

案例版

生物工程系列规划教材

普通高等教育“十二五”规划教材

# 蛋白质工程

李维平 主编



科学出版社

“案例版”生物工程系列规划教材

普通高等教育“十二五”规划教材

# 蛋白质工程

李维平 主编



科学出版社

北京

## 内 容 简 介

蛋白质工程是蛋白质基础理论与工程应用的结合,本书以工科思想为指导来构建全书基本框架和体系,分三个层次阐述:蛋白质生物学基础理论、蛋白质工程技术理论、蛋白质工程方法与技术。内容上强化蛋白质工程的工艺过程,在注重工艺原理运用与产物生产过程的完整性中,加强和体现了蛋白质生产工艺的先进性。书中包括大量科研及生产案例,力求使读者更好地理解本学科的内容。

本书适合作为普通高等院校生物工程、生物技术等专业的本科及研究生教材,也可以作为相关领域教学科研人员的参考书。

### 图书在版编目(CIP)数据

蛋白质工程 / 李维平主编. —北京: 科学出版社, 2013. 6

“案例版” 生物工程系列规划教材 普通高等教育“十二五” 规划教材

ISBN 978-7-03-037627-5

I. ①蛋… II. ①李… 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 (2013) 第 116003 号

责任编辑: 刘 畅 丛 楠 / 责任校对: 钟 洋

责任印制: 阎 磊 / 封面设计: 迷底书装

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

化学工业出版社印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2013 年 6 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2013 年 6 月第一次印刷 印张: 26

字数: 658 000

定价: 55.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

## 《蛋白质工程》编写人员名单

主 编 李维平

副主编 吴道澄 袁 静 徐 虹

编 委 (按姓氏笔画排列)

井 建 (北京师范大学)

田士林 (黄淮学院)

李 莉 (黄淮学院)

李维平 (西北农林科技大学)

吴道澄 (西安交通大学)

张雅利 (西安交通大学)

邵景侠 (西北农林科技大学)

袁 静 (中国军事医学科学院)

徐 虹 (西北农林科技大学)

# 前 言

蛋白质是生命存在的基础，人们对蛋白质的认识已经延续了数百年、上千年。在科学不断发展的推动下，对蛋白质的研究也是逐步深入。人类对蛋白质的研究先于对基因的研究，经历了千辛万苦的探索。对基因的研究是现代科学理论史上的重大突破，使其成为领航技术，但基因的作用必须经蛋白质的表达而实现其功能。基因与蛋白质成为生命科学中两大分子研究的重点领域，特别是基因工程技术的发展，大大推动了蛋白质研究的理论与技术进步。蛋白质理论研究以波浪式向前发展，以螺旋式上升提高，总结蛋白质工程学科研究领域的方法与技术迫在眉睫。

## 1. 新编目的

生物工程专业是国家近年新开设的一个专业，教学体系与教学环节尚需要不断完善。现实对生物工程专业的人才培养和知识体系及教学内容都提出了更高的要求。特别是在大学扩招后，要提高教学质量、更新教学内容，更是如此。

优选教材和完善教材是提高教学质量的重要环节。通过基因工程的方法来改良蛋白质是新时代的产物，其主要方法和技术的普及与推广，使改造蛋白质有了良好的工具。但是，随着生物工程专业从生物技术专业中的脱离与独立成为国家一级学科体系，“蛋白质工程”教材的理科知识体系应转变为以工程性质为主的充分体现工程学内容的工程科学体系。

但是，在全国层面上还没有内容完全为工程学科性质的“蛋白质工程”课程教材，也缺乏理想的、内容完全为工艺过程的“蛋白质工程”选用的代用教材。因此，为适应生物工程专业教材的需要，我们试图在工科思想的指导下来尝试具有工科性质的“蛋白质工程”的基本框架与体系的构建。

## 2. 新编内容

新的“蛋白质工程”教材，在内容的遴选上突出了蛋白质工程的工科内涵的性质。我们认为工程是实施以理论为基础的设计与组装，含有生产的实用性。新的“蛋白质工程”教材，是在西北农林科技大学生物工程专业“蛋白质工程”课程讲义（已经使用两年）的基础上，进行各章内容的充实与完善。与已有的“蛋白质工程”书籍相比较，新教材有很大的变化。

首先，基础理论部分在“蛋白质结构”一章的基础上，添加了“工业蛋白质种类与功能特性”和“工业蛋白质改性加工方法与利用途径”两章。

其次，在蛋白质工程技术方面，添加了“蛋白质活性多肽与随机序列多肽库”、“蛋白质结晶技术”、“荧光蛋白工程”3章。

最后，在蛋白质工程的工程方面，添加了“蛋白质改性纺丝制胶膜技术”、“蛋白质体外合成技术”、“蛋白质分子印迹技术”、“蛋白质组织工程”、“蛋白质生物传感器”等共10章。

