



iCourse 教材  
生物技术与生物工程系列



# 蛋白质工程

.....  
Protein Engineering

主编 吴 敬

高等教育出版社



iCourse · 教材  
生物技术与生物工程系列

# 蛋白质工程

Protein Engineering

主 编 吴 敬

编 者 (按姓氏拼音排序)

方中明 (武汉生物工程学院)

李宪臻 (大连工业大学)

刘同军 (齐鲁工业大学)

刘祥瑞 (浙江大学)

吴 敬 (江南大学)

郑 珩 (中国药科大学)

周卫红 (南开大学)

周哲敏 (江南大学)

朱咏华 (湖南大学)

高等教育出版社·北京

## 内容提要

本书强调蛋白质工程基础理论、研究方法与实际应用相结合,同时涵盖了本领域的最新研究成果和实例。主要介绍蛋白质的结构与功能、结构分析与预测、重组表达、化学修饰、分子改造、全新设计及应用,力求使学生加深对蛋白质工程课程知识的理解和掌握,并提高理论知识的应用能力,为学生今后熟练掌握蛋白质工程技术、从事科学研究及实际工作奠定坚实的基础。

配套数字课程(<http://abook.hep.com.cn/47484>)涵盖与纸质教材密切配合的知识拓展、补充范例、深入学习、关联实例等内容,是纸质教材内容的拓展和补充。

本书紧扣课程教学实际,密切联系工程应用,注重学生应用能力培养,适合作为高等学校生物工程、生物技术、生物制药和相关专业的本科生教材,也可供发酵工程、生物化工专业硕士研究生参考。

## 图书在版编目(CIP)数据

蛋白质工程 / 吴敬主编. -- 北京: 高等教育出版社, 2017.3

iCourse·教材: 生物技术与生物工程系列

ISBN 978-7-04-047484-8

I. ①蛋… II. ①吴… III. ①蛋白质工程-高等学校-教材 IV. ①TQ93

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第050859号

Danbaizhi Gongcheng

项目策划 吴雪梅 王 莉 单冉东

策划编辑 高新景

责任编辑 高新景

封面设计 李小璐

责任印制 田 甜

出版发行 高等教育出版社  
社 址 北京市西城区德外大街4号  
邮政编码 100120  
印 刷 北京人卫印刷厂  
开 本 889mm×1194mm 1/16  
印 张 11.25  
字 数 320千字  
购书热线 010-58581118  
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>  
<http://www.hep.com.cn>  
网上订购 <http://www.hepmall.com.cn>  
<http://www.hepmall.com>  
<http://www.hepmall.cn>  
版 次 2017年3月第1版  
印 次 2017年3月第1次印刷  
定 价 26.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换  
版权所有 侵权必究  
物料号 47484-00

iCourse · 数字课程 (基础版)

# 蛋白质工程

主编 吴敬

## 登录方法:

1. 电脑访问 <http://abook.hep.com.cn/47484>, 或手机扫描下方二维码、下载并安装 Abook 应用。
2. 注册并登录, 进入“我的课程”。
3. 输入封底数字课程账号 (20 位密码, 刮开涂层可见), 或通过 Abook 应用扫描封底数字课程账号二维码, 完成课程绑定。
4. 点击“进入学习”, 开始本数字课程的学习。

课程绑定后一年为数字课程使用有效期。如有使用问题, 请发邮件至:

[lifescience@pub.hep.cn](mailto:lifescience@pub.hep.cn)

iCourse · 教材  
生物技术与生物工程系列

## 蛋白质工程

主编 吴敬

用户名  密码  验证码  4582 进入课程

注册

内容介绍

纸质教材

版权信息

联系方式

蛋白质工程数字课程与纸质教材一体化设计, 紧密配合。立足全面展现课程知识体系并反映学科快速发展的趋势和成果, 数字课程涵盖了知识拓展、补充范例、深入学习、关联实例、教学课件、本章小结、名词解释、自测题和参考文献等多种资源, 充分运用多种形式的媒体资源, 丰富知识的呈现形式, 更加贴合课程教学的实际需要。在提升课程教学效果的同时, 为学生学习提供了更多思考和探索的空间。

高等教育出版社

<http://abook.hep.com.cn/47484>

扫描二维码, 下载 Abook 应用



## 出版说明

“十二五”期间是高等教育继续深化改革、走以提高质量为核心的内涵式发展道路的关键时期。课程建设是教育教学改革的重要内容，课程建设水平对教学质量和人才培养质量具有重要影响。2011年10月12日教育部发布了《教育部关于国家精品开放课程建设的实施意见》(教高〔2011〕8号)，开启了信息技术和网络技术条件下校、省、国家三级精品开放课程建设的序幕。作为国家精品开放课程展示、运行和管理平台的“爱课程(iCourse)”网站也逐渐为高校师生和社会公众认知和使用。截至目前，已有2600多门资源共享课和800多门视频公开课在“爱课程(iCourse)”网站上线。

高等教育出版社承担着“‘十二五’本科教学工程”中国国家精品开放课程建设的组织实施和平台建设运营的重要任务，在与广大高校的调研和协作中，我们了解到当前高校的教与学发生了深刻变化，也真切感受到课程和教材建设所面临的挑战和机遇。如何建设支撑学生自主学习和校际共建共享的课程和新形态教材成为现实课题，在教育部高等学校生物技术、生物工程类专业教学指导委员会的指导下，结合我社2009年以来在数字课程建设上的探索和实践，我们提出了“高等学校生物技术与生物工程专业精品资源共享课及系列教材”建设项目，项目建设得到了众多高校的积极响应和广泛参与。2013年5月以来，分别在上海、天津、沈阳、杭州、武汉、无锡、银川等地陆续召开了项目启动会议、主编会议和编写会议。2015年，项目成果“iCourse·教材：生物技术与生物工程系列”陆续出版。

