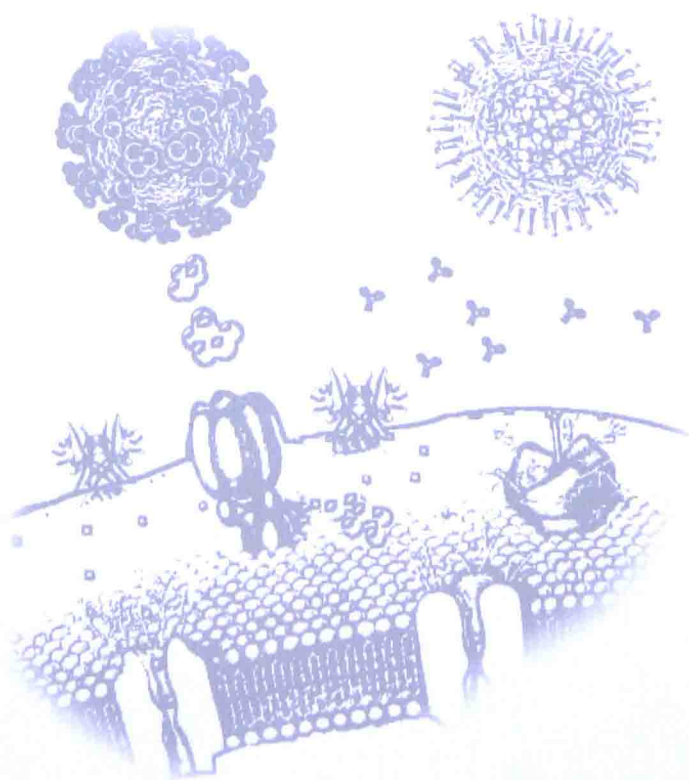


中国科协三峡科技出版资助计划

蛋白质技术在病毒学 研究中的应用

王晓佳 编著



中国科学技术出版社
CHINA SCIENCE AND TECHNOLOGY PRESS

中国科协三峡科技出版资助计划

蛋白质技术在病毒学 研究中的应用

王晓佳 编著

中国科学技术出版社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

蛋白质技术在病毒学研究中的应用 / 王晓佳编著. —北京: 中国科学技术出版社, 2015. 1

(中国科协三峡科技出版资助计划)

ISBN 978-7-5046-6750-2

I. ①蛋… II. ①王… III. ①蛋白质-生物化学-技术-应用-病毒学-研究
IV. ①Q510.3 ②Q939.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 260680 号

总 策 划 沈爱民 林初学 刘兴平 孙志禹
项 目 策 划 杨书宣 赵崇海
编辑组组长 吕建华 赵 晖

责任编辑 史若晗
责任校对 刘洪岩
印刷监制 李春利
责任印制 张建农

出 版 中国科学技术出版社
发 行 科学普及出版社发行部
地 址 北京市海淀区中关村南大街 16 号
邮 编 100081
发行电话 010-62103349
传 真 010-62103166
网 址 <http://www.cspbooks.com.cn>



开 本 787mm×1092mm 1/16
字 数 270 千字
印 张 12.25
版 次 2015 年 8 月第 1 版
印 次 2015 年 8 月第 1 次印刷
印 刷 北京盛通印刷股份有限公司

书 号 ISBN 978-7-5046-6750-2/Q · 184
定 价 60.00 元

(凡购买本社图书, 如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责调换)

总 序

科技是人类智慧的伟大结晶，创新是文明进步的不竭动力。当今世界，科技日益深入影响经济社会发展和人们日常生活，科技创新发展水平深刻反映着一个国家的综合国力和核心竞争力。面对新形势、新要求，我们必须牢牢把握新的科技革命和产业变革机遇，大力实施科教兴国战略和人才强国战略，全面提高自主创新能力。

科技著作是科研成果和自主创新能力的重要体现形式。纵观世界科技发展历史，高水平学术论著的出版常常成为科技进步和科技创新的重要里程碑。1543年，哥白尼的《天体运行论》在他逝世前夕出版，标志着人类在宇宙认识论上的一次革命，新的科学思想得以传遍欧洲，科学革命的序幕由此拉开。1687年，牛顿的代表作《自然哲学的数学原理》问世，在物理学、数学、天文学和哲学等领域产生巨大影响，标志着牛顿力学三大定律和万有引力定律的诞生。1789年，拉瓦锡出版了他的划时代名著《化学纲要》，为使化学确立为一门真正独立的学科奠定了基础，标志着化学新纪元的开端。1873年，麦克斯韦出版的《论电和磁》标志着电磁场理论的创立，该理论将电学、磁学、光学统一起来，成为19世纪物理学发展的最光辉成果。

