

特邀综述

唐双焱 中国科学院微生物研究所研究员，博士生导师。从事蛋白质工程领域研究，侧重于定向进化策略和高通量筛选方法的设计。主要从事碳水化合物酶类如糖苷酶、糖基转移酶的改造以及在大肠杆菌中生物合成高价值小分子化合物的研究。已在国内外重要学术期刊如 JACS, Angew Chem Int Ed 等发表多篇研究论文。



高通量筛选工具的设计与应用

唐双焱，梁朝宁，蒋培霞

中国科学院微生物研究所，北京 100101

唐双焱，梁朝宁，蒋培霞. 高通量筛选工具的设计与应用. 生物工程学报, 2012, 28(7): 781-788.

Tang SY, Liang CN, Jiang PX. Design and application of high-throughput screening tools: a review. Chin J Biotech, 2012, 28(7): 781-788.

摘 要：定向进化方法作为新兴的高效蛋白质工程手段，其内容包括蛋白质突变体文库的构建和有效突变体的快速筛选。高通量筛选方法是定向进化方法的重要组成部分，是成功获得有效突变体的关键。筛选的突变体数量越多，获得有效突变体的几率越大。以下介绍了目前已经成功应用于或有潜力应用于定向进化改造蛋白质的几种高通量筛选工具。高通量筛选工具的不断设计与开发将推动蛋白质工程领域的技术革新。

关键词：高通量筛选，定向进化，突变体文库

Design and application of high-throughput screening tools: a review

Shuangyan Tang, Chaoning Liang, and Peixia Jiang

Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: As an efficient and promising protein engineering strategy, directed evolution includes the construction of mutant libraries and screening of desirable mutants. A rapid and high-throughput screening method has played a critical

Received: April 23, 2012; **Accepted:** June 15, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21172095).

Corresponding author: Shuangyan Tang. Tel: +86-10-64807437; E-mail: tangsy@im.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 21172095)资助。

role in the successful application of directed evolution strategy. We reviewed several high-throughput screening tools which have great potential to be applied in directed evolution. The development of powerful high-throughput screening tools will make great contributions to the advancement of protein engineering.

Keywords: high-throughput screening, directed evolution, mutant libraries

定向进化是近年发展起来的十分高效的蛋白质改造手段^[1]。定向进化方法的内容包括从一个或者多个亲本酶出发,经过基因突变和重组人工构建蛋白质突变体文库,然后通过合适的筛选方法快速从突变体文库中筛选出符合要求的突变体^[2]。鉴于突变的随机性,定向进化法尤其适用于对仅掌握有限的结构和功能信息的蛋白质进行改造,以获得某方面特性显著提高的突变体。即使在已知结构的蛋白质改造上,以定向进化法改造所得到的结果在很多情况下也是人们根据已有的蛋白质结构功能关系的知识所无法预知的。定向进化法弥补了传统理性设计方法的不足,极大地拓展了蛋白质工程学的研究与应用范围。在定向进化策略中,突变体文库的多样性和高通量筛选方法的建立是成功的关键。突变体文库越大,突变体数量越多,则越有希望筛选到所需要的突变体。对于这些庞大的突变体文库,高通量的筛选是必需的。目前,构建数量庞大的突变体文库的方法已日趋成熟,而最大瓶颈是缺乏高通量的筛选方法。很多蛋白质目前还无法用定向进化方法进行改造就是因为缺乏高通量的筛选方法。本文将对现阶段一些已经应用或有潜力应用于定向进化中的高通量筛选方法进行综述。本文将侧重于介绍小分子化合物的特异性识别和高通量筛选方法,这些方法通常可用于改造合成这些小分子化合物的酶(酶对底物的特异性和专一性使之成为最适合合成精细化学分子、

手性分子等的催化剂),或者结合这些小分子化合物的蛋白质如提高抗原抗体亲和力等。

1 体内筛选方法

体内筛选方法指根据蛋白质功能与细胞表型之间的关联关系来进行筛选。体内筛选方法具有成本低、快捷等优势,但筛选结果也受到诸多因素的影响,如细胞生长情况、蛋白表达量及折叠情况、底物通透性等。

