

噬菌体展示^{1,2}：

噬菌体展示技术

M13 噬菌体的基因组为 circular ssDNA，在宿主（E. coli）体内复制成 circular dsDNA 后进行滚环复制。

常用噬菌体或者噬菌体质粒(phagemid)进行操作，步骤一般如下：

1. 使用噬菌体质粒构建 DNA 文库（cDNA 更佳？）
2. 用帮助噬菌体（含复制需要的基因，但是 M13 ori 缺陷）侵染 E. coli，得到子代噬菌体
 - a) 注意要鉴定表面蛋白的功能与结构是否正常（方法？）
 - b) 鉴定正常后考虑随机 mutagenesis 扩大文库，如 error-prone PCR, Kunkel Mutagenesis, bacterial strain with error-prone replication
 - c) 注意文库大小至少是待筛蛋白数的 100 倍以上才有筛选意义
3. 生物淘金 (biopanning)，即完成一个富集的过程，用洗脱得到的噬菌体重新感染宿主细胞，以扩大待选噬菌体数
4. DNA 测序

常用噬菌体系统

TABLE 5.1 Properties of Bacteriophages Utilized in Phage Display

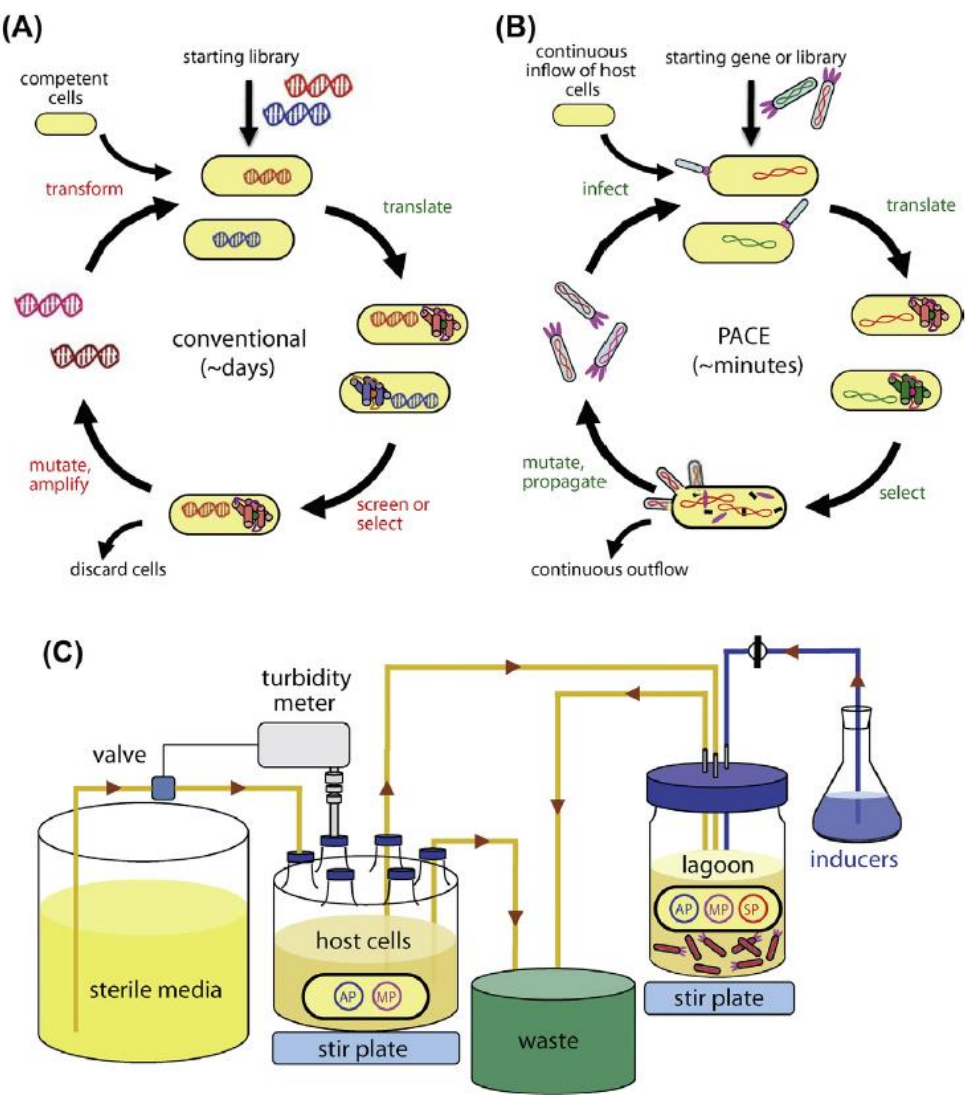
	M13	T4	T7	Lambda
Genome size	6.4kB	168kB	40kB	48.5kB
Display protein	All coat proteins, usually pIII and pVIII	SOC and HOC	gp10	pD, pV
Display limit	110kDa on pIII 10kDa on pVIII	710kDa	132kDa	600kDa
Protein function	Essential	Nonessential	Essential	Essential
Display density	3-5 copies on pIII Up to 2700 copies on pVIII	Up to 810 copies on SOC Up to 155 copies on HOC	Up to 415 copies	Up to 405 copies on pD 6 copies on pV
Life cycle	Lysogenic	Lytic	Lytic	Lysogenic