这些伟大的学术论著凝聚着科学巨匠们的伟大科学思想，标志着不同时代科学技术的革命性进展，成为支撑相应学科发展宽厚、坚实的奠基石。放眼全球，科技论著的出版数量和质量，集中体现了各国科技工作者的原始创新能力，一个国家但凡拥有强大的自主创新能力，无一例外也反映到

其出版的科技论著数量、质量和影响力上。出版高水平、高质量的学术著作，成为科技工作者的奋斗目标和出版工作者的不懈追求。

中国科学技术协会是中国科技工作者的群众组织，是党和政府联系科技工作者的桥梁和纽带，在组织开展学术交流、科学普及、人才举荐、决策咨询等方面，具有独特的学科智力优势和组织网络优势。中国长江三峡集团公司是中国特大型国有独资企业，是推动我国经济发展、社会进步、民生改善、科技创新和国家安全的重要力量。2011年12月，中国科学技术协会和中国长江三峡集团公司签订战略合作协议，联合设立“中国科协三峡科技出版资助计划”，资助全国从事基础研究、应用基础研究或技术开发、改造和产品研发的科技工作者出版高水平的科技学术著作，并向45岁以下青年科技工作者、中国青年科技奖获得者和全国百篇优秀博士学位论文奖获得者倾斜，重点资助科技人员出版首部学术专著。

由衷地希望，“中国科协三峡科技出版资助计划”的实施，对更好地聚集原创科研成果，推动国家科技创新和学科发展，促进科技工作者学术成长，繁荣科技出版，打造中国科学技术出版社学术出版品牌，产生积极的、重要的作用。

是为序。

作者简介



1976 年 7 月出生，中国农业大学副教授，博士生导师，研究方向为病毒致病机理与新型防控技术。近年来以第一或通讯作者在 PNAS、J. Virol 等期刊发表论文 16 篇，申请专利 4 项，参与 3 个国际组织，多次受邀国内外学术会议并作报告。

前 言

蛋白质学是揭示生命现象与规律的必经之路。随着现代科技水平的发展，蛋白质学已经成为生物科学的新引擎。蛋白质学科的快速推进带动了相关学科领域的发展，也成为病毒学研究的有力工具。而研究病毒感染状态下蛋白质的特性与功能，亦可拓展对蛋白质的全方位认识，并促进学科的交融与共同发展，为进一步探索病毒与机体在漫长进化过程中的对立统一关系、研制新型蛋白类抗病毒制剂提供重要的突破口。

作者多年来一直聚焦于研究病毒-宿主细胞的相互作用，在教学研究中，随时将国内外蛋白质学科学研究领域的所见所闻、所思所想、所学所用记录下来，汇总成二十七万字的学术作品。具体而言，本书从病毒感染细胞蛋白的制备（表达、分离与纯化）、蛋白质生化特性（分子质量、突变、疏水性）、质量控制（合成、降解与修饰）、细胞定位（出入核信号）、结构学分析（结构域、构象变化）以及蛋白质之间的互作几个层面，阐述在病毒-宿主互作过程中蛋白质的特性、定位、结构与功能，以期应用蛋白质学知识来阐释病毒致病机理，并寻求抗病毒新策略。

回想我们漫长的学习与科研经历，记忆中总期待有这样一本书，其内容不拘泥于刻板的说教，以实例深入浅出地解读难点，既有导师倾囊相赠、又有业界同仁独特视角、生动解说。作者希望成就这样的作品，并不追求大而全的概念，而是一份朴素的学术日志——基于有案可稽的论据，阐释一些科学现象，提出进一步研究建议，达到抛砖引玉之效果。希望本书对病毒学与蛋白质学初学者及科研人员有切实的参考作用。然而蛋白质学与

病毒学进展突飞猛进，鉴于作者水平有限，论述中若有不足之处，敬请斧正。

衷心感谢中国农业大学与美国芝加哥大学师长们的教诲与指导，感谢国内外同行友人在本书撰写过程中的多方建议，感谢本课题组研究生对完善书稿所做的努力，各位的支持与鼓励对于本书付梓不可或缺。本书的撰写历经十载，作者在此特别感谢父母以及家人的无私奉献与关爱，使著书的信念未曾间断。