本系列教材涵盖生物技术、生物工程专业15门基础课程和专业课程，在出版形式、编写理念、内容选取等方面体现以下特点：

1. 采用“纸质教材+数字课程”的出版形式。纸质教材与丰富的数字教学资源一体化设计，纸质教材内容精炼适当，并以新颖的版式设计和内容编排，方便学生学习和使用；数字课程对纸质教材内容起到巩固、补充和拓展作用，形成以纸质教材为核心，数字教学资源配合的综合知识体系。
2. 创新教学理念，引导自主学习。通过适当的教学设计，鼓励学生拓展知识面和针对某些重要问题进行深入探讨，增强其独立获取知识的意识和能力，为学生自主学习和教师创新教学方法提供支撑。
3. 强调基础与技术、工程应用之间的紧密联系，注重学生应用能力培养。在讲述理论的同时，通过数字课程对学科前沿进展和工程应用案例进行延伸，在概念引入和知识点讲授上也尽量从实际问题出发，这不仅有利于提高学生的学习兴趣，也有助于加强他们的创新意识和创新能力。
4. 教材建设与资源共享课建设紧密结合。本系列教材是对各校精品资源共享课和教学改革成果的集成和升华，参与院校共建共享课程资源，更可支持各级精品资源共享课的持续建设。

本系列教材以服务于生物技术、生物工程专业课程教学为核心,汇集了各高校学科专家与一线教师的智慧、经验和积累,实现了内容与形式、教学理念与教学设计、教学基本要求与个性化教学需求,以及资源共享课与教材建设的一体化设计,以期对我国生物技术与生物工程专业教学改革和人才培养产生积极影响。

建设切实满足高等教育教学需求、反映教改成果和学科发展、纸质出版与资源共享课紧密结合的新形态教材和优质教学资源,实现“校际联合共建,课程协同共享”是我们的宗旨和目标。将课程建设及教材出版紧密结合,采用“纸质教材+数字课程”的出版形式,是一种行之有效的方法和创新,得到了高校师生的高度认可。尽管我们在出版本系列教材的工作中力求尽善尽美,但难免存在不足和遗憾,恳请广大专家、教师和学生提出宝贵意见与建议。

高等教育出版社

2015年6月

# 前 言

蛋白质是由氨基酸以“脱水缩合”方式组成的多肽链经过盘曲折叠形成的、具有一定空间结构的物质，是一切生命活动存在的物质基础，也是日常生活中普遍存在的营养物质、生产原料、医药试剂，在食品、日化、饲料工业中具有广泛的应用。

蛋白质工程是通过基因重组技术改变或设计合成具有特定功能的蛋白质，其意义在于以蛋白质分子的结构规律及其生物功能的关系作为基础，通过化学、物理和分子生物学等手段进行基因修饰或基因合成，对现有蛋白质进行改造，或制造一种新的蛋白质，以满足人类生产和生活的需求。天然蛋白质都是经过漫长的进化过程自然选择而来的，通过蛋白质工程对天然蛋白质进行相应的设计和改造，相当于在实验室里加快了进化过程，从而更快、更有效地为人类的需求服务。

“蛋白质工程”作为高等学校生物技术和生物工程专业的重要专业课程，旨在使学生系统学习蛋白质工程学的基础理论及研究方法，深入了解其广阔的应用前景及其对生命科学前沿的推动作用。本教材是在精品开放课程项目建设的基础上进行编写的，属于教育部高等学校生物技术、生物工程类专业教学指导委员会和高等教育出版社共同策划出版的“iCourse·教材：生物技术与生物工程系列”。教材属于新形态教材，在出版形式、编写理念、内容选取和体系编排上都积极响应学科发展和教育发展的新要求，以纸质教材配合丰富的多媒体素材，提升课程教学效果，利于学生进行混合式和自主性学习。教材的编写紧扣课程教学实际，密切联系工程应用，注重学生应用能力培养。本教材条理清晰，通过大量原创插图使学生能够直观地获取课程知识，并引导学生从基因工程的整体思考科学问题，有利于培养学生的创新意识和创新能力，可作为生物工程、生物技术、生物制药和相关专业蛋白质工程课程的本科生教材，同时适合于作为发酵工程、生物化工专业硕士研究生的教材，也可供从事生物技术工作的人员参考。

本教材力求使学生通过对课程的学习加深对理论知识的理解和掌握，提高学习兴趣，拓展知识面，开阔思路，并提高理论知识的应用能力，为学生今后熟练掌握蛋白质工程技术、从事科学研究及实际工作奠定坚实的基础。

本教材共分8章，主要介绍了蛋白质的结构与功能、结构分析与预测、重组表达、化学修饰、分子改造、全新设计及应用。教材的编写集合了江南大学吴敬教授、周哲敏教授，大连工业大学李宪臻教授，湖南大学朱咏华教授，南开大学周卫红研究员，浙江大学刘祥瑞副教授，中国药科大学郑珩副

