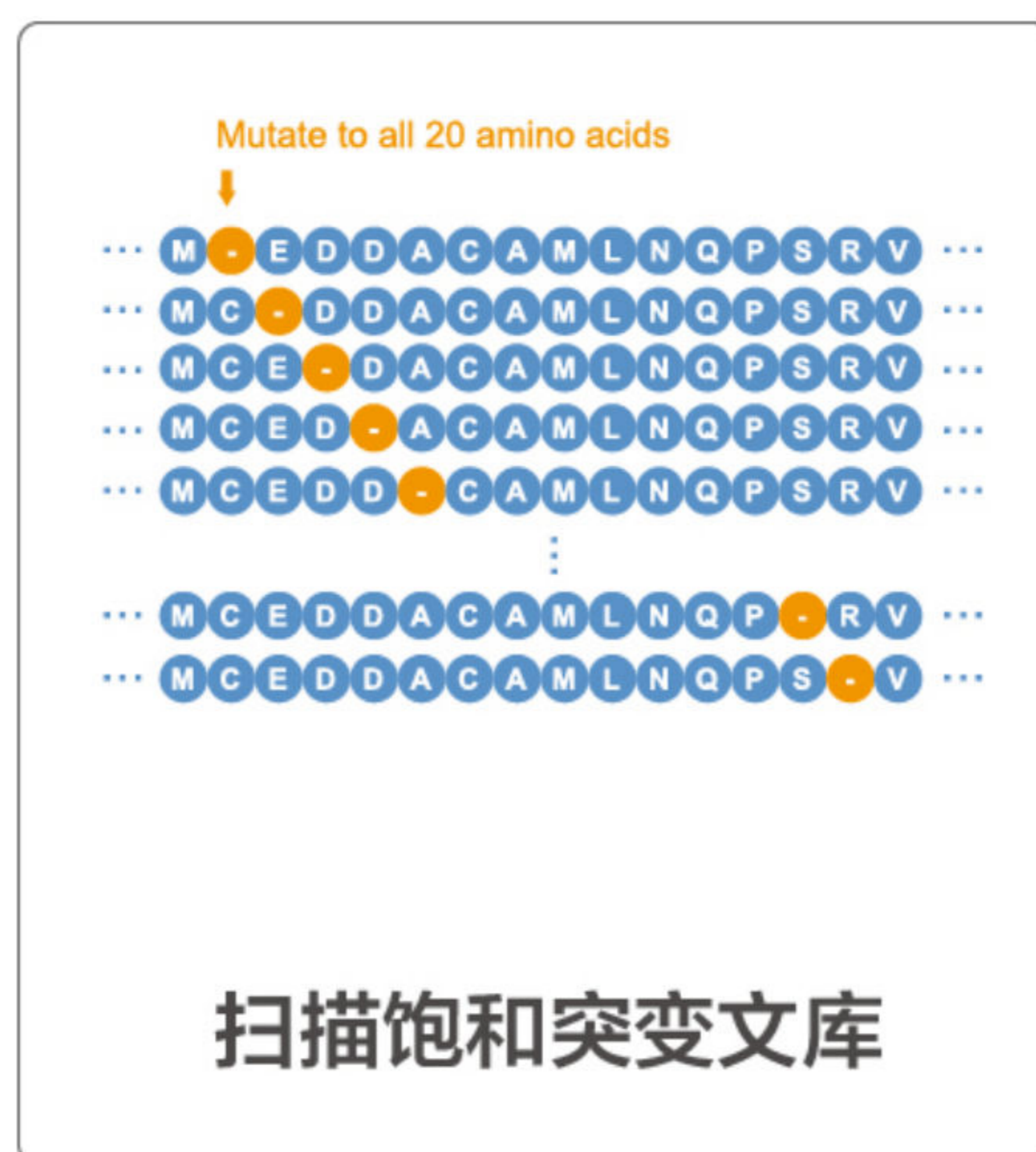


无论用于构建突变文库的方法或文库的大小如何，蛋白质工程工作的成功取决于两个关键因素：

- 1.突变文库的可用性：氨基酸分布均匀，避免有终止密码子而导致的截短产物，避免非预期密码子等。
- 2.强大的筛选方法：大型突变库需要高通量能力，才能有效筛选和识别稀有的顶级候选突变体。

## 不同突变文库的选择

金斯瑞提供以下三种主要的突变文库，用于满足各种客户的需求。

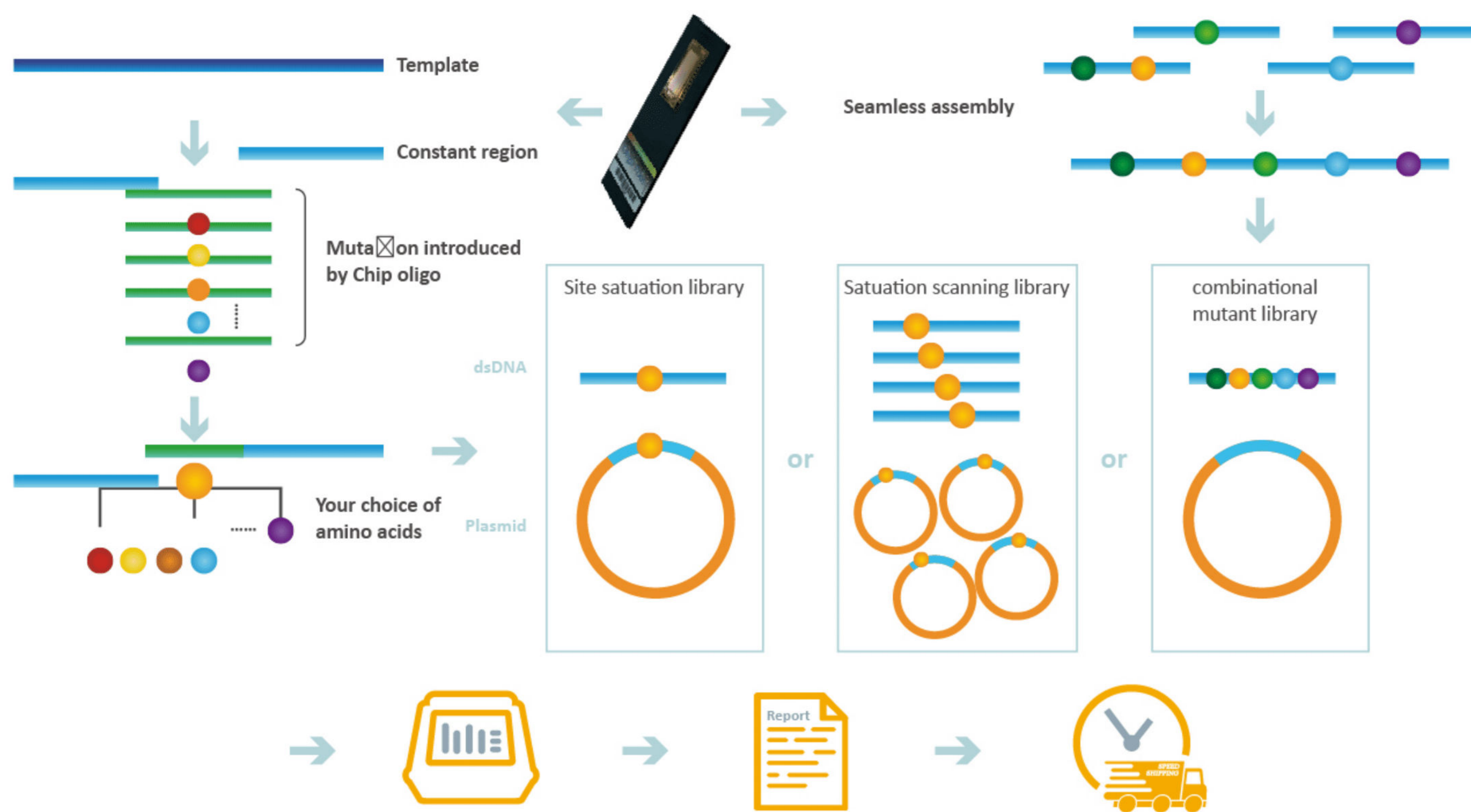


定点突变文库或扫描突变文库是在蛋白序列的一个区域或不同区域内对特定位置的氨基酸或连续氨基酸进行突变，一次突变成其他19种氨基酸。而组合突变文库涉及在蛋白序列内同时突变多个位置，每个突变体包含多种突变。

在文库构建的过程中，特定突变的引入可以通过引物池合成等技术来实现。金斯瑞的芯片引物池是基于半导体的阵列DNA合成平台，可以良好控制合成过程，获取精确引物池，从而获得精准突变文库。