1.1 营养缺陷型菌株筛选法

营养缺陷型菌株是通过诱变处理获得的,在营养上表现缺陷的菌株,即丧失合成某一物质(如氨基酸、维生素、核苷酸等)的能力,因而它们在基本培养基上不能生长,必须补充某些物质才能正常生长。营养缺陷型菌株的筛选一般要经过诱变、抗生素淘汰野生型、缺陷型菌株的检出和鉴定等步骤来获得。由于营养缺陷型菌株只有在添加了特别成分的培养基中才能生长,因此可以用来对合成这种成分的酶或者合成途径进行高通量筛选。营养缺陷型菌株已经成功运用在多个例酶的定向进化筛选中^[3-9]。如 Pfleger 等在对合成甲羟戊酸的操纵子上3个酶的相对表达量进行改造以提升甲羟戊酸产量的研究中,即用到了营养缺陷型筛选方法^[7]。该研究中构建的筛选细胞(大肠杆菌)依赖甲羟戊酸生长,并同时表达荧光蛋白基因,当甲羟戊酸被合成时,细胞方可在基

本培养基上生长,且合成甲羟戊酸的浓度可通过细胞的荧光强度来体现。用该营养缺陷型细胞筛选甲羟戊酸操纵子突变体文库,成功获得了高产突变体。Boersma 等采用天冬氨酸营养缺陷型细胞筛选法改造来自芽胞杆菌的脂肪酶 A^[8]。在基本培养基中加入天冬氨酸(S)-(+)-1,2-O-异亚丙基甘油醚作为底物,当底物被脂肪酶 A 水解产生天冬氨酸时,细胞方能在培养基中生长。通过该方法可筛选到催化活性提高的脂肪酶 A。为了筛选到立体选择性也同步提高的酶突变体,同时在上述培养基中加入了与底物立体结构相反的酶抑制剂磷酸(R)-(-)-1,2-O-异亚丙基甘油醚,并在逐轮的筛选中提高该抑制剂的浓度,最后筛到的酶突变体对(S)-(+)-底物的立体选择性显著提高。Kagamiyama 等在用定向进化方法改造谷草转氨酶以增强其合成支链氨基酸亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸的催化效率中,成功运用支链氨基酸转氨酶的缺陷型细胞作为筛选工具^[9]。谷草转氨酶催化天冬氨酸的氨基转移到 α -酮戊二酸形成草酰乙酸和谷氨酸及其逆反应。支链氨基酸转氨酶则催化支链氨基酸生物合成最后一步反应,在该酶缺乏的情况下,缺陷型细胞不能在不加支链氨基酸的基本培养基上生长。经过筛选,谷草转氨酶合成缬氨酸和异亮氨酸的效率分别提高了 10^5 和 7×10^4 倍,而对其天然底物的催化效率下降 20 倍。

1.2 酵母双杂交或三杂交筛选法

酵母双杂交法利用酵母的转录调控机制来进行筛选^[10-13]。如酵母 GAL4 转录调控蛋白具有两个功能域:DNA 结合功能域和激活功能域。将两个功能域的编码基因分别接上不同的蛋白

质编码序列,一个是已知蛋白质序列,另一个是未知的、将进行筛选的蛋白质序列(突变体文库),构建成融合表达载体。当两个蛋白质能相互作用时,GAL4 的 DNA 结合功能域和激活功能域也相互靠近,重组成有活性的转录激活子,开启受其调控的启动子表达下游的报告基因,因此通过报告基因的表达可筛选出能和已知蛋白相互作用的蛋白质。酵母双杂交体系常被用于抗体抗原相互作用等多种突变体文库的筛选当中^[12-13]。

当两种蛋白质之间的相互作用是由小分子化合物所介导时,酵母双杂交体系被拓展为酵母三杂交体系,该体系可用于筛选蛋白质与小分子化合物之间的相互作用^[14-18]。如 Zhao 研究组在改造人的雌激素受体蛋白的配体结合特异性时采用了酵母三杂交方法进行筛选。雌激素受体蛋白的配体结合结构域(与 GAL4 DNA 结合功能域形成融合蛋白)与小分子化合物结合后会发​​生构象改变,进而与核受体共激活因子(与 GAL4 激活功能域形成融合蛋白)相互作用,从空间上拉近 GAL4 两个功能域进而开启调控的启动子表达报告基因。用该方法筛选获得了分别与药物类似物 4,4'-二羟基二苯基乙二酮^[16]、睾丸酮^[17]或皮质酮^[18]结合能力显著提高的雌激素受体蛋白突变体。