## 3. 形成基本框架与理论体系

新的“蛋白质工程”教材强化了蛋白质工程的工艺过程，在注重工艺原理运用与产物生

产过程的完整性中，加强和体现了蛋白质生产工艺的先进性，以提高新教材的质量。新编“蛋白质工程”的基本框架为蛋白质生物学基础理论（3章）、蛋白质工程技术理论（3章）和蛋白质工程方法与技术（10章）三个大的层次。这三大层次构成了“蛋白质工程”的整体系统。各章的理论体系也基本按原理、途径、方法、技术和应用来编写成章。其内容广泛，涉及蛋白质应用方面的有荧光蛋白工程，涉及工科蛋白质应用方面的有生物传感器、涉及医药方面的有蛋白质组织工程等。新的“蛋白质工程”教材试图达到理论性知识与实用性知识相结合的统一，初步建立起“蛋白质工程”这门学科的基本框架与理论体系。

全书共17章，由主编拟定编写大纲，副主编审读，主编统稿、改稿、定稿。参加编写的有李维平（第一章、第七章、第九章、第十章、第十二章、第十四章）、井建（第二章）、邵景侠（第三章）、徐虹（第四章、第十七章）、田士林（第五章）、李莉（第六章）、吴道澄（第八章、第十六章）、张雅利（第十一章）、袁静（第十三章、第十五章）。李维平还分别参加了第二章、第三章、第六章、第十三章的编写，袁静参加了第十二章的编写。感谢科学出版社做出的辛勤努力。

编写“蛋白质工程”教材是一项新的工作，采用了许多学者研究工作的内容或图表，在此由衷地致以感谢。由于时间仓促，经验不足，加之学科交叉，书中一些不妥之处在所难免，希望读者能够理解并提出宝贵意见。

主 编

2013年5月

# 目 录

## 前言

第一章 绪论	1
第一节 蛋白质工程概论	1
一、蛋白质工程的内涵	1
二、广义蛋白质工程	2
三、狭义蛋白质工程	3
四、蛋白质工程学与其他学科的关系	4
第二节 蛋白质工程的功能与研究内容	5
一、功能	5
二、研究内容	6
第三节 历史的回顾与应用研究进展	8
一、从多肽开始	9
二、在基因水平操作	9
三、在生化水平扩展	10
第四节 蛋白质工程的主要成就	10
一、普遍性应用	10
二、产品的多样性	12
思考题	13
参考文献	14
第二章 蛋白质的结构	15
第一节 蛋白质的初级结构	15
一、蛋白质的一级结构	15
二、蛋白质原子构成与作用	16
三、蛋白质氨基酸构成与作用	16
第二节 蛋白质的高级结构	18
一、蛋白质结构的层次性	18
二、蛋白质构象的多样性	18
三、蛋白质的二级结构	19
四、蛋白质的超二级结构和结构域	20
五、蛋白质的三级结构和四级结构	23

六、蛋白质初级结构与高级结构的关系	25
第三节 蛋白质结构生物学研究进程	26
一、两个黄金时代	26
二、膜蛋白的挑战	27
三、特殊问题	27
思考题	27
参考文献	27
第三章 工业蛋白质种类与功能特性	29
第一节 概述	29
一、工业蛋白质的发展史	29
二、工业蛋白质的定义	30
第二节 工业蛋白质的种类	30
一、植物蛋白质	30
二、动物蛋白质	31
第三节 蛋白质的理化特性	33
一、溶解性	33
二、水合能力	35
三、乳化性	37
四、起泡性	38
五、黏度	38
六、凝胶性	39
七、组织形成性	39
八、风味结合性	40
第四节 工业蛋白质的生产特性与要求	40
一、工业蛋白质的生产特性	40
二、特性的形成与决定	40
三、生产上对蛋白质特性的要求	41
四、蛋白质功能特性与结构的关系	41
思考题	43
参考文献	44