王晓佳 谨志
2015 年 5 月 1 日

中国科协三峡科技出版资助计划 2012 年第一期资助著作名单

(按书名汉语拼音顺序)

1. 包皮环切与艾滋病预防
2. 东北区域服务业内部结构优化研究
3. 肺孢子菌肺炎诊断与治疗
4. 分数阶微分方程边值问题理论与应用
5. 广东省气象干旱图集
6. 混沌蚁群算法及应用
7. 混凝土侵彻力学
8. 金佛山野生药用植物资源
9. 科普产业研究
10. 老年人心理健康研究报告
11. 农民工医疗保障水平及精算评价
12. 强震应急与次生灾害防范
13. “软件人”构件与系统演化计算
14. 西北区域气候变化评估报告
15. 显微神经血管吻合技术训练
16. 语言动力系统与二型模糊逻辑
17. 自然灾害与发展风险

中国科协三峡科技出版资助计划 2012 年第二期资助著作名单

1. BitTorrent 类型对等网络的位置知晓性
2. 城市生态用地核算与管理
3. 创新过程绩效测度——模型构建、实证研究与政策选择
4. 商业银行核心竞争力影响因素与提升机制研究
5. 品牌丑闻溢出效应研究——机理分析与策略选择
6. 护航科技创新——高等学校科研经费使用与管理实务
7. 资源开发视角下新疆民生科技需求与发展
8. 唤醒土地——宁夏生态、人口、经济纵论
9. 三峡水轮机转轮材料与焊接
10. 大型梯级水电站运行调度的优化算法
11. 节能砌块隐形密框结构
12. 水坝工程发展的若干问题思辨
13. 新型纤维素系止血材料
14. 商周数算四题
15. 城市气候研究在中德城市规划中的整合途径比较
16. 心脏标志物实验室检测应用指南
17. 现代灾害急救
18. 长江流域的枝角类

中国科协三峡科技出版资助计划 2013 年资助著作名单

1. 蛋白质技术在病毒学研究中的应用
2. 当代中医糖尿病学
3. 滴灌——随水施肥技术理论与实践
4. 地质遗产保护与利用的理论及实证
5. 分布式大科学项目的组织与管理：人类基因组计划
6. 港口混凝土结构性能退化与耐久性设计
7. 国立北平研究院简史
8. 海岛开发成陆工程技术
9. 环境资源交易理论与实践研究——以浙江省为例
10. 荒漠植物蒙古扁桃生理生态学
11. 基础研究与国家目标——以北京正负电子对撞机为例的分析
12. 激光火工品技术
13. 抗辐射设计与辐射效应
14. 科普产业概论
15. 科学与人文
16. 空气净化原理、设计与应用
17. 煤炭物流供应链管理
18. 农产品微波组合干燥技术
19. 腔静脉外科学
20. 清洁能源技术创新管理与公共政策研究——以碳捕集与封存（CCS）为例
21. 三峡水库生态渔业
22. 深冷混合工质节流制冷原理及应用
23. 生物数学思想研究
24. 实用人体表面解剖学
25. 水力发电的综合价值及其评价
26. 唐代工部尚书研究
27. 糖尿病基础研究与临床诊治
28. 物理治疗技术创新与研发
29. 西双版纳傣族传统灌溉制度的现代变迁
30. 新疆经济跨越式发展研究
31. 沿海与内陆就地城市化典型地区的比较研究
32. 疑难杂病医案
33. 制造改变设计——3D 打印直接制造技术
34. 自然灾害对经济增长的影响——基于国内外自然灾害数据的实证研究
35. 综合客运枢纽功能空间组合设计理论与实践
36. TRIZ——推动创新的技术（译著）
37. 从流代数到量子色动力学——结构实在论的一个案例研究（译著）
38. 风暴守望者——天气预报风云史（译著）
39. 观测天体物理学（译著）
40. 可操作的地震预报（译著）
41. 绿色经济学（译著）
42. 谁在操纵碳市场（译著）
43. 医疗器械使用与安全（译著）
44. 宇宙天梯 14 步（译著）
45. 致命的引力——宇宙中的黑洞（译著）