酵母三杂交体系还被进一步用来设计小分子化合物的水解酶活性的高通量筛选方法。如头孢菌素酶可水解头孢菌素,用化学方法将头孢菌素同时与氨甲叶酸和地塞米松相连,氨甲叶酸可与二氢叶酸还原酶(与 DNA 结合蛋白 LexA 融合)结合,地塞米松可与糖皮质激素受体(与

B42 激活功能域融合) 结合, 因此氨甲叶酸-头孢菌素-地塞米松形成化合物桥将 DNA 结合蛋白 LexA 和激活功能域拉近, 激活酵母 GAL1 启动子表达下游报告基因。当头孢菌素酶将头孢菌素水解时, 化合物桥被破坏, 从而关闭了报告基因的表达, 通过该系统可以成功筛选出头孢菌素酶的活性, 亦为筛选其他化合物水解酶或合成酶提供了模式筛选系统^[15]。

1.3 转录调控因子筛选法

调控蛋白是结合特定的 DNA 调控序列, 通过控制基因开启和关闭来调节基因转录的蛋白。调控蛋白通常与特定小分子化合物结合后发生构象变化, 从而改变其与相应 DNA 调控序列的亲和力, 激活或者阻遏该启动子下游基因的转录。当酶催化生成的小分子化合物可以诱导特定调控蛋白使之启动下游报告基因的转录和表达时, 该调控蛋白可以用作该小分子化合物的信号分子, 将该化合物在细胞内的浓度与报告基因的表达强度关联起来。在对这些小分子化合物的合成酶进行定向进化改造时, 这些信号分子将有潜力作为高通量筛选工具, 提高化合物的生物合成效率。

然而, 自然界缺乏能分别对各种不同小分子化合物产生诱导反应的调控蛋白。因此人们通过对调控蛋白进行改造, 使之改变原有的配体结合特异性, 转而受特定的化合物诱导而启动下游报告基因表达, 即定制特定小分子化合物的信号分子^[19-21]。通过改造调控蛋白来定制的不同化合物的信号分子将可以用作高通量筛选工具来筛选这些化合物的生物合成途径突变体以提升其生物合成效率^[22]。目前已有多例调控蛋白配体结合

特异性成功改造的报道, 如受 3-羧基己酰基高丝氨酸内酯所诱导的 LuxR 调控蛋白被改造成为受不同长度碳链的直链酰基高丝氨酸内酯所诱导^[23], 受四环素诱导的调控蛋白 TetR 被改造为受四环素类似物 4-去二甲氨基-6-脱氧-6-去甲基四环素所诱导^[24]。这些研究证明通过改造调控蛋白定制小分子化合物信号分子这种高通量筛选工具是有效可行的。

1.4 Riboswitch 筛选法

细胞中另外一种能将小分子化合物浓度和基因转录后调控关联在一起的分子是 Riboswitch^[25]。Riboswitch 是结合小分子, 参与调控基因表达及细胞代谢的 RNA 分子, 它们广泛分布于细菌中, 在真菌和植物中也存在。Riboswitch 通常位于 mRNA 的 5'非翻译区, 也有位于 3'非翻译区或内含子区域的。其结构包括适配子和表达模块。当 Riboswitch 和小分子化合物结合后, RNA 构象发生变化, 在转录、翻译或者 mRNA 水平上开启或者关闭蛋白质的合成^[25-27]。与改造调控蛋白的思路相似, 人们也试图通过改造使 Riboswitch 与特定的小分子化合物结合而调控基因表达, 从而设计小分子化合物的信号分子。如人们用定向进化改造的方法成功获取了结合 1,3-二甲基黄嘌呤、3-甲基黄嘌呤或硫胺后能高强度激活下游基因表达的 Riboswitch^[28-29]。这些 Riboswitch 可将相应小分子化合物在细胞内的浓度用报告基因的表达强度呈现出来, 因此也是潜在的高通量筛选工具。