教授，齐鲁工业大学刘同军副教授和武汉生物工程学院方中明副教授等在一線從事蛋白質工程方面科研工作的精英人員。

由於時間所限，書中疏漏、錯誤和不妥之處在所難免，希望讀者、同行批評、指正。

吳 毅

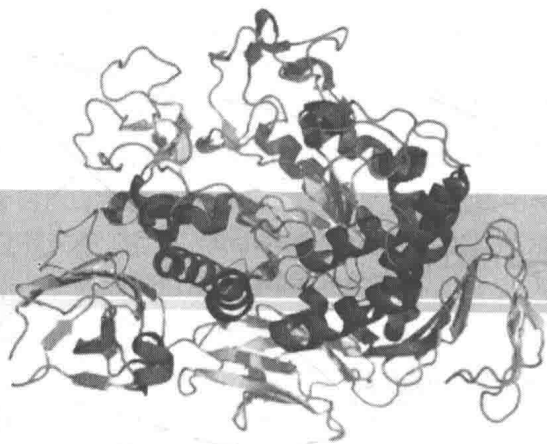
2016年秋於無錫



# 目 录

1 绪论 .....	1	2.3.1 蛋白质一级结构与功能的关系 ...	21
1.1 蛋白质工程概论 .....	2	2.3.2 蛋白质空间结构与功能的关系 ...	21
1.1.1 蛋白质工程含义 .....	2	2.4 蛋白质的折叠 .....	22
1.1.2 蛋白质工程的发展历史与研究 进展 .....	3	2.4.1 蛋白质折叠的驱动力 .....	22
1.1.3 蛋白质工程与其他学科的关系 .....	4	2.4.2 蛋白质的正确折叠 .....	23
1.2 蛋白质工程的研究内容与技术 .....	5	2.4.3 蛋白质内稳态的调控 .....	24
1.2.1 蛋白质表达与分离纯化 .....	5	2.4.4 蛋白质错误折叠与疾病 .....	24
1.2.2 蛋白质多肽的研究 .....	5	3 蛋白质结构分析与预测 .....	27
1.2.3 蛋白质改性的研究 .....	6	3.1 蛋白质结构解析技术 .....	28
1.2.4 蛋白质固定化的研究 .....	6	3.1.1 蛋白质氨基酸测序技术 .....	28
1.2.5 蛋白质结构分析、功能设计与 预测 .....	7	3.1.2 X射线晶体结构分析技术 .....	31
1.2.6 蛋白质设计与合成 .....	8	3.1.3 核磁共振结构解析技术 .....	35
1.3 蛋白质工程的应用领域 .....	9	3.1.4 三维电镜重构技术 .....	39
1.3.1 医药工业领域 .....	9	3.2 蛋白质结构预测 .....	40
1.3.2 食品工业领域 .....	11	3.2.1 蛋白质常用数据库 .....	40
1.3.3 轻工业领域 .....	11	3.2.2 蛋白质的序列分析 .....	42
2 蛋白质的结构与功能 .....	13	3.2.3 蛋白质二级结构预测 .....	44
2.1 蛋白质氨基酸与多肽链 .....	14	3.2.4 蛋白质三级结构预测 .....	46
2.1.1 常见蛋白质氨基酸的结构特征 ...	14	4 蛋白质的重组表达 .....	49
2.1.2 蛋白质氨基酸的分类 .....	15	4.1 蛋白质重组表达的一般流程 .....	50
2.1.3 肽和多肽链 .....	16	4.1.1 目的基因的获得 .....	50
2.2 蛋白质的结构 .....	17	4.1.2 目的基因与载体的连接 .....	52
2.2.1 蛋白质的一级结构和空间结构 ...	17	4.1.3 重组载体导入细胞 .....	55
2.2.2 维持蛋白质空间构象的作用力 ...	20	4.1.4 克隆子的筛选与鉴定 .....	58
2.3 蛋白质结构与功能的关系 .....	21	4.2 微生物表达系统 .....	63
		4.2.1 原核生物表达系统 .....	63
		4.2.2 酵母表达系统 .....	68

4.2.3 丝状真菌表达系统 .....	72	6.2 蛋白质分子改造设计 .....	133
4.3 其他表达系统 .....	75	6.2.1 蛋白质结构预测 .....	133
4.3.1 昆虫细胞表达系统 .....	75	6.2.2 蛋白质分子理性设计策略 .....	135
4.3.2 哺乳动物细胞表达系统 .....	79	6.2.3 蛋白质设计实例 .....	141
4.3.3 植物表达系统 .....	80	<b>7 蛋白质分子全新设计 .....</b>	<b>144</b>
<b>5 蛋白质的化学修饰 .....</b>	<b>85</b>	7.1 蛋白质分子设计原理 .....	145
5.1 功能基团的添加 .....	87	7.1.1 蛋白质分子设计概述 .....	145
5.1.1 体内酶作用下的添加 .....	87	7.1.2 分类和原则 .....	146
5.1.2 体内非酶作用下的添加 .....	91	7.1.3 蛋白质分子设计的程序 .....	147
5.1.3 体外非酶作用下的添加 .....	91	7.2 全新设计 .....	148
5.2 其他蛋白质或多肽修饰 .....	92	7.2.1 全新蛋白质的设计方案 .....	148
5.3 氨基酸的化学修饰 .....	93	7.2.2 结构的从头设计 .....	150
5.4 蛋白质侧链基团的修饰 .....	94	7.2.3 功能的从头设计 .....	153
5.4.1 氧化还原反应 .....	94	<b>8 蛋白质工程的应用 .....</b>	<b>157</b>
5.4.2 芳香环取代反应 .....	94	8.1 蛋白质工程在医药工业中的应用 .....	158
5.5 蛋白质修饰的反应部位 .....	94	8.1.1 蛋白质工程在抗体生产中的	
5.5.1 巯基的化学修饰 .....	94	应用 .....	158
5.5.2 氨基的化学修饰 .....	95	8.1.2 蛋白质工程在病毒疫苗中的	
5.5.3 羧基的化学修饰 .....	96	应用 .....	159
5.5.4 蛋白质位点专一性修饰 .....	96	8.1.3 蛋白质工程在药用蛋白质中的	
5.6 蛋白质结构改变 .....	99	应用 .....	160
5.7 实例 .....	99	8.2 蛋白质工程在食品工业中的应用 .....	161
5.7.1 胰岛素生产中二硫键的切割与		8.2.1 蛋白质工程在食品原料品质	
形成 .....	99	改良中的应用 .....	161
5.7.2 肽链切割是蛋白质特异性的		8.2.2 蛋白质工程在食品生产工艺	
关键所在 .....	100	改进中的应用 .....	162
5.7.3 蛋白质侧链基团的化学修饰 .....	100	8.2.3 蛋白质工程在食品添加剂生产	
5.8 蛋白质的化学交联 .....	100	中的应用 .....	162
5.8.1 蛋白质的交联方法及交联剂 .....	100	8.2.4 农作物品质改良与转基因食品 .....	163
5.8.2 蛋白质的固定化 .....	101	8.3 蛋白质工程在轻工业中的应用 .....	163
5.9 蛋白质化学修饰的应用 .....	101	8.3.1 蛋白质工程在酿造与发酵中的	
5.10 蛋白质化学修饰的局限性 .....	103	应用 .....	163
<b>6 蛋白质的分子改造 .....</b>	<b>105</b>	8.3.2 蛋白质工程在纺织与日化中的	
6.1 蛋白质分子改造技术 .....	106	应用 .....	165
6.1.1 基因突变技术 .....	106	8.3.3 蛋白质工程在环保与监测中的	
6.1.2 定向进化技术 .....	111	应用 .....	166
6.1.3 基因融合技术 .....	128		