发行部

地址：北京市海淀区中关村南大街 16 号
邮编：100081
电话：010-62103354

办公室

电话：010-62103166
邮箱：kxsxcb@cast.org.cn
网址：<http://www.cspbooks.com.cn>

目 录

总 序

第 1 章 概论	1
1.1 蛋白质学基本概念	1
1.2 病毒-细胞互作过程中的蛋白质结构与功能	4
参考文献	10
第 2 章 蛋白质制备、分离与纯化	14
2.1 蛋白样品的制备	14
2.2 重组蛋白的制备	16
2.3 提高原核表达效率的策略	19
2.4 蛋白质纯化	25
参考文献	30
附录	31
第 3 章 蛋白质性质分析与细胞定位	32
3.1 蛋白质基本性质	32
3.2 蛋白质特性鉴定	37
3.3 蛋白质细胞定位	40
参考文献	51

第4章 蛋白质结构学基础及技术	54
4.1 蛋白质结构学基础	54
4.2 蛋白质结构学研究技术	72
参考文献	85
第5章 蛋白质质量控制	90
5.1 泛素-蛋白酶体体系	90
5.2 自噬——溶酶体体系	98
5.3 蛋白质控体系内的交互关联	103
5.4 病毒感染细胞中的蛋白质质量控制	106
参考文献	111
第6章 蛋白质修饰	117
6.1 蛋白质修饰的复杂性与生物学意义	117
6.2 蛋白质修饰类型	119
参考文献	129
第7章 大分子的相互作用	132
7.1 蛋白质之间的相互作用	132
7.2 蛋白质相互作用研究技术	136
7.3 较复杂的蛋白质互作实例及研究策略	149
7.4 蛋白质与核酸的相互作用	154
参考文献	159
第8章 广谱抗病毒蛋白类制剂的研究进展	163
8.1 基于病毒感染层面设计的抗病毒制剂	163
8.2 基于宿主细胞防御层面设计的抗病毒制剂	166
8.3 其他蛋白质类抗病毒制剂	168
8.4 非蛋白质类广谱抗病毒制剂研究进展	169

8.5 展望 171

参考文献 171

附录 书中插图与插表一览表 175

索引 179

第1章 概论

1.1 蛋白质学基本概念

1.1.1 动态多层次地认识蛋白质学

蛋白质是生命的象征，也是人体最重要的物质。蛋白质处于一个新陈代谢的动态变化过程中，其合成受时空等多种因素的调控。为了适应不同组织的不同生理需要，在同一基因组的条件下，各组织的细胞具有自己一套独特的基因表达系统，其中有些必需的蛋白质在各组织细胞中广泛存在，有一些特殊功能蛋白质却是组织特异表达的。事实上，即使是同一种细胞的生长与活动，因不同时期，不同条件其蛋白质也是在不断变化中，因此蛋白质只是在某一特定时间内的蛋白质集合体。直接定位于蛋白质水平，在特定时间或特定环境条件下，从整体、动态、定量的角度研究功能，才能代表正在工作的动态过程。

作者认为，蛋白质学研究的基本思路，就是多层次、多方法、多对照。简而言之，蛋白质学一般基于研究蛋白样品的制备（外源表达、分离与纯化）、蛋白质的生化特性（如分子质量、突变、疏水性）、蛋白质量控制（合成、降解与修饰）、细胞定位（如出入核信号）、结构学分析（结构域、构象变化）以及蛋白质与大分子的互作几个层面，研究各种外界影响（如病毒感染）引致细胞内蛋白质功能的变化。其中的生化试验（如基因敲除/过表达技术）、细胞/活体试验（系列荧光与免疫学技术）、结构学分析（蛋白质结晶技术与色谱技术），以及一系列蛋白质互作技术构成整个研究中的基本策略，而蛋白质研究中任何一个结论往往需要上述几个方面技术共同验证才可以成立。

近年来，蛋白质学的发展为进一步探索病毒与宿主的相互作用、研制新型蛋白类抗病毒制剂提供了重要的突破口。这里要强调的是，某些技术方法，如病毒或宿主细胞蛋白体外表达、分离与纯化、蛋白质互作的体外试验，皆与常规的蛋白质学研究方