1.5 细胞内荧光标记筛选法

荧光标记是首选的高通量筛选标记, 因为它可以用流式细胞分选仪进行筛选。流式细胞分选

仪的分选速度可达 25 000 个细胞/s 以上,这使之成为设计高通量筛选方法的首选。用荧光标记底物、产物或者酶的筛选方法用于定向进化研究也日趋增多。

由于缺乏高通量的筛选方法,糖基转移酶的定向进化改造一直受到限制。在唾液酸转移酶转移活性的定向进化改造中,Aharoni 等首先设计了连有荧光基团的受体底物,该底物能自由出入大肠杆菌细胞,但当细胞中重组唾液酸转移酶将唾液酸基团转移到该受体底物上后,糖基化荧光产物由于其分子大小及电荷原因不能透过细胞膜而滞留在细胞内,因此可以用流式细胞分选法来筛选转移活性提高了的唾液酸转移酶突变体^[30]。

荧光共振能量转移近年来也被用在小分子化合物的检测中^[31-32],该方法既可应用于体内筛选,也可应用于体外筛选。两个荧光基团,一个基团(供体)的发射光谱和另一个基团(受体)的激发光谱有重叠部分,当它们的空间距离缩小($<10\text{ nm}$)时,供体基团激发的能量被受体基团吸收,使得供体的荧光强度减小而受体的荧光强度增强。Fehr 等将大肠杆菌的麦芽糖结合蛋白的 N 端与 C 端分别与橙色荧光蛋白(供体荧光基团)和黄色荧光蛋白(受体荧光基团)融合,当该融合蛋白结合麦芽糖时,构象变化使得两个荧光基团靠近,从而发生荧光能量转移,该融合蛋白被成功用作麦芽糖的信号分子测定麦芽糖的浓度^[33]。人们还根据类似原理设计了分别结合葡萄糖^[34]、核糖^[35]、蔗糖^[36]等的信号分子。这些信号分子均有潜力用于高通量筛选这些小分子糖;且该原理亦有潜力应用于设计不同小分子化

合物的信号分子。

2 体外筛选方法

尽管体内高通量筛选方法应用广泛,它们仍然受到细胞生长压力以及底物跨膜转运等问题的限制。体外高通量筛选方法则可克服这些方面的限制因素,与体内筛选方法相互补充。体外通量比较高的筛选方法是各种展示技术,即运用 DNA 重组技术在噬菌体、细菌、真菌等表面展示外源蛋白(突变体文库),筛选蛋白与蛋白或者蛋白与小分子之间相互作用。

2.1 噬菌体展示技术

噬菌体展示技术比较成熟,首先将多肽或蛋白质的编码基因克隆入噬菌体外壳蛋白结构基因的适当位置,使之与外壳蛋白融合表达,融合蛋白随子代噬菌体的重新组装而展示在噬菌体表面。被展示的蛋白保持天然的折叠结构,可以被靶分子识别并结合,或者催化底物生成产物。该方法的一大应用是筛选抗体突变体文库以获得与抗原结合特异性更高的抗体突变体。首先将抗体突变体文库展示在噬菌体表面上,将抗原固定在酶标板等固相介质上,加入携带了抗体突变体的噬菌体进行结合,然后通过淘洗去除结合特异性差的抗体,最终得到高结合特异性抗体^[37-38]。该方法也被应用在酶的定向进化改造中,如 Love 等用噬菌体展示的筛选方式对大肠杆菌糖基转移酶进行了定向进化改造。将糖基转移酶的供体底物和受体底物分别用同位素和生物素进行标记,反应产物用捕捉生物素的膜将标记的受体捕捉到膜上,洗膜后进行放射性计数,放射性强则代表供体底物已被糖基转移酶有效

地转移到了受体底物上^[39]。

2.2 细胞表面展示技术

细胞表面展示技术是通过将靶蛋白(外源蛋白)基因序列与特定的载体蛋白基因序列融合后导入细胞,从而使靶蛋白表达并定位在细胞表面的技术。常见的载体蛋白有细菌外膜蛋白、胞外附属结构(如鞭毛)蛋白等,常用的宿主细胞有大肠杆菌和酵母细胞等。细胞表面展示技术也常被用来筛选蛋白与蛋白间的相互作用,特别是抗原抗体间相互作用。尽管由于细胞膜脆性等问题,细胞展示没有噬菌体展示方法应用广泛,但其优势是细菌等细胞大小使其可以采用荧光显微镜或者流式细胞分选法来进行筛选。本筛选方法已被成功应用于筛选与抗原高特异性结合的抗体突变体^[40]以及酶催化活性的定向进化改造当中^[41]。