# 绪 论

## ● 1.1 蛋白质工程概论

蛋白质工程含义；蛋白质工程的发展历史与研究进展；蛋白质工程与其他学科的关系

## ● 1.2 蛋白质工程的研究内容与 技术

蛋白质表达与分离纯化；蛋白质多肽的研究；蛋白质改性的研究；蛋白质固定化的研究；蛋白质结构分析、功能设计与预测；蛋白质设计与合成

## ● 1.3 蛋白质工程的应用领域

医药工业领域；食品工业领域；轻工业领域

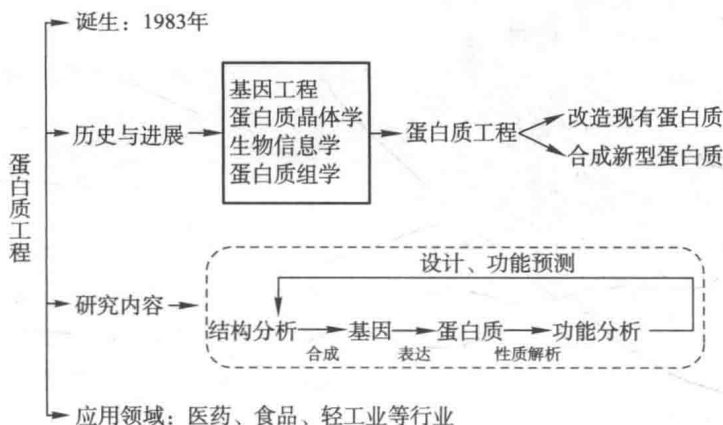
蛋白质工程广义上指研究蛋白质优质生产和高效利用的方法学，是通过物理、化学、生物和基因重组等技术改造蛋白质或设计合成全新的蛋白质，是基因工程的延伸和发展；狭义的蛋白质工程就是在对蛋白质结构与功能关系了解的基础之上，借助计算机辅助设计，利用基因定点诱变等技术，特异性地对蛋白质结构基因进行改造，从而获得具有特定生物功能的蛋白质，并研究这些蛋白质的结构和功能之间的关系。

蛋白质工程的研究大致分为两方面：一方面是根据需要合成具有特定氨基酸序列和空间结构的蛋白质分子；另一方面是研究蛋白质的化学组成、空间结构与生物功能之间的关系。

通过本章学习，可以掌握以下知识：

1. 蛋白质工程的定义
2. 蛋白质工程历史与发展
3. 蛋白质工程研究的内容

## 知识导图



## 关键词

蛋白质 蛋白质工程 研究内容 应用

## 1.1 蛋白质工程概论

蛋白质是生物体中广泛存在的一类生物大分子，具有特定的立体结构和活性，是生命的基础物质之一，也是生命活动的直接执行者，参与了生命的所有过程，如遗传、发育、繁殖、物质和能量代谢、应激、思维和记忆等。人类所有器官组织，外到皮肤，内至心脏，都是以蛋白质为主要构成部分的。在生活中，蛋白质也随处可见，可以是营养物质、致病原、生产原料或者医药试剂，可以存在于食品、化妆品和饲料中。美国生物学家约翰·埃迪塞尔（John Edissel）教授的一句话，“蛋白质是具有独特而奇妙性质的实体”，生动形象地描述了蛋白质的性质与特征。

20世纪70年代初期，DNA重组技术的诞生，实现了基因在分子水平上的操作，使人们能够从基因水平来改造氨基酸序列，为蛋白质工程的诞生奠定了基础。进入80年代，结构生物学研究技术迅速发展，使蛋白质的空间立体结构与其生物学功能之间的关系得到更精确的揭示，为设计以及改造蛋白质提供了技术支持。结合近10年来基因拼接技术、结构生物学手段以及迅速发展的生物信息学方法，促成了蛋白质工程的诞生。