法无异；而回归到病毒感染体系，蛋白质特性、细胞定位、蛋白质修饰、结构与功能的研究方法虽很相似却又有其特别之处。本书尝试通过将蛋白质学理论与病毒学领域发展进行学科交叉整合，以推进学科理论与研究策略的进一步完善，相关研究论题与技术可在书中寻其相应章节，研究思路的阐述亦可延伸开来，涉及更多的科学核心问题，并拓展到病毒学、生物化学、细胞生物学等多个学科领域。

1.1.2 基本概念及相关科学论题

1.1.2.1 基因与蛋白质

生命体最重要的组成部分是基因与蛋白质，其中基因是遗传信息的携带者，而蛋白质是生物功能的执行者，具有自身的活动规律，因此仅从基因的角度来研究生命活动规律是远远不够的，必须研究有基因转录与翻译出蛋白质的生理过程，才能真正揭示生命活动规律。虽然核酸药物在疫病防控中起到非常重要的作用，但是其设计也有一定局限性，如多数疾病表征在蛋白水平，而不在基因水平，此外，很多疾病是多基因共同作用的结果，因此难找其关键基因作用靶标。再者，核酸药物一般选择性差，细胞毒性也较大，且如何释放到相应的组织也是个大难题。鉴于此，蛋白质类制剂的设计与研制任重而道远！蛋白质的多变性与多样性等特殊性质导致蛋白质研究技术比核酸技术要复杂与困难得多，但正是这些特性参与并影响了整个生命过程。

表 1-1 基因与蛋白质学特性与研究范畴比较

基因	蛋白质
均一、完整性	特殊、多样性
遗传信息载体	基因功能的体现者与执行者
机体所有不同细胞的基因组基本一致	蛋白表现多变、多样、动态、复杂性
基因组在几乎所有细胞中均完整，单基因不能决定是否被修饰	高细胞特异性、不同细胞表达蛋白不同亚套，相同细胞蛋白种类未必相同
基因的功能主要通过其表达产物——蛋白实现，单基因不能反映整体信息	多数蛋白通过与其他配体分子结合，参与细胞的生命活动
两者并非一一对应的，相同基因可转译成不同蛋白，确定蛋白不能确定基因	

1.1.2.2 蛋白质化学、蛋白质工程与蛋白质组学

蛋白质化学是研究氨基酸、肽与蛋白质的结构与理化性质的学科。蛋白质工程是在基因重组技术、蛋白质化学、分子生物学等学科的基础之上，融合了晶体学、蛋白质动力学与计算机辅助设计等多学科而发展起来的研究领域，目标在于研究蛋白质结

构与功能关系，以改变蛋白质特性、生产活性物质抑或设计全新蛋白。“蛋白质组计划”提出早在 20 世纪 80 年代初，但遗憾的是这一计划后被搁浅。蛋白质组的概念最先由 Marc Wilkins 提出，是在对蛋白质系统研究的基础上产生了研究细胞内蛋白质组成及其活动规律的新兴学科，是指由一个基因组或一个细胞、组织表达的所有蛋白质，这不仅限于基因组已完成的微生物。需要强调的是，本书并不局限于某个特定的蛋白质学科领域，而是注重于综合运用各种蛋白质技术解决病毒学的研究课题。

表 1-2 蛋白质化学、蛋白质组学与蛋白质工程研究范畴比较

蛋白质化学	蛋白质组学	蛋白质工程
单一蛋白质	复杂混合物	将核酸与蛋白研究相结合
全序列分析	部分序列分析	一般全序列分析
强调结构与功能	强调通过数据库匹配	强调修饰/改造基因或产生新蛋白
结构生物学	系统生物学	包括基因/蛋白的遗传工程