2.3 核糖体展示技术

核糖体展示技术也是一种筛选功能性蛋白间相互作用的新技术,正确折叠的蛋白质及其mRNA同时结合在核糖体上,形成mRNA-核糖体-蛋白质三聚体,该结构使目的蛋白的基因型和表型联系起来,当目的蛋白能与靶分子高特异性结合时,可以快速获得其基因型。该技术虽然尚未得到广泛应用,但也已有一些成功的应用案例^[42-44]。

本文着重介绍了用于小分子化合物特异性识别和高通量筛选的方法。小分子化合物产品遍及食品、医药、化工等诸多领域,其高通量筛选方法的建立对催化合成小分子化合物的酶的改造研究以及小分子化合物的生物合成途径研究都具有重要的意义。同时,高通量筛选方法的研

究也是定向进化方法学研究的重要组成部分,因此设计和开发新的高通量筛选方法兼具理论和应用价值。

REFERENCES

- [1] Jäckel C, Kast P, Hilvert D. Protein design by directed evolution. *Annu Rev Biophys*, 2008, 37: 153-173.
- [2] Arnold FH. Design by directed evolution. *Acc Chem Res*, 1998, 31(3): 125-131.
- [3] Evnin LB, Vasquez JR, Craik CS. Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(17): 6659-6663.
- [4] Henning H, Leggewie C, Pohl M, et al. Identification of novel benzoylformate decarboxylases by growth selection. *Appl Environ Microb*, 2006, 72(12): 7510-7517.
- [5] Woycechowsky KJ, Hilvert D. Deciphering enzymes: genetic selection as a probe of structure and mechanism. *FEBS J*, 2004, 271(9): 1630-1637.
- [6] DeSantis G, Liu J, Clark DP, et al. Structure-based mutagenesis approaches toward expanding the substrate specificity of D-2-deoxyribose-5-phosphate aldolase. *Bioorgan Med Chem*, 2003, 11(1): 43-52.
- [7] Pflieger BF, Pitera DJ, Smolke CD, et al. Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(8): 1027-1032.
- [8] Boersma YL, Droge MJ, van der Sloot AM, et al. A novel genetic selection system for improved enantioselectivity of *Bacillus subtilis* lipase A. *Chembiochem*, 2008, 9(7): 1110-1115.
- [9] Yano T, Oue S, Kagamiyama H. Directed evolution of an aspartate aminotransferase with new substrate specificities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(10): 5511-5515.
- [10] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, 340(6230): 245-246.