其它展示技术：

体内：细胞表面展示系统：细菌（G+,G-），酵母

体外：核糖体展示，cDNA/mRNA 展示，CAD and CIS 展示，SNAP tag 展示

噬菌体辅助进化 (phage-assisted continuous evolution, PACE) 技术



Esvelt KM, Carlson JC, Liu DR. A system for the continuous directed evolution of biomolecules. Nature 2011;472(7344):499–503.

PACE 可以对一切与转录相关的蛋白分子的进行改造与定向进化。以 T7 RNA 聚合酶(T7 RNAP)为例子，野生型的 T7 RNAP 不能识别 T3 启动子，因此不能启动 T3 启动子下游基因转录。PACE 技术使用了改造的 M13 噬菌体(engineered M13 phage, selection phage, SP)侵染宿主，其中，宿主细胞含有：

#	编码蛋白	作用
辅助质粒(accessory plasmid, AP)	编码 pIII 蛋白	反式互补
致突变质粒 (mutagenesis plasmid, MP)	编码显性抑制突变的 DNA 聚合酶校对亚基 (DNA polymerase dominant negative proofreading subunit dnaQ926)	致突变，并抑制 proofreading

	以及易突变的修复 DNA 聚合酶 V (error-prone repair DNA polymerase pol V.)	
--	---	--

改造的 M13 噬菌体编码 pIII 的基因被待进化的基因所替换，在这里被 T7 RNAP 基因所替换。只有当改造后的 M13 噬菌体侵染了含有 pIII 蛋白的宿主时，子代噬菌体才可以得以包装并释放。而宿主细胞 AP 上的 pIII 基因由 T3 启动子所控制，因此只有当 T7 RNAP 发生突变，获得识别 T3 启动子的能力时，才会由子代噬菌体生成。而 T7 RNAP 的进化由 MP 编码的蛋白质辅助完成，其中 DNA Pol V 的启动子为阿拉伯糖启动子，受到 ara 的调控启动，当 ara 与 AraC 同时存在时 DNA Pol V 基因才得以表达。

PACE 的另外一个重要结构是流控系统。流控系统将细菌培养液按一定的流速泵入含有噬菌体的贮水池(lagoon)中，控制一定的流速使得细菌不在贮水池内分裂而噬菌体基因组却可以在胞内多次复制扩增。这样一来，在加入诱导剂的情况下，可以防止宿主基因组突变的积累造成实验误差，得到非预期的进化结果；同时噬菌体基因组的多次复制使得 T7 RNAP 的定向进化成为可能。当 T7 RNAP 对 T3 启动子的灵敏度增强后，突变就会通过子代噬菌体保留下来，重复以上流程即可对 T7 RNAP 定向进化。

对于不同的目标蛋白，可以采用不同的策略增大定向进化的效率。如对于上述流程，可以将 T3 启动子更换成 T7/T3 杂合启动子（二者只有一个碱基对的差异），可以极大提高定向进化的速率与成功率。（我觉得可能是因为 T7 启动子部分会使原始变异更容易积累）

效率：无额外人力参与的情况下，24hrs 内可以进行数十次的进化

对 PACE 的评价：巧妙地把噬菌体的数量与待进化蛋白质的生物活性联系了起来，并且通过流控系统确保突变位点位于噬菌体基因组而不是宿主基因组上。但是该技术只能加速与基因转录相关的蛋白的定向进化，而且最后平板噬菌斑的噬菌体突变位点会有所不同，需要寻找一致突变（consensus）并进行进一步的表征来确定最适突变。

参考文献

1. Marintcheva, B. Phage Display. in *Harnessing the Power of Viruses* 133–160 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-810514-6.00005-2.
2. Esvelt, K. M., Carlson, J. C. & Liu, D. R. A system for the continuous directed evolution of biomolecules. *Nature* **472**, 499–503 (2011).