<b>第四章 工业蛋白质改性加工方法与</b>	
<b>利用途径</b> .....	45
<b>第一节 蛋白质改性的原理与</b>	
<b>目的</b> .....	45
一、蛋白质改性的原理 .....	45
二、蛋白质改性的目的 .....	45
<b>第二节 蛋白质改性的途径与方法</b>	
.....	47
一、蛋白质改性的途径 .....	47
二、蛋白质改良的方法 .....	47
<b>第三节 改性的限制因素</b> .....	58
一、产品安全性 .....	58
二、产品功能特性的变化 .....	58
三、营养损失 .....	58
四、生产费用 .....	58
五、产品感官性质 .....	58
<b>第四节 改性蛋白质的加工方法</b> ..	59
一、加工程序 .....	59
二、加工方法 .....	59
<b>第五节 改性蛋白质的利用途径</b> ..	60
一、胶黏剂类 .....	61
二、可食性薄膜 .....	63
三、表面活性剂 .....	64
四、可降解材料 .....	64
五、控释体系 .....	65
六、造纸业的湿强剂 .....	66
七、蛋白质纤维和纳米纤维 .....	66
<b>思考题</b> .....	66
<b>参考文献</b> .....	67
<b>第五章 蛋白质改性纺丝制胶制膜技术</b>	
.....	68
<b>第一节 丝素蛋白的改性技术</b> .....	68
一、丝素蛋白改性的目的 .....	68
二、蚕丝蛋白丝素肽的提取工艺	
技术和流程 .....	69
三、改性的方法 .....	70
<b>第二节 蛋白质改性纺织纤维技术</b>	
.....	73
一、大豆蛋白质纺织纤维 .....	73
二、丝素蛋白纺织纤维 .....	75
<b>第三节 大豆蛋白质改性制胶技术</b>	
.....	78
一、两种原因 .....	78
二、生产上对大豆蛋白质胶黏剂	
性能的要求 .....	78
三、大豆蛋白质制胶的途径 .....	80
四、影响制胶的因素 .....	81
五、应用 .....	82
<b>第四节 胶原蛋白改性制膜技术</b> ..	83
一、改性方法 .....	84
二、改性前后胶原仿生膜的通透性	
.....	84
<b>思考题</b> .....	87
<b>参考文献</b> .....	87
<b>第六章 蛋白抗体酶工程技术</b> .....	88
<b>第一节 概述</b> .....	88
一、抗体的多样性 .....	88
二、抗体酶的产生 .....	88
三、抗体酶的优点 .....	89
<b>第二节 产生抗体酶的原理与方法</b>	
.....	89
一、原理 .....	89
二、方法 .....	91
<b>第三节 用于产生抗体酶的抗体库</b>	
技术 .....	94
一、PCR引物克隆 .....	95
二、生物合成反应法 .....	96
三、直接筛选法 .....	97
<b>第四节 抗体酶活性部位的修饰</b> ..	97
一、定点突变法 .....	97
二、化学修饰法 .....	98
<b>第五节 抗体酶的晶体结构</b> .....	99
一、抗体酶 1F7 .....	99
二、抗体酶 17E8 .....	100
三、抗体酶 48G7 .....	100
<b>第六节 抗体酶研究新方法</b> .....	101
一、半抗原设计方法 .....	101
二、抗体催化的化学转化范围 ..	102
三、挑战与展望 .....	105



第七节 抗体酶的应用	106	五、噬菌体表位随机肽库的局限	
一、抗体酶在有机合成中的应用		.....	132
.....	106	第六节 噬菌体表位随机肽库筛选	
二、用于阐明化学反应机制的抗体酶	107	.....	132
.....	107	一、筛选的一般过程	132
三、抗体酶在医疗上的应用	108	二、筛选策略	133
思考题	109	三、筛选克隆的进一步分析	135
参考文献	109	第七节 其他方式展示肽库	136
第七章 蛋白质活性多肽与随机序列		一、质粒肽库	136
多肽库	110	二、多核糖体展示肽库	137
第一节 蛋白质多肽的活性	110	思考题	140
一、生物活性肽	110	参考文献	140
二、抗菌肽	113	第八章 酶的固定化技术	141
三、金属结合蛋白(肽)	114	第一节 酶的固定化技术概述	141
第二节 蛋白质酶水解物	116	一、固定化酶的发展史	141
一、肽酶的作用方式	116	二、固定化酶发展的动因与过程	141
二、蛋白质水解物的生理功能	117	.....	141
三、蛋白质水解物的应用	117	三、酶固定化的定义	143
第三节 现代高通量筛选技术	118	四、酶固定化技术的重要性	144
一、宏基因组技术筛选	118	五、固定化酶的优缺点	145
二、宏蛋白质组技术筛选	118	第二节 酶固定化的机制	145
第四节 多肽筛选的靶体	119	一、酶分子与载体连接的功能基团	145
一、用单克隆抗体确定抗原表位	119	.....	145
.....	119	二、载体的选择	146
二、确定纯化蛋白及其他分子的结合表位	119	三、偶联反应	146
.....	119	第三节 酶固定化的方法	148
三、酶作用底物分析	120	一、固定化方法分类	148
四、分析蛋白质-蛋白质相互作用界面关键位点图谱	121	二、物理固定法	149
.....	121	三、化学固定法	152
五、寻找大型功能蛋白的小分子模拟肽	121	四、各种固定化酶特点的比较	154
.....	121	第四节 固定化酶载体材料与反应器	155
六、分离与鉴定疾病特异抗原模拟肽	122	.....	155
.....	122	一、载体分类	155
七、筛选细胞和器官特异肽	122	二、对载体的要求	156
八、抑制病毒复制的多肽	123	三、天然载体及改进	157
第五节 噬菌体表位随机肽库	125	四、合适的固定化条件	157
一、丝状噬菌体的形态结构	125	五、固定化酶反应器	158
二、噬菌体表面展示技术原理	126	第五节 固定化酶的形态与性质	158
三、噬菌体表面展示系统	128	.....	158
四、建库	129	一、固定化酶的形态	158