在工程应用的背景下，定点突变文库和扫描突变文库适用于具有较小文库大小的靶向工程工作，而组合突变适用于具有有限合理设计输入的工程工作，因此需要大型文库进行突变体多样化。除了这3种较主流的突变文库类型，我们还可以提供随机突变文库，截短突变文库满足顾客不同需求。



**图2.基于半导体的阵列寡核苷酸构建突变文库的工作流程**

先构建引物，再通过PCR扩增的方法构建突变文库。再对文库进行NGS测序，并交付客户对应的检测报告。提供多种文库的形式交付，满足顾客的不同需求。



# 02

## 突变文库应用案例

抗体亲和力成熟

酶分子优化

AAV衣壳蛋白优化



## 抗体亲和力成熟

抗体是大的Y形糖蛋白，主要由B细胞产生，通过与病原体某些区域特异性识别、结合、相互作用来中和病原体，保护宿主生物体。抗体在其靶标结合和识别方面表现出的高亲和力和特异性，使得抗体成为各种疾病的治疗手段，并在体外诊断试剂的应用中大显身手<sup>4</sup>。与具有低亲和力抗体相比，具有高亲和力抗体将在更短的时间内结合更多量的抗原，大大地提高结合抗原的能力，以及检测的灵敏度。因此，近年来抗体工程在开发新试剂产品发展迅速，抗体工程的许多领域都取得了实质性的技术进步，包括抗体发现和文库设计、选择和筛选、表征、分析、宿主表达和大规模生产等。

初始抗体突变体文库可以由相应的精准DNA突变体文库表达得到，然后用于筛选表现出具有特定特性的抗体突变体。一旦构建了所需的精确突变库，它就可以进行多种类型的筛选方法，例如噬菌体展示、mRNA展示或细胞表面展示，来选择出具有特定特性的突变体（图4）。本次案例中文库的构建主要用于提高抗体结合靶抗原的结合亲和力。

以下案例将展示如何利用饱和突变文库提高目标抗体结合亲和力。在本研究中，我们构建了一个饱和突变文库，其中包含抗体轻链(VL)和重链(VH) 6个CDR区63个位点的突变体（图3）；按照文库构建工作流程（图4），通过精准扫描饱和突变将每个野生型的氨基酸密码子突变为其他19种氨基酸的密码子。

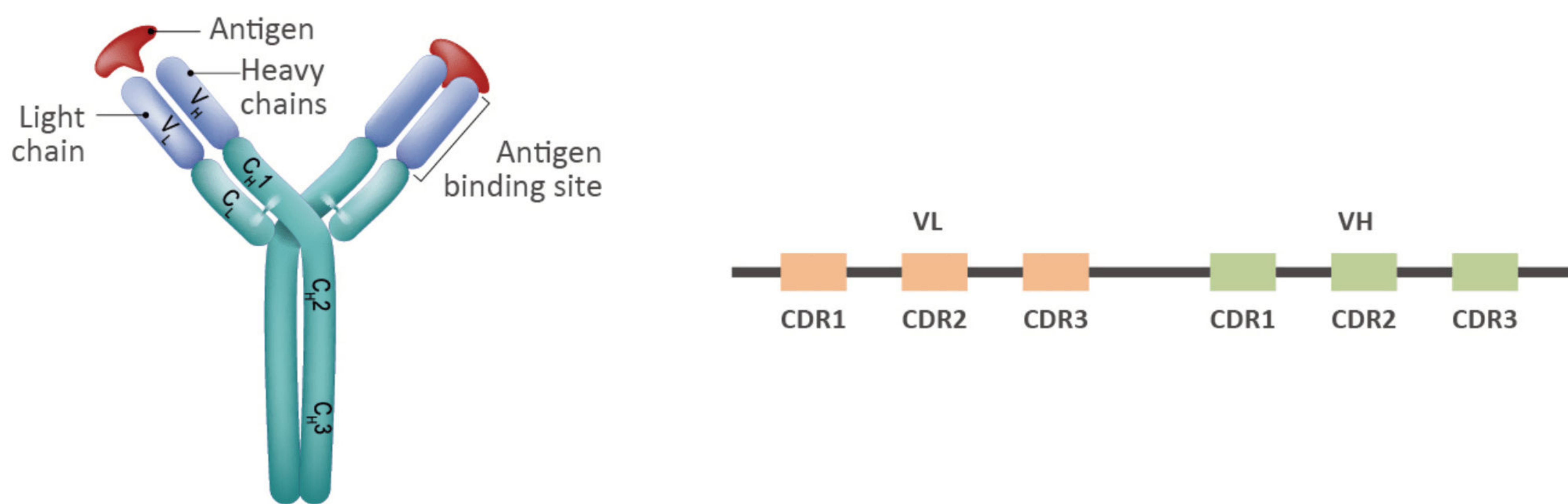


图3.目标抗体的轻链(VL)和重链(VH)示意图

该案例使用饱和突变文库靶向6个CDR区域，进行工程改造以提高亲和力。



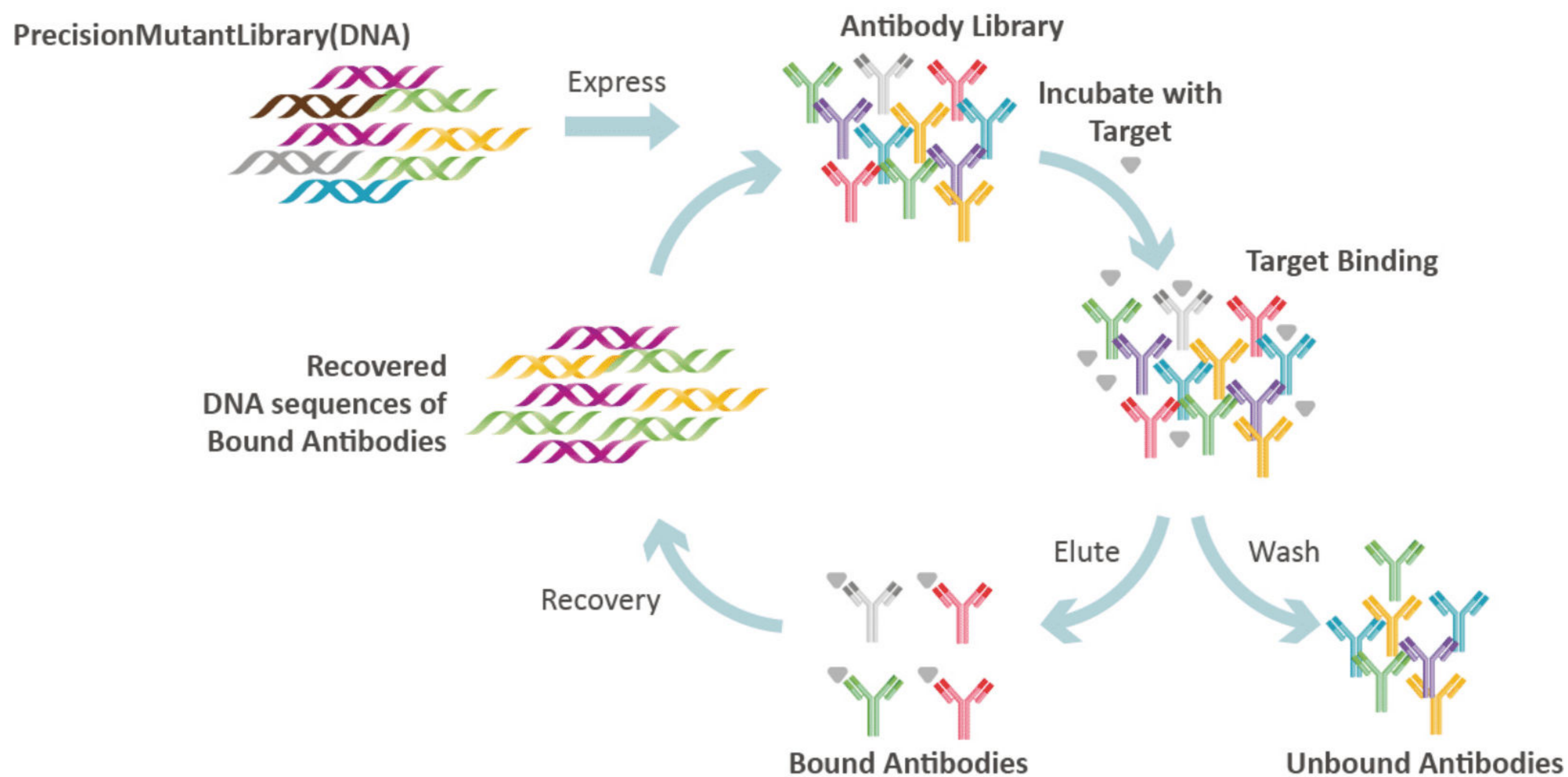


图4.精准DNA突变文库可以在抗体筛选过程中作为DNA突变体的初始池

结合的抗体随后被洗脱并回收其各自的DNA序列，这些序列随后可以作为下一轮筛选的初始池，可以根据具体需求进行多次重复筛选循环。

## 一. 构建突变文库，对每个氨基酸位点进行饱和突变

使用下一代测序(NGS)分析饱和突变文库的质量，确认每个突变位点的氨基酸分布和覆盖率。测序结果显示氨基酸分布相对均匀，突变体代表63个相应位点的所有19个非野生型氨基酸，呈现100%覆盖率的突变文库（图5）。