1983年，Kevin M. Ulmer博士在*Science*上发表了“Protein Engineering”专论，首次提出“蛋白质工程”这一概念，讨论了大分子晶体结构、化学修饰以及计算机建模等技术在蛋白质分子改造与设计中的运用。蛋白质工程是在生物化学、分子遗传学、分子生物学等学科的基础上，融合了蛋白质晶体学、蛋白质动力学、基因工程技术、生物信息学以及计算机辅助技术等手段，通过基因修饰或基因合成而改造蛋白质或构建新型蛋白质的新兴生物技术，是基因工程的深化和发展，因此，也被称为“第二代基因工程”。

### 1.1.1 蛋白质工程含义

蛋白质工程的含义有广义与狭义之分。广义上，蛋白质工程是指研究蛋白质优质生产和高效利用

的方法学,是通过物理、化学、生物和基因重组等技术改造蛋白质或设计合成全新的蛋白质,是基因工程的延伸和发展;狭义上,蛋白质工程是在了解蛋白质结构与功能关系的基础上,借助计算机辅助设计,利用基因定点诱变等技术,特异性地对蛋白质结构基因进行改造,从而获得具有特定生物功能的蛋白质,并研究这些蛋白质结构和功能之间的关系。

蛋白质工程的基本原理,是在了解蛋白质结构和功能的前提下,根据需要设计预期的蛋白质结构,推测应有的氨基酸序列,找到相对应的 DNA 序列并改造基因(或者修饰基因、合成基因),从而构建具有预期功能的蛋白质分子。

蛋白质工程的研究大致分为 2 方面:一是根据需要合成具有特定氨基酸序列和空间结构的蛋白质分子;二是研究蛋白质的化学组成、空间结构与生物功能之间的关系。综合上述 2 方面的研究,实现从氨基酸序列预测蛋白质的空间结构和生物功能,设计合成具有特定生物功能的全新蛋白质,并最终根据需要改造天然蛋白质、或者创造自然界不存在的全新蛋白质,从而满足人类社会的需求。

### 1.1.2 蛋白质工程的发展历史与研究进展

天然的蛋白质是在长期进化过程中形成的,其结构、性能在很多情况下不能完全满足人类生产和生活的需要,因而需要对现有的蛋白质进行改造,甚至创造出在自然界不存在的蛋白质。蛋白质工程便是基于这样的需求而产生的。

#### (1) 从多肽开始

从本质上说,蛋白质是由氨基酸构成的有活性的多肽,而蛋白质工程就是对多肽的研究。人类第一次发现多肽类物质是在 1902 年,伦敦医学院的两位生理学家 William M. Bayliss 和 Ernest H. Starling 发现了胰泌素,其是由 27 个氨基酸残基组成、含 11 种不同氨基酸的一种碱性多肽。1926 年,美国生物化学家 James B. Sumner 从刀豆中分离提纯出脲酶(urease),得到了结晶酶,首次直接证明酶的本质就是蛋白质。1931 年,我国生物化学家吴宪首次提出了完备的蛋白质变性学说理论,其基本论点沿用至今。1953 年,英国生物化学家 Frederick Sanger 测定了由 51 个氨基酸组成的牛胰岛素两条多肽链的全部序列,这也是人类第一次成功解析多肽链中氨基酸残基的特定序列与蛋白质分子的空间结构的关系。1963 年,美国生物化学家 Bruce R. Merrifield 提出了固相多肽合成方法(SPPS),并因此荣获 1984 年诺贝尔化学奖。1965 年,我国科学家成功地合成了含有 51 个氨基酸的结晶牛胰岛素,这是世界上首次实现人工合成具有天然生物活力的蛋白质。1986 年的诺贝尔生理学或医学奖,颁给了发现多肽生长因子(NGF)的美国生物化学家 Stanley Cohen 与发现神经生长因子(EGF)的意大利女科学家 Rita Levi-Montalcini,表彰他们为基础科学研究开辟了一个重要的新领域。2004 年的诺贝尔化学奖,授予了 3 位科学家——以色列科学家 Aaron Ciechanover 和 Avram Hershko、美国科学家 Irwin Rose,他们的成果是发现了泛素调节的蛋白质降解的重要机制。

蛋白质是构成包括人类在内的一切生物的基础,近几十年来生物学家在对蛋白质及其相关研究上取得了很大进展,科学家们在这个领域的研究成果也已经惠及人们的生活。

#### (2) 在基因水平操作

当前,蛋白质工程发展如此之快,就是因为蛋白质分子经过预测与设计之后,可以应用高效的基因工程手段来进行蛋白质的合成与表达。

最早的蛋白质工程是 1982 年发表在 *Nature* 上的一篇文章,英国科学家 Greg Winter 等通过基因重组技术获得改性酪氨酰 tRNA 合成酶。他们根据 X 射线衍射测定酶与底物结合部位结构,用定位突变(site-directed mutagenesis)技术改变与底物结合位点的氨基酸残基,并用动力学方法测定变异酶的活性,深入讨论了酶与底物的作用机制。1983 年,美国科学家 Kevin M. Ulmer 在 *Science* 上首次提出了蛋白质工程这一概念。1984 年,美国科学家 Jeanne L. Perry 将溶菌酶中氨基酸 Ile3 突变成 Cys3,从而生成二硫键,使酶热稳定性提高,显著改进了该酶在食品工业中的应用价值。1985 年,美国科学