二、固定化酶的活力 .....	159	二、模块酶的类型 .....	187
三、固定化酶的稳定性 .....	159	第三节 杂合酶 .....	193
四、固定化对酶性质的影响 .....	160	一、杂合酶的概念 .....	193
五、固定化酶的催化特征 .....	161	二、构建杂合酶的方法 .....	193
第六节 影响固定化酶酶促反应的		三、酶的最佳化 .....	197
主要因素 .....	161	第四节 蛋白质工程酶制备技术 .....	200
第七节 固定化酶的应用 .....	162	一、定点突变 .....	200
一、工业生产上的应用 .....	162	二、二级结构工程 .....	207
二、医药方面的应用 .....	163	三、活性部位工程 .....	209
三、化学分析方面的应用 .....	163	四、结构域工程 .....	214
四、环境保护方面的应用 .....	164	五、从头设计酶 .....	216
五、新能源的开发 .....	164	思考题 .....	221
思考题 .....	164	参考文献 .....	221
参考文献 .....	164	第十一章 蛋白质组织工程 .....	222
第九章 蛋白质结晶技术 .....	165	第一节 天然蛋白基水凝胶 .....	223
第一节 晶体生长机制 .....	165	一、形成原理、作用与影响因素 .....	223
一、结晶推动力 .....	165	二、蛋白基水凝胶的类型 .....	223
二、溶液分相与结晶相图 .....	165	三、蛋白基水凝胶结构表征 .....	230
三、聚集与成簇 .....	166	第二节 生物功能表面材料 .....	231
四、成核 .....	166	一、生物材料表面与蛋白质、细胞	
五、晶体生长 .....	167	之间的关系 .....	231
六、场的作用 .....	167	二、生物表面材料的构筑 .....	234
第二节 结晶条件的筛选和		三、组织工程中生物材料表面的构筑	
结晶技术 .....	169	.....	236
一、影响蛋白质晶体生长的因素		第三节 骨组织工程的蛋白质支架	
.....	169	材料 .....	237
二、蛋白质晶体的形成 .....	170	一、支架材料的功能与作用 .....	238
第三节 蛋白质晶体生长的方法		二、骨组织工程要素与支架材料条件	
.....	170	.....	238
第四节 蛋白质晶体的初步鉴定和		三、支架材料的种类 .....	239
挑选 .....	172	四、支架的性能评价 .....	240
思考题 .....	172	第四节 不同蛋白质制备组织工程	
参考文献 .....	173	支架 .....	240
第十章 蛋白质工程酶 .....	174	一、羊毛角蛋白作组织工程支架材料	
第一节 进化工程酶 .....	174	.....	240
一、分子育种 .....	174	二、丝素蛋白作组织工程支架材料	
二、酶的体外定向进化 .....	175	.....	241
第二节 模块酶 .....	187	三、玉米醇溶蛋白作组织工程支架	
一、模块酶的概念 .....	187	材料 .....	242
		四、三维多孔支架的制备 .....	243