结果显示基于oligo pool构建的精准突变文库，可以精准控制每个突变体中使用的密码子，避免了非必要突变体，使得后续的筛选和表征过程更加容易。

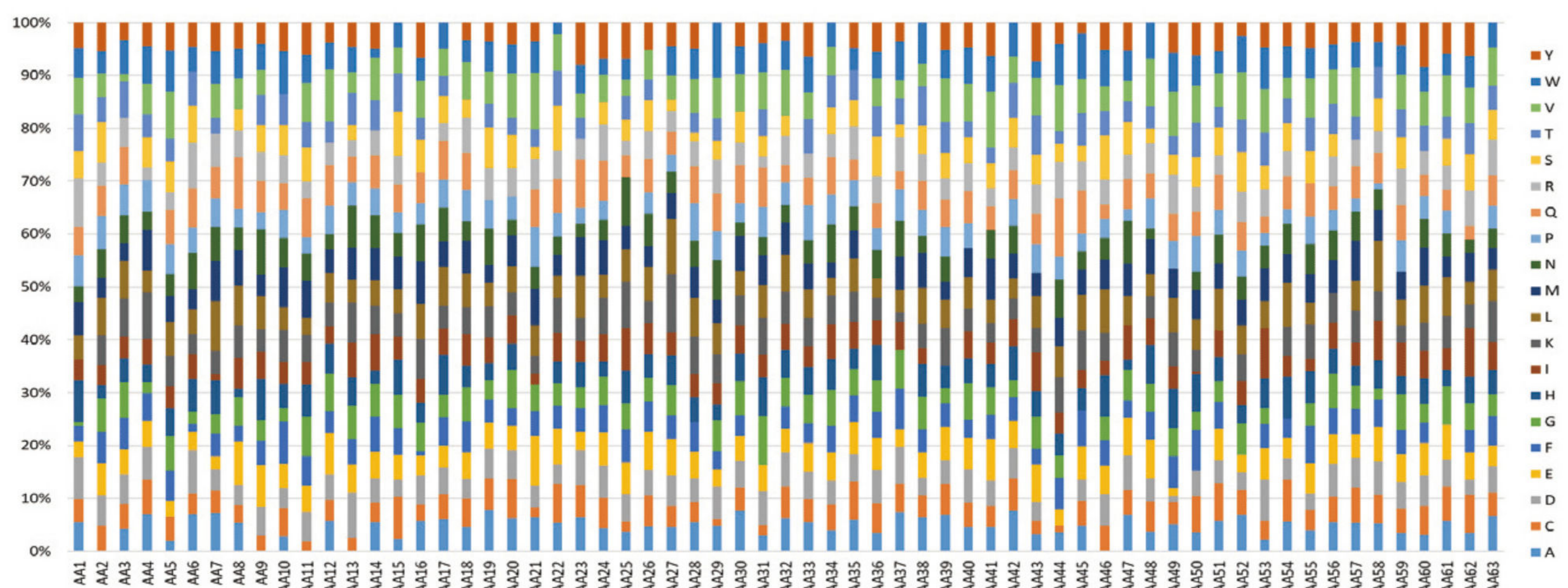


图5.利用下一代测序(NGS)技术确定饱和诱变文库的氨基酸分布

每个彩色条带代表一个单独的位点，每种颜色代表一种氨基酸(AA)。每个彩色条带的高度是在该位点具有该特定氨基酸的每个突变体的百分比。



## 二. 筛选出高亲和力抗体

构建的精准饱和扫描突变文库得到了涵盖63个突变位点的约3,000个克隆，利用FASEBA (Fast Screening of Expression, Biophysical-properties, and Affinity)的筛选方法，对约3,000个克隆进行筛选，选出更高亲和力的最佳突变体。FASEBA是一项专利技术，无需实际纯化候选抗体，直接根据表达水平、热稳定性和结合亲和力高通量筛选出最佳候选分子。使用这种筛选方法，确定了几个具有显著提高亲和力的突变体，如（图6）中的蓝色圆圈所示。

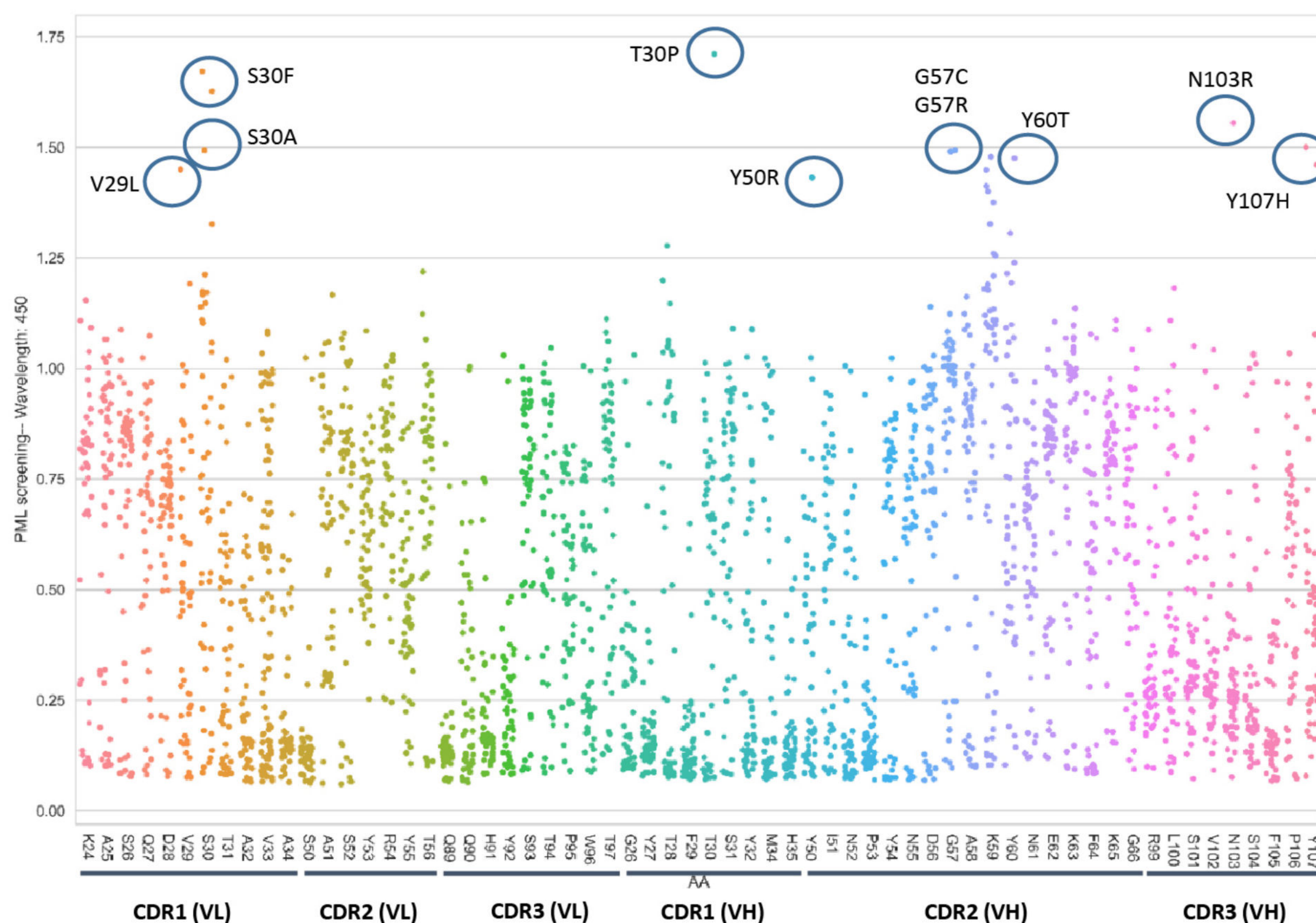


图6.所有突变体与野生型的亲和力比较情况

如图所示，X轴显示每个目标突变位点，每个点是该突变点的突变体，高于1的突变体代表其亲和力比野生型更高。蓝色圆圈是亲和力显著提高的克隆。

## 三.通过表面等离子共振分析表征最佳候选分子

使用Biacore的表面等离子共振(SPR)技术，对FASEBA筛选出的高亲和力突变体进行表征检测。SPR检测结果显示5个突变体的亲和力确实高于野生型（表1），其中一个突变体的目标结合高4个数量级，其余突变体的靶标结合高1-2个数量级。验证了精确突变体库对于抗体亲和力高通量、快速的筛选能力。