- [11] Fields S, Sternglanz R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet*, 1994, 10(8): 286–292.
- [12] Ma L, Koyota S, Myoen Y, et al. Generation of intracellular single-chain antibodies directed against polypeptide GalNAc-transferase using a yeast two-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 418(4): 628–633.
- [13] Roberts GG 3rd, Parrish JR, Mangiola BA, et al. High-throughput yeast two-hybrid screening. *Methods Mol Biol*, 2012, 812: 39–61.
- [14] Licitra EJ, Liu JO. A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(23): 12817–12821.
- [15] Baker K, Blecinski C, Lin H, et al. Chemical complementation: a reaction-independent genetic assay for enzyme catalysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(26): 16537–16542.
- [16] Chockalingam K, Chen Z, Katzenellenbogen JA, et al. Directed evolution of specific receptor-ligand pairs for use in the creation of gene switches. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(16): 5691–5696.
- [17] Chen Z, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, et al. Directed evolution of human estrogen receptor variants with significantly enhanced androgen specificity and affinity. *J Biol Chem*, 2004, 279(32): 33855–33864.
- [18] Chen Z, Zhao H. Rapid creation of a novel protein function by *in vitro* coevolution. *J Mol Biology*, 2005, 348(5): 1273–1282.
- [19] Sayut DJ, Niu Y, Sun L. Construction and engineering of positive feedback loops. *ACS Chem Biol*, 2006, 1(11): 692–696.
- [20] Hakila KM, Nikander PA, Junttila SM, et al. Cd-specific mutants of mercury-sensing regulatory protein MerR, generated by directed evolution. *Appl Environ Microb*, 2011, 77(17): 6215–6224.
- [21] Tang SY, Fazelinia H, Cirino PC. AraC regulatory protein mutants with altered effector specificity. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(15): 5267–5271.
- [22] Tang SY, Cirino PC. Design and application of a mevalonate-responsive regulatory protein. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50(5): 1084–1086.
- [23] Collins CH, Leadbetter JR, Arnold FH. Dual selection enhances the signaling specificity of a variant of the quorum-sensing transcriptional activator LuxR. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(6): 708–712.
- [24] Scholz O, Kostner M, Reich M, et al. Teaching TetR to recognize a new inducer. *J Mol Biol*, 2003, 329(2): 217–227.
- [25] Winkler W, Nahvi A, Breaker RR. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*, 2002, 419(6910): 952–956.
- [26] Mironov AS, Gusarov I, Rafikov R, et al. Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell*, 2002, 111(5): 747–756.
- [27] Werstuck G, Green MR. Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science*, 2009, 325(5877): 296–298.
- [28] Soukup GA, Emilsson GA, Breaker RR. Altering molecular recognition of RNA aptamers by allosteric selection. *J Mol Biol*, 2000, 298(4): 623–632.
- [29] Muranaka N, Sharma V, Nomura Y, et al. An efficient platform for genetic selection and screening of gene switches in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(5): e39.
- [30] Aharoni A, Thieme K, Chiu CP, et al. High-throughput screening methodology for the directed evolution of glycosyltransferases. *Nat Methods*, 2006, 3(8): 609–614.
- [31] Peng J, Gong L, Si K, et al. Fluorescence resonance energy transfer assay for high-throughput screening of ADAMTS1 inhibitors. *Molecules*, 2011, 16(12): 10709–10721.
- [32] Zhu X, Fu A, Luo KQ. A high-throughput fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based endothelial cell apoptosis assay and its application for screening vascular disrupting

- agents. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 418(4): 641–646.
- [33] Fehr M, Frommer WB, Lalonde S. Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(15): 9846–9851.
- [34] Fehr M., Lalonde S, Lager I, et al. In vivo imaging of the dynamics of glucose uptake in the cytosol of COS-7 cells by fluorescent nanosensors. *J Biol Chem*, 2003, 278(21): 19127–19133.
- [35] Lager I, Fehr M, Frommer WB, et al. Development of a fluorescent nanosensor for ribose. *FEBS Lett*, 2003, 553(1/2): 85–89.
- [36] Lager I, Looger LL, Hilpert M, et al. Conversion of a putative *Agrobacterium* sugar-binding protein into a FRET sensor with high selectivity for sucrose. *J Biol Chem*, 2006, 281(41): 30875–30883.
- [37] Gao J, Sidhu SS, Wells JA. Two-state selection of conformation-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(9): 3071–3076.
- [38] Sidhu SS, Lowman HB, Cunningham BC, et al. Phage display for selection of novel binding peptides. *Method Enzymol*, 2000, 328: 333–363.
- [39] Love KR, Swoboda JG, Noren CJ, et al. Enabling glycosyltransferase evolution: a facile substrate-attachment strategy for phage-display enzyme evolution. *Chembiochem*, 2006, 7(5): 753–756.
- [40] Harvey BR, Georgiou G, Hayhurst A, et al. Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from *Escherichia coli*-expressed libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(25): 9193–9198.
- [41] Becker S, Schmoldt HU, Adams TM, et al. Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts. *Curr Opin Biotech*, 2004, 15(4): 323–329.
- [42] Hanes J, Jermutus L, Pluckthun A. Selecting and evolving functional proteins *in vitro* by ribosome display. *Method Enzymol*, 2000, 328: 404–430.
- [43] Chodorge M, Fourage L, Ravot G, et al. In vitro DNA recombination by L-Shuffling during ribosome display affinity maturation of an anti-Fas antibody increases the population of improved variants. *Protein Eng Des Sel*, 2008, 21(5): 343–351.
- [44] Takahashi F, Funabashi H, Mie M, Endo Y, et al. Activity-based in vitro selection of T4 DNA ligase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336(3): 987–993.