第五节 纳米纤维复合支架·····	244	六、未来的发展趋势·····	275
一、纳米纤维的生物学效应·····	245	思考题·····	276
二、纳米蛋白纤维种类·····	245	参考文献·····	276
三、纳米纤维支架材料的构建方法 ·····	246	<b>第十三章 荧光蛋白工程</b> ·····	277
四、纳米纤维支架的表面生物 功能修饰·····	248	第一节 绿色荧光蛋白·····	277
五、复合支架的制备·····	249	一、概述·····	277
六、聚乳酸复合支架的力学性能 ·····	251	二、绿色荧光蛋白发光原理·····	277
思考题·····	252	三、绿色荧光蛋白的用途与作用·····	279
参考文献·····	252	四、绿色荧光蛋白的改进·····	280
<b>第十二章 蛋白质芯片技术</b> ·····	253	第二节 红色荧光蛋白·····	281
第一节 概述·····	253	一、红色荧光蛋白发光原理·····	281
一、生物芯片·····	253	二、红色荧光蛋白的光谱多样性 ·····	282
二、蛋白质芯片·····	254	三、红色荧光蛋白来源的多样性 ·····	282
第二节 蛋白质芯片的组成、原理 及分类·····	257	四、红色荧光蛋白的改造·····	283
一、蛋白质芯片的基本构成·····	257	第三节 绿色荧光蛋白 HaloTag 技术·····	284
二、蛋白质芯片的原理·····	258	一、HaloTag 技术原理·····	285
三、蛋白质芯片的分类·····	259	二、应用与优势·····	286
第三节 蛋白质芯片的操作流程 ·····	263	三、与其他相关技术比较·····	287
一、蛋白质芯片的操作步骤·····	263	第四节 荧光蛋白技术的应用·····	288
二、蛋白质芯片的信号检测·····	266	一、绿色荧光蛋白的应用·····	288
三、蛋白质芯片的比较·····	267	二、红色荧光蛋白的应用·····	292
第四节 常用的蛋白质芯片·····	267	思考题·····	293
一、抗体芯片·····	267	参考文献·····	293
二、SPR 传感的蛋白质芯片·····	269	<b>第十四章 蛋白质基因改造的分子     设计</b> ·····	294
三、微流控芯片技术·····	270	第一节 概述·····	294
四、国内临床上应用芯片系统·····	271	一、发展中的蛋白质设计·····	294
第五节 蛋白质芯片的应用与发展 趋势·····	272	二、蛋白质设计的目的·····	295
一、蛋白质相关理论研究·····	272	三、蛋白质设计的原理·····	295
二、医学应用与研究·····	273	第二节 基于天然蛋白质结构的 分子设计·····	297
三、蛋白质芯片在食品分析中的 应用·····	274	一、设计前的准备·····	297
四、蛋白质芯片在毒理学中的应 用·····	275	二、蛋白质设计的途径与方法·····	299
五、蛋白质组芯片·····	275	三、蛋白质设计中的结构-功能 关系·····	301
		四、天然蛋白质的剪裁·····	306

第三节 全新蛋白质设计·····	307	第十六章 蛋白质分子印迹技术·····	345
一、全新蛋白质设计概述·····	307	第一节 分子印迹技术概述·····	345
二、蛋白质结构的从头设计·····	307	一、起源·····	345
三、蛋白质功能的从头设计·····	321	二、定义与原理·····	345
第四节 计算蛋白质设计·····	326	三、过程与作用·····	346
一、能量表达·····	326	四、印迹的分类·····	347
二、能量优化·····	326	第二节 蛋白质分子印迹方法·····	349
三、序列-结构专一性·····	327	一、包埋法·····	349
四、底物专一性设计·····	327	二、表面印迹聚合法·····	350
五、金属结合位点的设计·····	327	三、亲和印迹法·····	351
思考题·····	328	四、冷冻干燥法·····	351
参考文献·····	328	五、抗原决定基法·····	351
第十五章 蛋白质体外合成技术·····	329	六、金属离子介导法·····	351
第一节 概述·····	329	七、其他·····	351
一、蛋白质提取问题·····	329	第三节 蛋白质分子印迹的载体	
二、细胞表达蛋白存在的问题·····	329	·····	352
三、体外表达的简单过程·····	330	一、形式固定的硬质载体·····	352
四、体外表达的优势·····	330	二、形式可变的软质载体·····	355
五、体外翻译是基因组学迈向		三、其他含有类似载体的形式·····	355
蛋白质组学的桥梁·····	330	四、影响制备蛋白质印迹聚合物的	
第二节 无细胞体外表达系统体系		因素·····	357
·····	331	第四节 蛋白质分子印迹效率及	
一、原理·····	331	其评价·····	357
二、体外翻译酶系统·····	331	一、蛋白质分子印迹效率的概念	
三、能量供应系统·····	331	·····	357
四、保障遗传模板稳定性·····	332	二、蛋白质分子印迹效率的影响	
五、反应体系所需元素·····	333	因素·····	358
第三节 体外翻译的系统与操作		三、蛋白质分子印迹效率的评价	
·····	333	·····	358
一、两大翻译系统·····	333	第五节 蛋白质分子印迹技术的	
二、mRNA 的设计要求·····	337	应用与展望·····	359
三、启动过程·····	338	一、蛋白质分子印迹技术的应用	
四、具体操作方法·····	339	·····	359
第四节 体外表达产物·····	340	二、分子印迹技术的新进展和	
一、选择体外表达体系·····	340	新挑战·····	362
二、选择标记·····	341	三、分子印迹存在的问题·····	364
三、蛋白质检测与纯化·····	342	思考题·····	364
第五节 体外表达的应用领域·····	342	参考文献·····	364
思考题·····	344	第十七章 蛋白质生物传感器·····	365
参考文献·····	344	第一节 概述·····	365