Mutation	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax
G57R	1.26E+05	4.17E-09	3.31E-14	112.5
V29L	1.41E+05	2.02E-07	1.44E-12	76.5
S30A	1.55E+05	1.51E-06	9.71E-12	59.5
Y50R	1.38E+05	3.63E-05	2.63E-10	50.3
Y107H	1.22E+05	3.27E-05	2.67E-10	167.6
WT	1.35E+05	7.28E-05	5.39E-10	107.2

表1.五个候选分子的结合亲和力

#### 四、使用组合突变文库进一步筛选

为了查看5个突变位点组合引起的亲和力变化，再次基于oligo pool构建精准饱和组合突变文库，该类文库能够在每个单个突变体中同时发生不同突变（图7），此次得到了96个克隆，再次利用FASEB A进行初筛，并使用SPR结合试验验证发现了3种组合可以更好的提高抗体亲和力（表2）。

这些结果突出了利用不同类型精确突变体文库，能够产生更高亲和力的候选分子。



图7.目标抗体特定CDR区域中5个突变点都有较高的亲和力，这些突变位点每个都标有“x”



Mutant Combination	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax
Y50R/Y107H/S30A	5.83E+04	7.17E-09	1.23E-13	13.7
Y107H/S30A	3.38E+04	6.46E-09	1.91E-13	143.5
Y50R/Y107H	3.87E+04	3.34E-06	8.63E-11	33.7
WT	4.80E+04	3.95E-05	8.22E-10	45.8

表2.以下三种组合类型的突变体，其结合亲和力较野生型更高

上述实验及结果证明，不同阶段利用不同类型的精准突变文库能够高效的、高通量的助力抗体亲和力成熟。

## 酶分子优化

酶是一大类以蛋白质为主体的生物催化剂，迄今为止，从生物界已发现和定性了近3,000种酶，分属氧化还原、转移、水解、裂合、异构、连接六大酶类。酶的应用范围已遍及食品工业、农业、医药卫生行业、环保、能源开发和生命科学等各个方面<sup>5</sup>。但是，酶对外界环境如pH和温度等很敏感，而实际的反应条件和生物体的生理环境差异较大，因此酶在实际应用中不稳定、容易失活，催化效率下降。酶的这一特点大大限制了其工业化应用<sup>6</sup>。近年来随着分子生物学、结构生物学、计算生物化学等学科的兴起，酶工程有了更好的发展，设计生产性能优良的酶分子，使酶能够更好的在工业生产中发挥其作用。

这是一个酶工程案例研究（图8），这个酶有484个氨基酸，需要通过靶向突变3个不同区域来探索酶的活性改善的可能性。第一个区域有14个位点，第二个区域有12个，第三个区域也有12个。通过设计饱和扫描诱变文库，将每个位点都将突变为其他19种非野生型氨基酸，从而产生总共722个突变体。这些所有的突变体，客户希望都在一个池中交付。



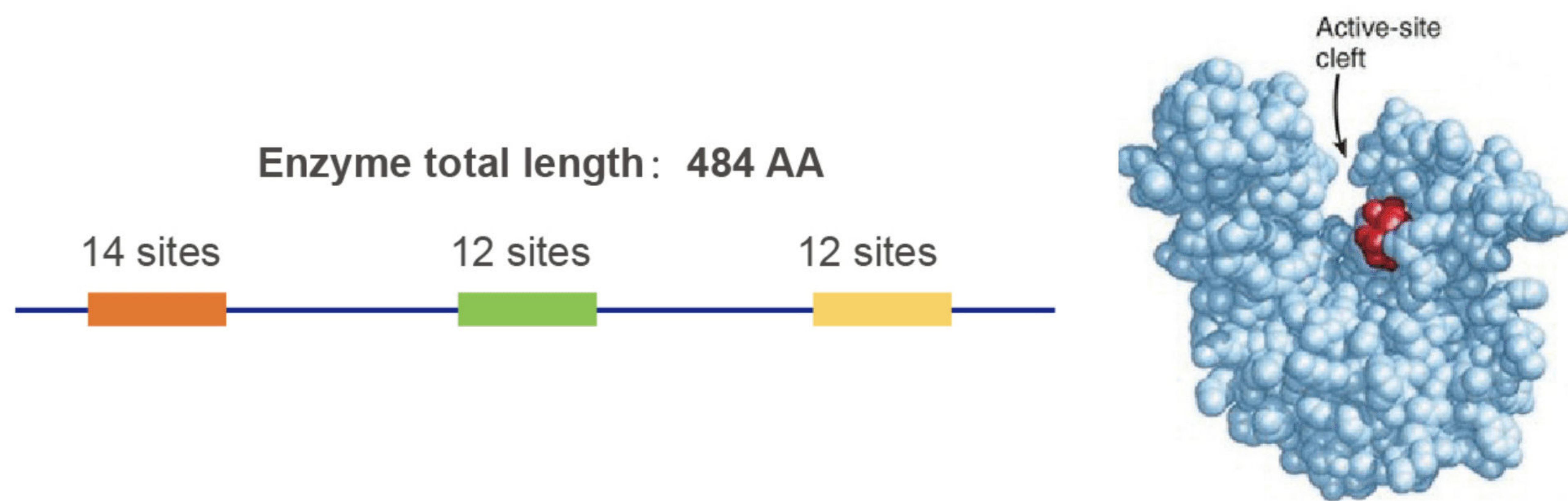


图8. 目标酶分子及突变设计示意图

通过下一代测序（NGS），发现三个区域的覆盖率为100%（图9）。黄色块是野生型，对于所有三个区域的每个单个突变位点，我们都能够替换所有19个其他非野生型氨基酸，代表所有三个区域的覆盖率为100%。