家 James A. Wells 提出了盒式突变 (cassette mutagenesis) 技术, 在一个位点上可以一次产生 20 种不同氨基酸的突变体, 可以对蛋白质分子中氨基酸进行“饱和性”变异研究。1987 年, 英国科学家 Alan R. Forsht 通过将枯草杆菌蛋白酶分子表面的氨基酸 Asp99 和 Glu156 突变成 Lys, 从而导致了活性中心 His64 质子  $pK_a$  从 7 下降到 6, 使得该酶在  $pH=6$  时的活力提高了 10 倍。当前, 蛋白质工程修饰、改造的蛋白质为数不多, 但进展较快。

上述各例是通过对关键氨基酸残基的突变或者增删的蛋白质工程, 另一类蛋白质工程是“从头设计”。1988 年, 杜邦公司宣布, 成功设计并合成了 73 个氨基残基组成的 4 段反平行  $\alpha$  螺旋。这显示, 按人们预期要求, 通过从头设计并合成新蛋白质的目标得以实现。华盛顿大学贝克实验室 (Baker Laboratory) 开发并维护着一个网络计算平台 (BOINC), 主要用于蛋白质结构预测、蛋白质-蛋白质对接、蛋白质设计和比较建模的研究。其中的 Rosetta 项目已经形成多个分支, 有不同的发展和服务方向。Rosetta Design 是蛋白质设计工具, Rosetta Dock 是蛋白质-蛋白质对接预测工具, 还有一款在线蛋白质结构预测游戏——Foldit。

很多国家政府、公司及科研机构, 制订的生产目标都与蛋白质工程相关, 如特异性疫苗、免疫球蛋白、精确的治疗药物、诊断用药和生物感受器等。1987 年, 美国批准了第一个基因工程药物——胰岛素, 开辟了制药工业的新时代。1986 年, 日本通产省投资 300 亿日元应用到蛋白质工程研究领域。1990 年美国正式启动“人类基因组计划”, 2000 年, 美、英、日、法、德、中 6 个参与国家联合宣布人类基因组“工作框架图”完成, 这也带来并已出现了蛋白质工程高速发展的新阶段。美国 Cetus 公司也准备将其预算的 15%~20% 投放到蛋白质工程上。

### 1.1.3 蛋白质工程与其他学科的关系

蛋白质工程是在对蛋白质结构和功能关系认识的基础上, 按人类需要通过基因工程途径定向地改造和创造蛋白质的理论及实践, 是一门应用多学科知识和技术的综合性学科。

#### (1) 生物化学与蛋白质晶体学

蛋白质分子的生化性质、功能与空间结构的关系, 以及蛋白质的生物学功能机制, 是改造蛋白质的理论基础。可以说蛋白质工程是蛋白质化学和结构分子生物学研究走向应用的产物。

#### (2) 基因工程

蛋白质工程与基因工程 (genetic engineering) 是密不可分的。基因工程是通过基因操作将目的基因转入适当的生物体内, 并进行表达。基因工程生产的是自然界已存在的蛋白质, 其结构与功能符合某种物种生存的需要, 但是不一定完全符合人类生产和生活的需要。而蛋白质工程是根据蛋白质的结构与功能之间的关系, 利用基因工程技术, 按照人类需要, 定向地改造天然的蛋白质, 或者创造新的、自然界中不存在的蛋白质。蛋白质工程的产品不是天然的蛋白质, 而是具有优良性能的、符合人类需要的蛋白质分子。基因定点突变技术就是通过改变特定位点碱基来实现蛋白质局部构象的改变, 从而获得具有特定功能的蛋白质。天然蛋白质都是经过漫长的进化过程而形成的, 而蛋白质工程是对天然蛋白质的改造, 就好像是在实验室里加快了进化过程。设计合成具有特定生物功能的新型蛋白质, 是利用基因工程技术将改进蛋白质的技术提升到了理想的境界。

蛋白质工程是基因研究与蛋白质研究相结合的产物, 既是以基因工程为基础手段, 又是基因工程的深入和延伸。与基因工程相比, 蛋白质工程减少了盲目性, 增加了科学性, 加强了工程性, 因此也被人们称为“第二代基因工程”。

#### (3) 酶工程

酶是一类重要的蛋白质, 具有生物催化作用。蛋白质工程包含酶工程 (enzyme engineering), 酶工程是蛋白质工程中非常有应用前景的一个分支。酶工程是指利用酶、细胞或细胞器等所具有的特异催化功能, 借助生物反应装置并通过一定的工艺手段生产出人类所需产品的应用技术, 是酶学理论与化

工技术相结合而形成的一种新技术，是酶的生产与应用的技术过程。酶工程可以分为两个部分：一是如何生产酶；二是如何应用酶。

蛋白质工程可以对酶的催化活性、底物专一性、抗氧化性、热变性、酸碱性等加以改变。蛋白质工程技术可以提高酶的热稳定性，改变酶对底物的亲和力，提高反应的催化效率，增强酶的转移性，改变酶的别构调节部位，改变酶的底物专一性，减少反馈抑制，提高产物的产率，简化催化过程等。

#### (4) 生物医学工程

生物医学工程 (biomedical engineering) 是一门由理、工、医相结合的高技术学科，是一门高度综合的交叉学科，是多种工程学科作用于医学研究的应用产物。生物医学工程是运用现代自然科学和工程技术的原理和方法，从工程学的角度在多层次上研究人体的结构、功能，揭示其生命现象以及相互关系。将蛋白质作为生物材料应用于生物医学工程，可为防病、治病提供新的技术手段。蛋白质与配体的相互作用机制，是药物设计的基础，可为新药研发提供必要的理论依据。