1.1.2.3 蛋白质基本单位——氨基酸

氨基酸是生物功能大分子蛋白质的基本组成单位，为分子结构中含有氨基（-NH₂）与羧基（-COOH），并且氨基与羧基都直接连在同一个碳原子上的有机化合物。氨基酸是肠道优先利用的重要营养物质，仔猪肠道组织利用的氨基酸将近每天摄入量的 50%，利用的必需氨基酸占其摄入氨基酸的 50%^[1]。氨基酸的应用不仅局限于传统的食品添加剂（如谷氨酸钠盐）、日用化工（如聚谷氨酸绿色塑料）、饲料添加剂（如猪鸡的赖氨酸与甲硫氨酸等限制性氨基酸），近年来对氨基酸的研究与应用逐渐涉及生命科学的方方面面。众所周知，色氨酸在火鸡与其他食物中发现，色氨酸在睡眠与情绪控制以及在免疫系统也承担关键角色，还可抑制自体免疫性疾病。谷氨酸不仅是人体一种重要的营养成分，而且对肝病与神经衰弱均有疗效。此外，当缬氨酸不足时，大鼠中枢神经系统功能会发生紊乱，故常用缬氨酸等支链氨基酸的注射液治疗肝功能衰竭等疾病。氨基酸感应的营养信号通路功能紊乱是促发代谢性疾病的重要原因，氨基酸转运功能异常将导致严重的氨基酸吸收与代谢障碍性疾病。氨基酸在细胞生长过程中还参与各种重要的生理生化过程，包括作为底物参与细胞蛋白质的合成以及为细胞生长提供能量，氨基酸缺乏将使真核激活因子 eIF2 磷酸化，从而抑制蛋白质合成^[2]。氨基酸调节细胞信号与基因表达以及氨基酸自身的转运与代谢，氨基酸转载体也是一种重要的营养物质传感分子，在调控细胞生长与凋亡中起着重要的信号传导作用，如一些蛋白的合成主要由必需氨基酸的利用驱动，如亮氨酸比其他氨基酸促蛋白质合成能力高 10 倍^[3,4]。

组成蛋白质的 20 多种氨基酸中有 8 种属于疏水性氨基酸，包括 Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe 与 Pro，这些疏水性氨基酸在蛋白质中的含量直接决定了蛋白质的疏水性。此外，Gly 呈中性，Cys 的氧化形式胱氨酸呈疏水性。一些带电氨基酸，包括带正电荷的 Arg、His、Lys，带负电荷的 Asp 与 Glu，其侧链在生理条件下都可解离。此外，某些氨基酸对二级结构的形成或破坏非常重要，如 Leu、Pro（详见第 4 章）；某些氨基酸是蛋白质修饰的重要靶点，如 Lys、Arg 与 Ser，其中，Lys 是多种修饰的竞争性作用位点，尤其值得重视（详见第 5 章与第 6 章）。具体细节请见以下章节的分别论述。

1.1.2.4 氨基酸、肽类与蛋白质

近一时期越来越多的研究表明，蛋白质的结构与功能的执行主要依赖于其结构域（详见第 4 章），而结构域中某一个或几个氨基酸的突变即可改变其细胞定位、空间结构（详见第 3 章与第 4 章），主要特性及其功能（如蛋白质修饰与降解，详见第 5 章与第 6 章）。从化学角度来讲，蛋白质与肽类无明显界限区别，肽可由两个或两个以上的氨基酸化学聚合而成，这是蛋白质生成的前体。根据现今接受的命名法则，一般可从含有氨基酸的数量上区分：即寡/小肽为组成少于 15 个氨基酸的肽，多肽约 15–50 个氨基酸残基，而蛋白质为超过 50 个氨基酸的肽衍生物。现代研究中的线性短肽与多肽可采用化学合成法，合成肽与基因工程法获得产物的功能无明显差异^[5,6]。

1.2 病毒-细胞互作过程中的蛋白质结构与功能

1.2.1 感染过程中病毒蛋白的结构与功能

病毒学的历史源远流长，公元 3700 年前古埃及已有对病毒感染的记载，在公元 1000 前中国就有接种的实践。病毒具有特定的颗粒，自身不能生长，且没有编码与产生能量与蛋白质合成有关装置的遗传信息，相对动物、植物及细菌而言，有更多的生物多样性。不同类型的病毒突变率相差极大，免疫缺陷病毒可高达每个核苷酸的 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ ，而疱疹病毒仅为 $10^{-8} \sim 10^{-11}$ ，这种突变引致的糖蛋白抗原性改变可逃避宿主的免疫应答，但是也因此创造出一个由多个突变体构成的动态平衡的组群，这些突变体对药物抗性、毒力以及对化学试剂的敏感性可能均存在着差异。

病毒的基因组包裹在带正电的蛋白衣壳中以适应宿主环境，在某些情况下，病毒颗粒拥有荚膜层与囊膜层，这是病毒演化过程中的一种进步。病毒被膜同时包含了病毒蛋白与来自宿主的成分，包括外部的糖蛋白与内部的基质蛋白，其中糖蛋白是主要抗原。当囊膜病毒感染宿主细胞时，其囊膜与宿主细胞膜相互融合，使病毒粒子侵入