	A	C	E	D	G	F	I	H	K	M	L	N	Q	P	S	R	T	W	V	Y
181	4.4%	4.8%	5.2%	6.7%	2.5%	4.6%	6.5%	6.0%	6.3%	5.0%	5.0%	4.7%	4.5%	5.8%	5.3%	7.0%	5.2%	3.7%	5.5%	
182	4.3%	5.3%	6.0%	2.4%	5.9%	6.2%	6.3%	4.8%	6.5%	6.2%	7.1%	5.4%	3.6%	6.3%	3.6%	3.5%	5.0%	5.5%	5.6%	
183	4.9%	4.4%	5.9%	5.9%	3.6%	4.4%	8.5%	7.8%	4.8%	5.9%	5.0%	5.7%	2.7%	4.8%	4.8%	5.7%	4.3%	3.7%	5.4%	
184	3.7%	3.0%	4.0%	0.3%	5.0%	5.7%	0.5%	5.2%	0.7%	4.0%	5.0%	0.1%	2.7%	5.7%	4.0%	4.0%	5.2%	5.0%	6.1%	
185	3.9%	5.6%	5.6%	3.8%	3.1%	6.3%	7.4%	7.1%	5.3%	6.7%	4.5%	4.7%	3.3%	5.3%	4.9%	5.2%	4.4%	5.1%	7.9%	
186	3.9%	4.8%	4.4%	5.5%	2.8%	6.8%	5.0%	7.6%	5.9%	6.3%	3.4%	7.3%	7.3%	2.3%	4.9%	3.3%	5.1%	4.1%	6.7%	
187	4.4%	4.5%	5.2%	3.7%	4.6%	5.7%	5.8%	6.0%	6.4%	6.3%	6.1%	5.7%	4.4%	6.1%	4.7%	6.4%	4.4%	3.4%	6.3%	
188	6.1%	4.1%	5.6%	5.1%	2.7%	6.6%	8.1%	4.8%	5.3%	4.7%	4.5%	6.3%	5.1%	3.5%	6.5%	1.9%	6.5%	3.6%	5.7%	
189	4.0%	3.3%	4.6%	6.0%	4.6%	5.3%	5.3%	5.8%	5.7%	5.3%	5.3%	4.3%	3.1%	5.6%	3.4%	5.1%	6.3%	3.1%	5.3%	
200	4.5%	3.1%	5.6%	5.8%	3.8%	6.7%	5.9%	6.5%	6.9%	4.5%	5.7%	3.5%	4.1%	6.1%	5.5%	6.6%	4.2%	4.8%	7.3%	
201	5.4%	3.0%	4.3%	3.4%	3.0%	6.6%	6.5%	6.0%	7.5%	3.3%	3.3%	6.6%	5.7%	4.1%	5.1%	5.5%	5.7%	4.3%	4.6%	
202	5.1%	5.1%	6.5%	3.8%	2.5%	7.0%	5.6%	6.8%	5.7%	7.2%	4.8%	5.8%	5.2%	4.2%	4.9%	3.9%	6.7%	5.0%	4.3%	
203	4.6%	3.6%	4.5%	5.2%	5.2%	6.4%	5.6%	6.5%	4.7%	5.3%	6.0%	4.5%	5.3%	3.7%	4.5%	4.3%	5.2%	3.3%	4.3%	
204	4.3%	4.0%	4.5%	4.4%	3.1%	6.8%	6.5%	6.1%	5.3%	4.7%	6.7%	4.4%	4.4%	4.1%	6.1%	3.1%	6.5%	6.0%	5.5%	
205	3.2%	3.4%	0.0%	2.0%	4.2%	0.0%	0.0%	4.4%	0.1%	5.0%	0.4%	4.2%	4.2%	3.4%	4.3%	0.4%	4.0%	5.0%	0.1%	
264	3.9%	4.6%	4.2%	3.3%	5.3%	5.8%	5.3%	4.0%	7.3%	6.7%	4.8%	5.2%	5.1%	6.5%	3.0%	4.2%	5.2%	6.0%	6.6%	
265	3.0%	5.0%	0.0%	4.0%	4.0%	5.0%	0.2%	4.4%	3.3%	5.3%	4.0%	0.3%	0.0%	0.0%	4.5%	4.4%	5.0%	4.0%	0.1%	
266	3.7%	5.3%	4.5%	4.3%	2.8%	4.7%	7.2%	4.9%	7.4%	6.1%	4.2%	6.1%	4.7%	2.5%	5.3%	4.8%	4.2%	7.6%	6.5%	
267	4.0%	5.1%	4.7%	5.5%	2.7%	7.2%	8.0%	6.4%	7.4%	5.2%	5.5%	5.5%	3.4%	2.8%	7.8%	5.8%	5.8%	3.8%	5.7%	
268	3.4%	4.5%	4.5%	5.7%	3.8%	6.7%	5.6%	7.3%	4.4%	4.3%	5.0%	6.1%	3.6%	6.2%	4.0%	7.0%	4.3%	5.3%	6.5%	
269	3.6%	2.3%	3.8%	3.5%	4.0%	7.3%	8.3%	8.2%	4.3%	4.6%	9.1%	6.2%	3.3%	4.8%	1.8%	6.1%	2.7%	5.3%	6.9%	
270	3.3%	4.4%	4.7%	5.4%	4.3%	5.6%	6.5%	7.4%	5.7%	5.7%	5.5%	4.5%	3.7%	6.2%	5.3%	5.3%	3.8%	5.4%	5.3%	
271	4.4%	6.2%	6.3%	2.6%	5.7%	5.7%	4.9%	5.3%	4.3%	3.7%	6.0%	6.2%	4.3%	6.9%	5.5%	5.0%	4.2%	4.9%	6.3%	
272	4.3%	4.3%	4.3%	5.4%	3.2%	5.7%	6.3%	6.6%	6.5%	3.6%	5.5%	4.3%	3.5%	7.0%	3.7%	5.1%	4.7%	4.5%	8.1%	
273	4.3%	5.7%	5.2%	4.8%	4.5%	6.7%	5.6%	4.8%	6.3%	6.0%	6.7%	3.7%	4.5%	4.4%	4.6%	6.7%	5.6%	5.3%	6.0%	
274	4.4%	4.3%	5.6%	2.7%	6.4%	6.3%	7.6%	6.0%	4.3%	6.0%	6.1%	5.3%	3.6%	4.5%	5.6%	4.7%	5.0%	4.3%	5.5%	
303	4.6%	5.5%	7.6%	6.0%	4.9%	4.1%	5.3%	4.4%	6.1%	6.5%	4.2%	6.5%	4.5%	5.6%	4.6%	6.5%	3.2%	5.8%	6.0%	
304	5.0%	4.0%	0.0%	5.2%	3.0%	4.1%	5.0%	5.0%	5.2%	5.1%	4.5%	0.0%	4.3%	4.4%	3.4%	0.4%	0.3%	0.3%	0.2%	
305	5.0%	5.3%	5.1%	4.9%	3.1%	6.2%	6.1%	7.4%	5.9%	5.2%	3.7%	6.2%	5.3%	2.7%	6.1%	4.4%	6.1%	3.8%	7.2%	
306	3.0%	3.4%	6.1%	6.2%	2.9%	6.8%	6.0%	5.3%	6.6%	4.3%	3.6%	6.4%	5.3%	3.1%	6.2%	5.7%	5.4%	4.3%	5.6%	
307	3.7%	4.4%	4.2%	6.0%	3.8%	6.4%	7.4%	8.3%	3.7%	5.3%	6.0%	5.7%	4.1%	4.6%	4.2%	4.2%	3.3%	7.0%	6.6%	
308	4.9%	5.1%	5.1%	5.2%	1.1%	5.2%	4.9%	7.0%	5.3%	5.9%	5.9%	1.5%	5.3%	4.8%	5.5%	1.7%	6.4%	4.2%	7.2%	
309	5.1%	5.7%	4.5%	5.8%	3.7%	4.5%	5.5%	6.1%	6.3%	4.2%	7.1%	6.3%	2.0%	4.6%	3.4%	4.5%	5.4%	4.3%	5.3%	
320	3.5%	5.4%	5.0%	5.8%	4.3%	7.1%	6.4%	4.7%	5.1%	5.2%	5.7%	6.1%	4.3%	4.6%	4.9%	6.5%	4.8%	5.8%	5.7%	
321	3.3%	4.3%	3.6%	6.0%	3.0%	6.8%	5.3%	5.7%	5.3%	6.8%	6.5%	4.3%	3.1%	5.6%	5.6%	6.5%	3.6%	6.2%	7.0%	
322	5.0%	4.8%	4.6%	6.5%	2.9%	6.8%	5.7%	5.1%	4.2%	4.6%	6.8%	3.3%	2.8%	5.6%	3.3%	6.5%	3.6%	5.7%	7.2%	
323	4.7%	6.2%	4.3%	4.0%	5.9%	6.2%	7.5%	4.9%	5.2%	4.3%	6.3%	4.3%	4.0%	4.8%	4.3%	5.2%	4.7%	6.3%	5.5%	
324	4.2%	4.5%	4.5%	7.9%	3.9%	6.4%	7.1%	5.8%	5.3%	5.3%	4.2%	6.3%	4.3%	5.2%	4.3%	4.1%	6.4%	4.4%	6.4%	

Mutant # Designed : 266  
 Mutant # Detected by NGS : 266  
 Coverage : 100%

Mutant # Designed : 228  
 Mutant # Detected by NGS : 228  
 Coverage : 100%

Mutant # Designed : 228  
 Mutant # Detected by NGS : 228  
 Coverage : 100%

图9.利用NGS构建的文库进行测序，得到的测序结果

NGS测序的报告是比NGS数据的更直观的呈现方式。每个彩色块都是一个氨基酸（图10），对于每个突变位点，所有氨基酸都是均匀分布的，这意味着这是一个高度多样性的文库，没有特定氨基酸不足或过度表达，无偏差文库可大幅减轻筛选负担。