#### (5) 计算机技术

计算机技术对于蛋白质工程的建立具有决定性作用。蛋白质空间结构分析是一项复杂繁重的工作，涉及大量的数据处理，单靠人脑和手工是难以完成的，而计算机恰恰善于处理这些工作，可实现将数据转变成图形和影像进行结构预测与分子设计。因此蛋白质工程的创立和发展，很大程度上取决于计算机技术的应用和发展。

## 1.2 蛋白质工程的研究内容与技术

蛋白质工程汇集了当代分子生物学等学科前沿领域的最新成就，其将核酸与蛋白质、蛋白质空间结构与生物功能结合起来研究。蛋白质工程研究内容主要有两方面：一方面是确定蛋白质化学组成、空间结构与生物功能之间的关系；另一方面是设计合成满足需求的蛋白质分子。

### 1.2.1 蛋白质表达与分离纯化

蛋白质分离纯化技术是从混合物中分离纯化出所需要的目的蛋白质的方法，是蛋白质工程研究的基础。研究蛋白质的结构和功能，首先需要获得目的蛋白；通过分子设计获得自然界中存在或者不存在的蛋白质，也必须通过分离纯化后才能应用于生活。无论是从宿主菌中提取重组蛋白，还是从动物、植物、微生物中分离目的蛋白，都是要从多种蛋白质、核酸、多糖等混合物中提取少量的高纯度的目的蛋白。

分离与纯化方法有很多种，常用技术有各种沉淀技术、各种电泳技术、透析技术、层析技术等，蛋白质的分子印迹技术和结晶技术有待深入研究。蛋白质分离纯化是当代生物产业的核心技术，技术要求与应用成本都较高，一种生物药品的成本大约 75% 都用于下游的蛋白质分离纯化中。因此，蛋白质的分离纯化技术已经越来越受到重视，正不断地向着自动、智能、快速、高效的方向发展。

### 1.2.2 蛋白质多肽的研究

20 世纪 60 年代，美国生物化学家 Bruce R. Merrifield 建立了多肽固相合成 (solid phase peptide synthesis, SPPS) 技术，因此荣获 1984 年诺贝尔化学奖。该技术对一些含量很少的生物活性肽 (如神经肽) 的功能和结构研究、有重要应用价值的多肽的大规模制备等具有重要意义。对蛋白质多肽的研究虽然不如对蛋白质研究那样轰轰烈烈，但多肽的研究产生的经济效益却十分可观，主要体现在多肽药物的研发上。蛋白质多肽研究包括活性产物的鉴定、分离和功能评价，也包括多肽生产的方式，如随机序列多肽库的构建。活性多肽作为药物研究成果显著，如胸腺五肽、重组人胸腺肽等，并且其经

济效益也很显著。

### 1.2.3 蛋白质改性的研究

蛋白质改性包括物理改性、酰化作用改性、磷酸化作用改性、糖基化作用改性、酶法水解改性、共价交联作用等。

物理化学法包括对蛋白质进行变性、复性处理,修饰蛋白质分子侧链官能团,分割肽链,改变表面电荷分布促进蛋白质形成一定的立体构象等;生物化学法是使用蛋白酶选择性地切割蛋白质,利用转糖苷酶、酯酶、酰酶等去除或连接不同化学基团,利用转酰胺酶使蛋白质发生交联等。以上方法只能对相同或相似的基团或化学键发生作用,不能针对特定的部位起作用。蛋白质衍生物可以作为新的产品添加成分,为产品体系补充重要的功能,广泛应用于食品加工工业、木材制品工业、纺织业等。在改变结构和功能性方面,化学法比酶法更有效,酶法改性和物理改性的安全性优于化学改性。

### 1.2.4 蛋白质固定化的研究

固定化酶(immobilized enzyme)是20世纪60年代发展起来的一种新技术,是指用物理或化学方法处理水溶性的酶,使之变成不溶于水或固定于固相载体但仍具有酶活性的酶的衍生物。通常酶催化反应都是在水溶液中进行的,而固定化酶是将水溶性的蛋白酶分子用物理或化学方法处理,使之成为具有催化活性却不溶于水的状态。进一步开发更简便的固定化方法以及性能更加优异的载体材料,仍然是该领域追求的目标。

#### (1) 固定化酶技术

与游离酶相比,固定化酶除可以保持其高效、专一、温和以及酶活性可调节控制等酶催化反应特性以外,还具有易于回收、可重复使用、操作连续可控、工艺简便等一系列优点。选择性地利用酶分子表面且远离活性中心位点的特定稀有基团(如巯基等)进行修饰与连接反应,使该基团与载体上另一基团共价交联来固定酶蛋白,使其活性中心朝向溶液方向,以达到控制其空间取向的目的。酶的定向固定化技术正在成为研究的热点,其解决了传统酶固定化方法中酶在任意位点与载体进行连接,使酶活性位点不能充分暴露、酶活力低等问题。

#### (2) 生物传感器

酶促反应产生的物质在电极上发生氧化或还原反应产生的电流信号,在一定条件下与被测物质浓度呈线性关系,因此,可以用氧化还原蛋白质和酶的直接电化学来构建生物传感器。对蛋白质氧化还原电位的测定和电子转移速率的研究有助于理解环境对生物化学功能的影响。氧化还原蛋白与电极之间的直接电子转移的研究在分析化学上具有重要意义,而电化学方法已经广泛应用于生物分子的电子转移方面。将氧化还原蛋白质分子固定在生物相容性的电极表面,就会表现出快速的电子转移过程,可以不加入媒介体直接对底物进行电化学检测。