一、概念 .....	365	曲线的制作 .....	378
二、原理 .....	365	第五节 适配子生物传感器.....	379
三、种类 .....	365	一、适配子的概念及其筛选原理	..... 379
四、应用 .....	366	二、适配子生物传感器 .....	384
第二节 固定化酶生物传感器.....	366	三、适配子的应用与展望 .....	390
一、基本原理 .....	367	第六节 表面等离子共振生物传感器	..... 394
二、固定酶的方法 .....	367	一、一种新的光学现象 .....	394
三、各种酶电极 .....	369	二、SPR 生物传感器的产生 .....	394
四、溶胶-凝胶固定法制备的生物		三、SPR 生物传感器的组成、原理与	
传感器 .....	372	构型 .....	394
第三节 实时光学蛋白质芯片生物		四、椭偏光学成像技术 .....	395
传感器.....	373	五、SPR 生物传感器的应用 .....	396
一、工作原理 .....	374	第七节 纳米技术在促进酶生物	
二、微流道反应器系统 .....	375	传感器方面的应用.....	396
三、量化测量 .....	376	一、纳米生物材料在生物传感器中的	
四、应用 .....	376	主要作用 .....	397
第四节 电化学酶免疫传感器.....	377	二、常见的纳米材料 .....	398
一、原理 .....	377	第八节 酶在非水相及有机相中的活	
二、电流式酶免疫传感器的制备		性与生物传感器发展趋势	
.....	377	.....	399
三、免疫传感器自组装过程中的		思考题.....	400
电化学特性 .....	377	参考文献.....	400
四、免疫传感器的响应特性 .....	378		
五、MPO 免疫传感器检测校准			

# 第一章 绪 论

## 第一节 蛋白质工程概论

蛋白质是生命的体现者，离开了蛋白质，生命将不复存在。蛋白质是构成组织细胞的主要材料，人的大脑、神经、皮肤、肌肉、内脏、血液，甚至指甲、头发都是以蛋白质为主要成分构成的。蛋白质的功能是构成组织与修补组织，这充分体现了蛋白质的重要性。蛋白质在生物界与非生物界的信息交流中起着关键的作用。

目前，蛋白质工程尚未有统一的定义。一般认为蛋白质工程就是通过基因重组技术改变或设计合成具有特定生物功能的蛋白质。因此，有学者称，蛋白质工程是第二代基因工程。其基本实施目标是运用基因工程的 DNA 重组技术，将克隆后的基因编码加以改造，或者人工组装成新的基因，再将上述基因通过载体引入挑选的宿主系统内进行表达，从而产生符合人类设计需要的“突变型”蛋白质分子。这种蛋白质分子只表达人类需要的性状。

实际上，蛋白质可以是一种营养品、一种致病源物质、一种治病良药、一种生产材料。它们各具有不同的结构和功能，应用于社会生产的不同方面。可是，生物体内存在的天然蛋白质，往往在不同领域的应用上不尽如人意，需要进行改造。由于蛋白质是由许多氨基酸按一定顺序连接而成的，每一种蛋白质有自己独特的氨基酸顺序，改变其中关键的氨基酸就能改变蛋白质的性质。由于蛋白质是两性电解质，每一种蛋白质有自己独特的 pH 和等电点，因此改变其中关键的氨基酸就能改变蛋白质所带电荷特性，进而改变蛋白质的性质。

蛋白质工程学是以蛋白质优质和高效生产的方法论为研究与创新的科学。从广义上来说，蛋白质工程应是以蛋白质为原材料，进行生产性为主的、建设性的、对蛋白质进行合理利用的过程。在这个过程中人们需要改造蛋白质，对蛋白质进行修饰与加工，通过物理、化学、生物如基因重组等技术改造蛋白质或设计合成具有特定功能的新蛋白质。