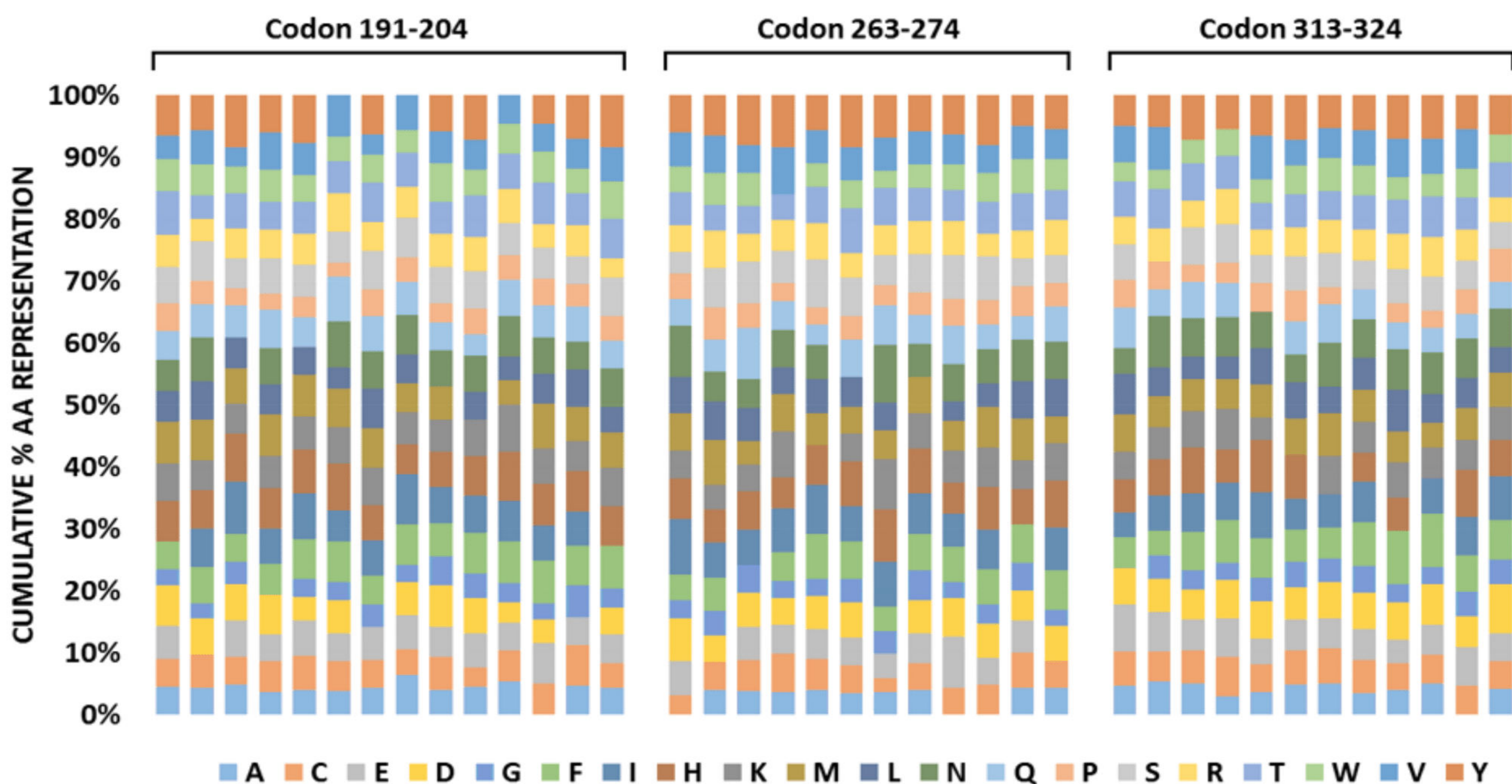


图10. NGS报告



精准控制AA比例



文库高度多样性



文库高度多样性

## AAV衣壳蛋白优化

腺相关病毒(AAV)作为载体进行基因治疗已经越来越受人们的青睐，其安全性在帕金森病、囊性纤维病和视网膜疾病等单基因突变疾病临床治疗中得到证明。利用AAV载体进行临床治疗的应用在逐渐增多，提高AAV靶向性和转染效率是人们期盼解决的一道难题。目前对AAV衣壳蛋白基因工程的修饰，可以明显提高其转导效率和靶向性，一定程度上扫除了广泛应用AAV的障碍<sup>7</sup>。

天然的AAV并不特异性地靶向患病的细胞和组织，它们可以被免疫系统识别，因而限制它们的治疗成功性。为了改进AAV，合成生物学家一直在采用“定向进化”方法，即在组成AAV病毒衣壳的衣壳蛋白中，让直接接触靶细胞的衣壳蛋白的特定氨基酸发生随机突变。通过评估哪些氨基酸变化可以将AAV递送到靶组织，并在艰巨的迭代过程中将突变依次层叠，他们旨在改进所需的AAV特性<sup>8</sup>。



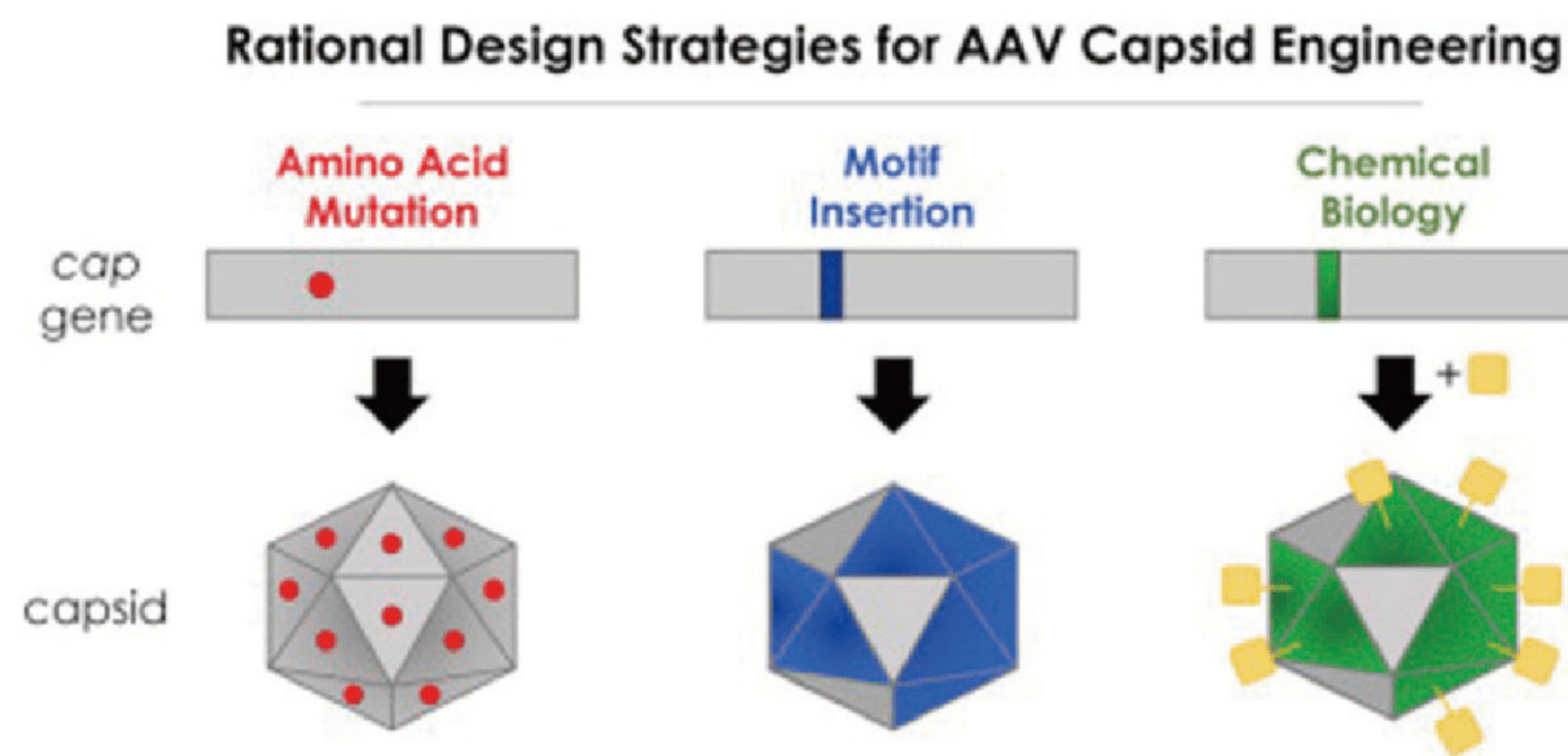


图11. AAV衣壳蛋白工程中的定向进化设计策略

下面的这个案例研究，客户希望改造AAV的衣壳蛋白，实验设计时，针对4个特定的靶向位点同时进行突变（图12），但是每个突变点并不全覆盖20种AA，他们依据氨基酸的种种特性，在每个突变位点上，仅使用特定的7种密码子，以此来探究衣壳蛋白功能改善的可能性。

Mutant Combination	Rmax
Basic	HRK
Acidic	DE
Sulfur-containing	MC
Aromatic	FWYH
Hydroxylic	ST
Amidic	QN
Proline	P

表3. 不同氨基酸的特性分类



为此，我们设计了一个组合突变文库，共包含约2,401个突变体。并且根据他们的表达系统进行密码子优化，最终交付一个包含所有突变株的突变文库。我们能够成功的将顾客所有的需求进行梳理设计，并创建其所需的突变文库，并做到100%的覆盖率。