近年来,用于蛋白质的直接电子转移且能保持生物活性的无机多孔材料引起了人们越来越多的关注。无机多孔材料具有层状的稳定结构,其中沸石和介孔分子筛具有规则的大孔结构、良好的机械强度、热化学稳定性、生物相容性和高负载量,可以修饰电极材料,构成电子传递环境,并且能抑制生物降解。分子筛作为酶的固定材料,可以不需要交联剂而直接通过物理或化学反应与酶混合,用来制作新的生物传感器。将沸石和介孔分子筛的择型性、离子交换性、热化学稳定性和现代电化学技术的高灵敏度性相结合,其性能大大超过基于其他化学修饰电极所构建的传感器。

#### (3) 组织工程

目前,在骨组织工程支架材料的研究中,胶原是最常用的天然衍生物。胶原在组织内是细胞附着的支架,并通过介导各种理化刺激来调节细胞的分化,对种子细胞的早期黏附、随后的分化增殖及发挥成骨功能等都具有促进作用。这种支架材料具有良好的细胞相容性和生物降解性,但是其生物强度



比较低。研究者 N. Saito 等制备了热敏感的聚乳酸-聚乙烯/人重组骨形态发生蛋白聚合物, 该物质在较高温度下是液体, 注射到体内后该液态复合物会随着体温逐渐冷却而变成半固体状, 可以作为骨形成的支架材料, 并且在局部可逐渐释放人重组骨形态发生蛋白。利用这种可注射支架材料修复骨缺损, 具有组织损伤小、操作简便、手术并发症少等诸多优点, 应用前景广阔。

### 1.2.5 蛋白质结构分析、功能设计与预测

#### (1) 蛋白质的结构分析

蛋白质工程的核心内容之一就是收集蛋白质分子结构的信息, 以建立结构与功能之间关系的数据库, 为蛋白质构效关系的理论研究奠定基础。蛋白质结构分为 4 级, 目前都有比较成熟的结构解析方法。

蛋白质是由不同氨基酸按一定顺序通过肽键连接而成的, 因此氨基酸序列就是蛋白质的一级结构, 其决定着蛋白质的空间结构与生物功能。1955 年, 英国生物化学家 Frederick Sanger 首次解析了胰岛素分子的氨基酸序列, 因此荣获了 1958 年的诺贝尔化学奖。测定氨基酸序列的主要方法有 Edman 降解法、肽链的从头测序 (*de novo*) 法, 也可以通过 cDNA 文库获得全序列推测氨基酸序列。自动化仪器的相继出现大大推动了蛋白质一级结构测序的发展, 例如 Edman 液相自动顺序分析仪、固相顺序分析仪、气相色谱-质谱 (GC-MS) 等。

蛋白质的二级结构主要包括  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠和无规则卷曲, 目前主要通过圆二色谱方法 (circular dichroism, CD) 和傅里叶红外光谱法 (FT-IR) 进行测定。CD 可以定量检测手型分子结构, 蛋白质的二级结构 ( $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠) 以及侧链都是具有手性的, 蛋白质的手性是 CD 测定蛋白质二级结构的基础。FT-IR 是通过红外光谱来推知蛋白质相关的结构信息, 由于红外光谱的形成是以分子的振动为基础的, 这些振动能定位蛋白质分子中的键和基团。除了这些测定方法之外, 还有一些生物化学的技术被用于测定肽链间的二硫键。

蛋白质的空间结构十分复杂, 测定难度也很大, 测定方法主要有 X 射线衍射法、核磁共振技术 (NMR)、三维电镜重构技术 3 种方法。X 射线晶体衍射是最经典的测定生物大分子结构的方法。DNA 双螺旋的发现一个重要的依据就是晶体衍射图片。蛋白质晶体衍射中最大的难点是蛋白质的结晶, 也在一定程度上限制了其发展。NMR 可以分析液态下的肽链结构, 该方法绕过了结晶、X 射线衍射成像分析等难点, 直接分析自然状态下的蛋白质的结构。NMR 技术是后起之秀, 相对于 X 射线衍射法较为简单, 分辨率也很高, 近年来技术越发成熟。三维电镜重构技术是结构生物学研究中的一种较新的技术, 是将电子显微、电子衍射与计算机图像处理相结合而形成的适合分析难以形成三维晶体的膜蛋白等大的复合体的三维结构分析技术。迄今为止, 电子晶体和冷冻电子显微技术、扫描隧道显微镜、波谱技术、计算机分子图形学、量子力学对构象研究做出了贡献。

#### (2) 蛋白质功能预测与设计

以蛋白质结构与功能关系为基础, 根据自身需要对蛋白质进行分子改造, 有物理方法、化学方法、基因重组等多种方法。根据对天然蛋白质结构与功能分析建立起来的数据库里的数据, 可以预测氨基酸序列肽链空间结构和生物功能; 反之, 也可以根据特定的生物功能, 设计蛋白质分子的氨基酸序列和空间结构。

当前蛋白质结构预测方法主要有比较建模法、折叠识别法、二级结构预测法和从头预测法, 前 3 项是基于已有知识, 后 1 项是从头预测。按照其对模板的依赖与否主要分为 2 类: 模板依赖模型和从头预测法。模板依赖模型又可以分为 2 种模型: 同源模型 (或称比较模型) 和折叠识别模型 (又称穿线法)。具有相似序列的蛋白质具有相似的功能, 最可靠的预测蛋白质功能的方法是进行数据库的相似性搜索。通过数据库搜寻, 比较目的蛋白是否与已知功能的蛋白质相似。常用的数据库是无冗余蛋白序列数据库, 如 SWISS-PROT 和 PDB。当目标序列没有同源结构时, 进行蛋白质三维结构预测就必须使用从头预测方法。