### 一、蛋白质工程的内涵

#### 1. 优质和高效生产的方法研究

蛋白质是生命的物质基础，没有蛋白质就没有生命。因此，它是与生命及与各种形式的生命活动紧密联系在一起的物质。对植物、动物组织进行大规模地高效率提取蛋白质，或者应用植物、动物细胞及原核细胞进行发酵培养，表达外源蛋白质，高效提取生产蛋白质药物，是工业蛋白质生产的工程改进过程。利用基因工程技术可使目标蛋白在体外进行表达。选择高效表达的优良体系是优质生产的重要手段。已知一种新的表达载体：可选择抗体的丝状噬菌体 fd 载体 (antibody-selectable filamentous fd phage vector)，它能将外源短肽表达并伸展到噬菌体的表面，可以用亲和筛选法筛选表达特异肽序列的噬菌体，通过测定噬菌体的 DNA 序列，就可以知道所表达的肽段的氨基酸序列。因此，通过改变蛋白质的生产方式，或者通过修饰生产符合要求的蛋白质，以及大量的生产，以满足社会对产品的要求。

## 2. 改良蛋白质的方法与技术体系研究

蛋白质的改造,从简单的物理、化学法到复杂的可调控生物合成、随机肽库、定位突变与基因重组等有多种方法。蛋白质工程的技术包括基因工程技术和非基因工程技术。非基因工程技术主要指蛋白质氨基酸序列的化学修饰、体外化学合成,以及组合体外合成与化学改性技术改良天然蛋白质或筛选非天然突变蛋白质及其大规模生产的技术,如大豆蛋白纺丝技术。

蛋白质中的氨基酸是由基因中的三联密码决定的,只要改变其中的一个或两个就可以改变氨基酸。通过改变某个位置的氨基酸,可以改进蛋白质的结构、稳定性或催化特性。利用基因的定点突变技术可以对外源基因进行改变,然后再表达突变后的产物,可用于研究蛋白质的结构与功能,筛选新的蛋白质。

## 3. 蛋白质改良中分子技术的应用

合理设计是蛋白质工程中使用的分子技术,而且现在也在广泛的使用。要达到此目的要做好3个方面的工作:①要用结晶学技术来获得蛋白质结晶体,然后利用X射线技术对晶体进行测量、分析,确定蛋白质的三维结构;②要借助计算机对蛋白质进行选择修饰,从氨基酸的化学结构预见空间结构,或者通过人工智能等其他方法来确定蛋白质和功能的关系,找到要修饰的位点;③通过对基因序列的了解,运用定点突变技术来进行碱基替换。通过此法可以改变蛋白质的功能,但要想获得理想的蛋白质工程产物往往要经过多次分析、替换才能达到目的。

定向进化是蛋白质工程的新策略,它是在不需要事先了解蛋白质的空间结构的情况下通过模拟自然进化机制,以改进的诱变技术结合确定进化方向的选择方法。定向进化实际就是随机突变加上选择,它与自然进化不同,整个过程都是在人为控制下进行的,并且还可以模拟真核细胞中DNA随机拼接这一蛋白质进化过程来加速蛋白质的优化。因此,它能解决合理设计所不能解决的问题,在工业生产中的应用越来越受到重视。

## 4. 蛋白质开发与应用新途径的研究

近年来,生物分子固定化技术一直是生物、化工、制药等领域研究的热点之一。固定化生物分子的种类繁多,由最初的蛋白质逐渐扩展到酶、多肽、氨基酸、DNA、RNA、抗体等具有生物活性的分子。随着微生物固定化技术地不断发展,各类新型生物传感器不断涌现,产生了微生物电极传感器。自聚集和基因工程又提供了对大量分子或集合体进行复杂控制和处理的方法。生物电子器件可提供更有价值的潜力。由于细菌视紫红质(bR)分子极好的物理和光学特性,变得稳定的bR质子成为高记录密度的磁记录介质的一个可替代记录介质。

# 二、广义蛋白质工程

广义蛋白质工程,实际上是广泛的蛋白质优质生产和高效利用的方法学研究,包括蛋白质的分离纯化技术,蛋白质结构和功能的分析、设计和预测,通过基因重组或其他手段改造或创造蛋白质,以及蛋白质分子识别和蛋白质光电特性利用工程等。