图12.衣壳蛋白位点突变示意图

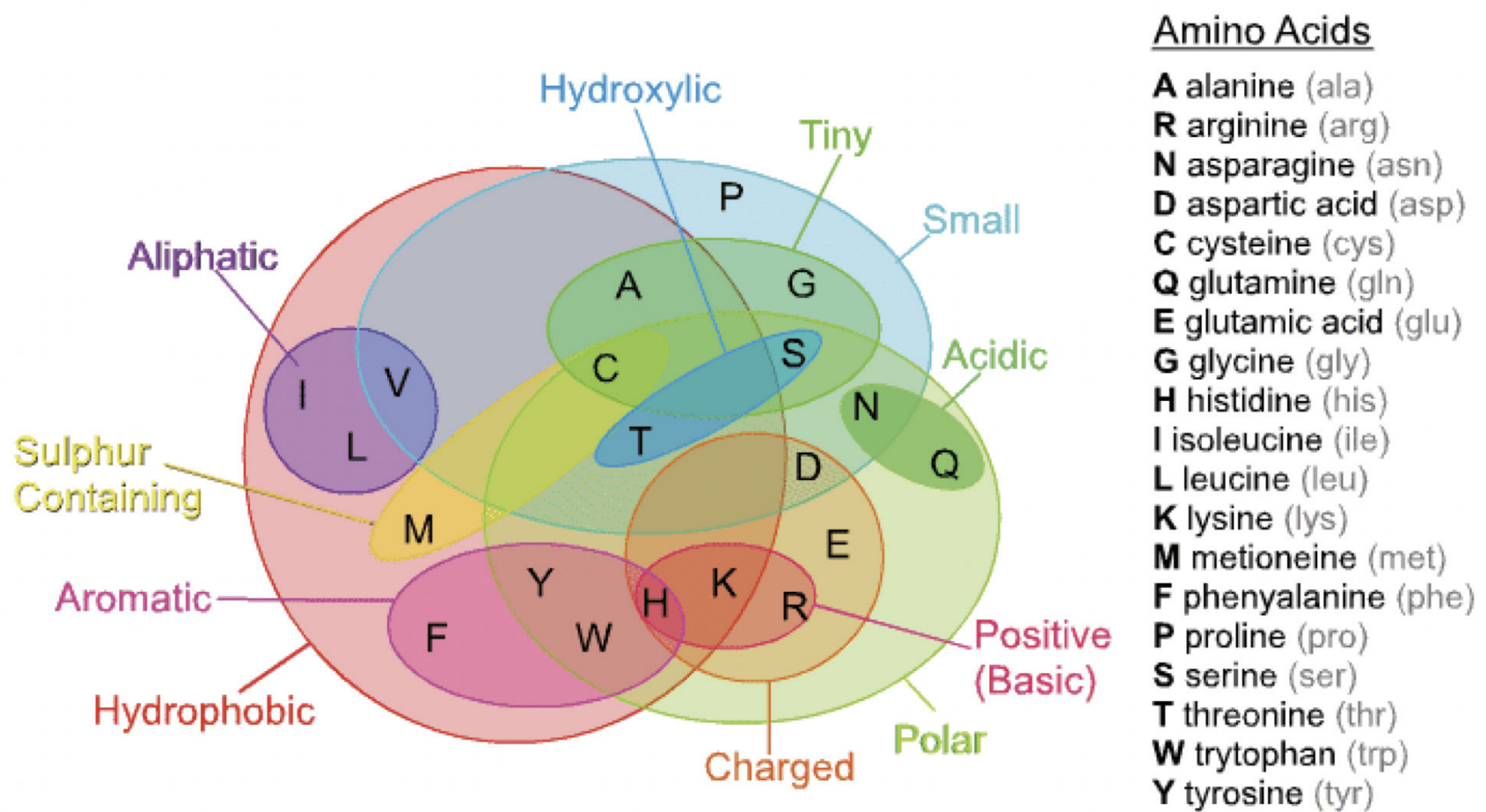


图13.氨基酸维恩图及其共同点/不同点的各种特征



# 03

## 突变文库合成类型

不同突变文库合成方法比较

金斯瑞突变文库服务优势



## 不同突变文库合成方法比较

	NNK文库	Trimer组合文库	精准突变文库
引物类型	简并引物	Trimer 引物	芯片构建引物文库
价格	低	较低	中
密码子种类	32种	20种	可定制
氨基酸种类	20种	可定制	可定制
密码子适配物种	所有物种	<i>E.coil</i> & Yeast	所有物种
终止密码子数目	1	0	可定制
非预期密码子	有	无	无
密码子优化	不支持	不支持	支持
覆盖率&均一度	较差	高	高

表4.不同突变文库合成方法的比较

### 精准突变文库

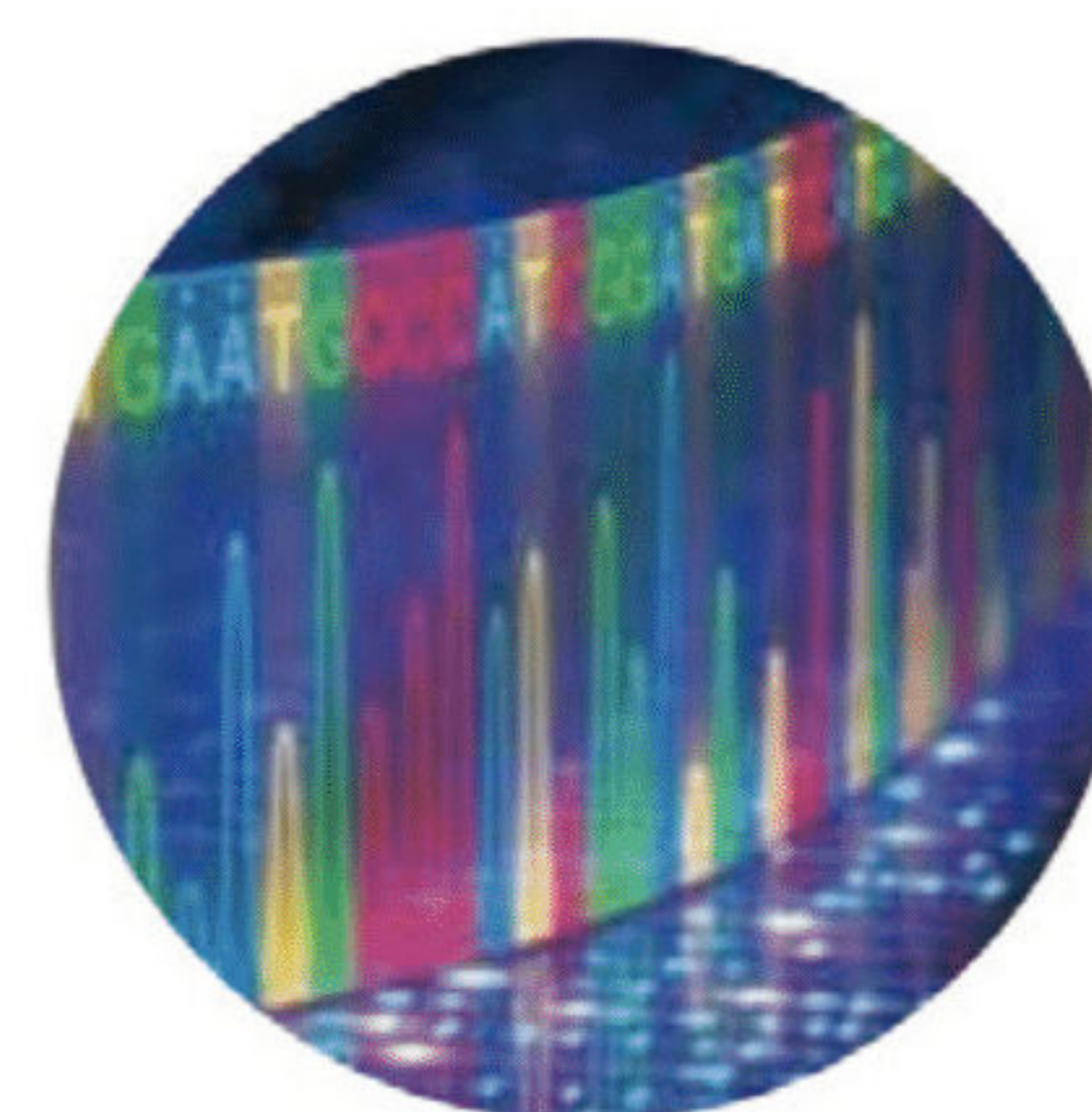
精准突变文库(PML)是基于半导体的阵列DNA合成平台来构建的，能够精确控制密码子，而使用简并密码子的传统方法构建的文库是无法做到的。金斯瑞PML可以提供均匀分布的氨基酸，几乎没有偏差，并可以引入用户定义的密码子（包括密码子优化和消除不需要的密码子或终止密码子）。



精准控制简并密码子分布率



100%文库覆盖率



NGS或Sanger验证文库质量



利用PML和NNK文库方法，构建具有4个突变位点的组合突变文库，产生了两种不同的PML和NNK文库（图14）。在这次实验中，第1位有3个特定氨基酸，第2位有10个特定氨基酸，第3位和第4位各有20个氨基酸。两个文库的氨基酸分布图如图8所示。图中看出至少3点区别：1. NNK会引入终止密码子；2. NNK无法选择一部分氨基酸；3. NNK的分布极不平均（均一度差）。此外，还发现PML在每个突变位点实现完全突变覆盖度显著高于NNK文库（筛选了48、72和96个克隆）。

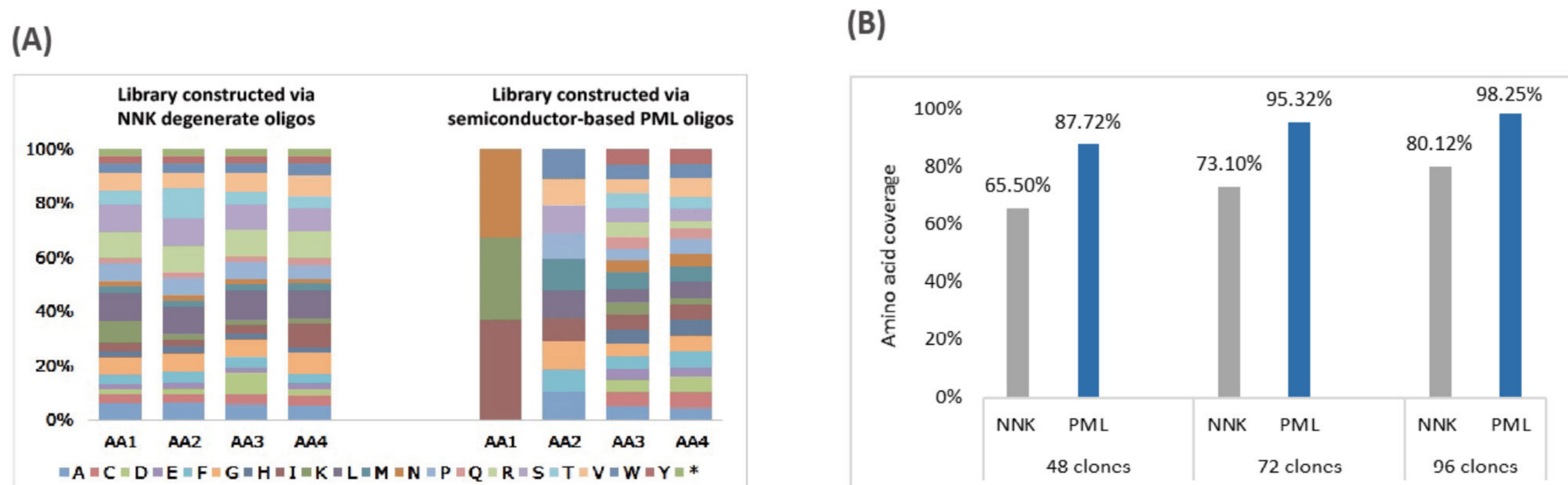


图14. PML和NNK库之间的比较

(A)基于半导体的DNA合成平台构建的精准突变文库(PML)（右）和通过NNK简并密码子（左）构建的突变文库的氨基酸分布图。PML方法实现了自定义的氨基酸谱，在顾客定义的4个突变位点均具有均匀分布的氨基酸，而NNK文库方法导致氨基酸分布不均匀，无法仅纳入用户定义的密码子。(B)两个不同文库的筛选效率。PML方法有更高的筛选效率，因为PML具有更高的多样性、覆盖率和且无偏差氨基酸分布。

PML不仅可以实现氨基酸的均匀分布，且仅含所需的突变序列，而NNK文库并不具备这样的能力，从而降低了后续的筛选效率。突出了PML在蛋白质工程中的优势，为顾客节约大量的时间和成本。

## Trimer组合突变文库

常规的引物合成中，A/T/G/C是分开的，每个位点按照设计的序列，只有一个碱基能加上来。简并引物的ATGC是混合在一起的，随机加上一个碱基，可能是A，可能是T，可能是G，也可能是C。每个碱基理论上应该是各25%，但是实际情况中，偏差会比较大，且简并引物无法避免终止密码子的出现。

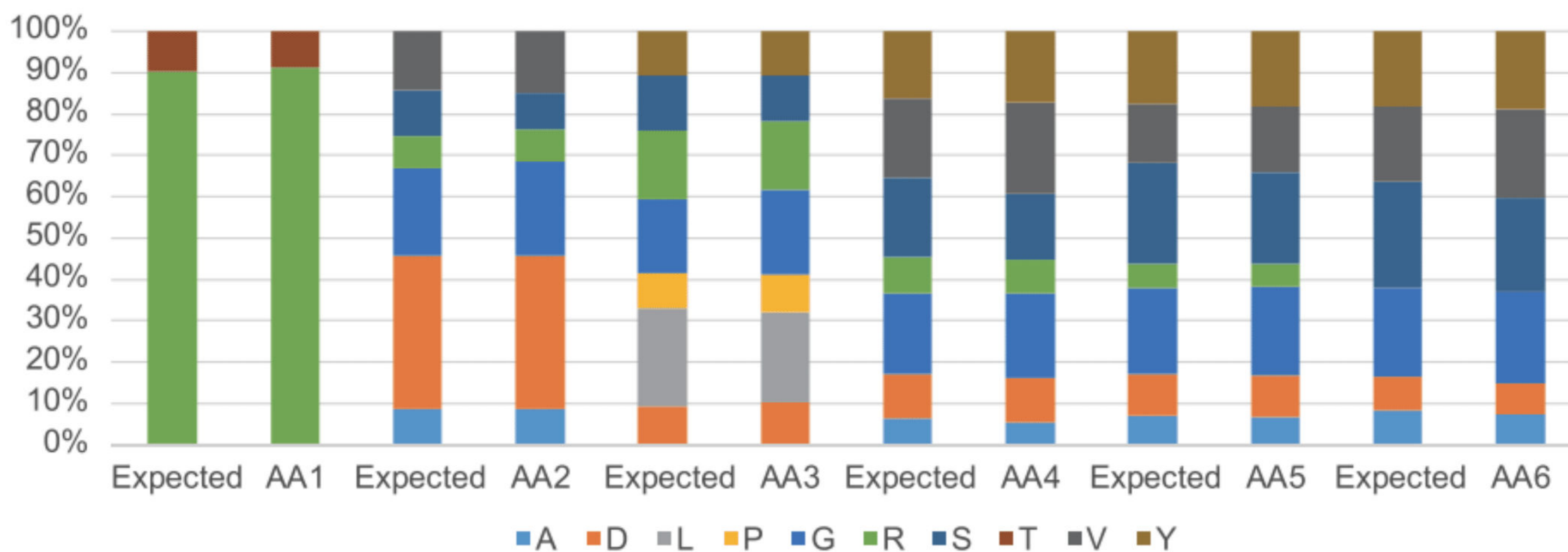
Trimer引物则每次加上是3个碱基，每个Trimer对应一种氨基酸，如果我们预先把Trimer按照一定的比例混合，就可以实现氨基酸层面种类及比例完全的定制化，而且实际氨基酸比例可以跟预期达到很好的一致性。所以Trimer引物适合于高多样性、对质量要求较高的文库构建。





图15.常规、简并和Trimer引物的合成过程及特点

使用Trimer phosphoramidites（三联体密码子）合成含有特定位点突变的Oligo序列，单突变位点可以覆盖20种氨基酸分布。将多种Trimer引物作为整体的合成原料，合成至序列中预定位置，即可得到符合预定序列的引物库。



支持非等比例定制化突变，各种氨基酸比例分布与设计比例高度匹配



## 金斯瑞突变文库服务优势

金斯瑞的突变文库不仅可用于抗体工程，还可用于其他类型的工程，例如启动子工程、酶工程和蛋白质工程（非酶或非抗体）以及用于各种生物技术和生物制药应用的病毒载体工程。



### 订购信息

🌐 [www.genscript.com.cn](http://www.genscript.com.cn)

☎ 400-025-8686-5820

✉ [gene@genscript.com.cn](mailto:gene@genscript.com.cn)



## 参考文献

- 1.Chen, R. Enzyme Engineering: Rational Redesign versus Direction Evolution.Trends in Biotechnology. 19: 13-14 (2001).
- Kuhlman, B. and Bradley, P. Advances in protein structure prediction and design. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 20: 681-697 (2019).
- Davis, A.M. et al. Directing evolution: the next revolution in drug discovery? Nature Reviews Drug Discovery, 16:681-698 (2017).
- Maynard, J. and Georgiou, G. Antibody Engineering. Annual Review of Biomedical Engineering. 2: 339-376 (2000).
- 5.朱俊晨,王小菁.酶的分子设计,改造与工程应用.中国生物工程杂志. 2004 Aug25;24(8):32-7.
- 冯旭东,李春.酶的改造及其催化工程应用.化学进展. 2015 Nov 15;27(11):1649.
- 7.连文昌,许佳佳,李招发. AAV衣壳蛋白基因工程的修饰研究进展[J].生物技术通报, 2011 (12): 22.
8. Pierce J. Ogden et al. Comprehensive AAV capsid fitness landscape reveals a viral gene and enables machine-guided design. Science, 2019, 10.1126/-science.aaw2900.



更多详情，欢迎访问

🌐 [www.genscript.com.cn](http://www.genscript.com.cn)

☎ 400-025-8686-5820

✉ [gene@genscript.com.cn](mailto:gene@genscript.com.cn)

📍 江苏省南京市江宁科学园雍熙路28号