## 1. 蛋白质的分离纯化技术

蛋白质的分离纯化技术是用生物工程下游技术从混合物中分离纯化出所需要的目的蛋白质的方法。它是当代生物产业当中的核心技术,技术要求与成本都较高。例如,一个生物药品的成本75%都用于下游蛋白质分离纯化当中。因此,蛋白质的分离纯化技术依然需要改进与发展。其常用技术有:各种沉淀技术、各种电泳技术、透析技术、各种层析技术等。

## 2. 蛋白质结构和功能的分析

首先要测定蛋白质的一级结构,其次进行结构的物理测定。物理测定主要有: X 射线晶体学、核磁共振及冷冻电子显微学。除了核磁共振以外,还有一些生物化学技术被用于测定二级结构,包括圆二色谱。冷冻电子显微技术是近年来兴起的一种获得低分辨率(低于 5Å)蛋白质结构的方法。

## 3. 蛋白质结构和功能的设计和预测

当前蛋白质结构预测方法为比较建模法、折叠识别法、二级结构预测法和从头预测方法,前 3 项是基于已有知识,后一项是从头预测。按照其对模板的依赖与否主要分为两类:模板依赖模型(template-based modeling)和从头预测方法(ab initio)[或称自由模型(free modeling)]。模板依赖模型又可以分为两种模型:同源模型(或称比较模型)和折叠识别模型(又称穿线法)。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。

## 4. 通过基因重组改造或创造蛋白质

从预期的蛋白质功能出发→设计预期的蛋白质结构→推测应有的氨基酸序列→找到相对应的核糖核苷酸序列(RNA)→找到相对应的脱氧核糖核苷酸序列(DNA)。这是狭义的蛋白质工程,此后论述。

## 5. 蛋白质分子识别

分子印迹技术是制备具有分子识别能力聚合物的技术,由于具有构效预定性、特异识别性和广泛实用性三大特性,而在分离纯化、生物化学、生物药学及医学等许多领域具有广阔的应用前景。分子印迹技术(molecular imprinting, MIT)是指为获得在空间和结合位点上与目标分子(模板分子、印迹分子)完全匹配的聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)的制备技术。蛋白质印迹聚合物是一种人工模拟抗体,与生物抗体相比较,具有对高温、酸、碱耐受性强,在苛刻条件下可操作性及制作成本低、可重复使用等优点,目前已经在以下 3 个方面得到应用:①色谱分离;②抗体或受体模拟;③生物传感器。

## 6. 蛋白质光电特性利用工程

在信息时代的今天,数字化运算是信息处理的必要手段。用细菌视紫红质(简称菌紫质, bacteriorhodopsin, BR)膜进行光逻辑运算是目前研究热点之一。菌紫质具有一系列特殊的光电和光学特性。菌紫质具有光致变色响应特性,即菌紫质在进行光循环过程中处于不同的中间态时所呈现的颜色各不相同。菌紫质在接受光照后,电极两端会生成感应电动势或在外接电路中产生位移电流。经测定,光照后会产生正的瞬时脉冲电流,并逐渐降到稳定值。当光照停止后,又会产生负的脉冲电流,正、负光电信号同时随光照强度的变化而变化,这就是菌紫质的光电响应效应。科学工作者经过长年累月的实验、分析和总结,现已初步摸清了它的本质,其快速光致变色响应特性已达到秒级( $10^{-12}$ s)水平,空间分辨率极高,并且具有超常的耐热性,尤其让人青睐的是它易于大量制取且不需采取特殊的保存手段。

## 三、狭义蛋白质工程

狭义蛋白质工程,特指应用基因工程的方法获得蛋白质优质生产和高效利用的方法学研究。它是从预期的蛋白质功能出发→设计预期的蛋白质结构→推测应有的氨基酸序列→找到相对应的核糖核苷酸序列(RNA)→找到相对应的脱氧核糖核苷酸序列(DNA),进行基因工程研究与改进。



### 1. 定点突变技术

定点突变技术 (site-directed mutagenesis) 是在已知 DNA 序列中取代、插入或删除特定的核苷酸, 从而改变酶的结构中的个别氨基酸残基的技术。定点突变有的是改变特定的核苷酸, 有的则是对一段最可能影响酶的功能与性质的基因序列进行随机突变, 从而产生一系列突变酶分子。定点突变技术有多种方法, 如寡核苷酸引物介导的重组 PCR 定点突变法、限制性内切核酸酶酶切片段取代法、盒式突变法和化学全合成法等。定点突变是在已知酶的结构与功能的基础上, 有目的地改变酶的某一活性基团或模块, 从而产生新性状的酶, 故又称理性分子设计。

### 2. DNA 改组技术

DNA 改组技术 (DNA shuffling) 是体外同源重组的一种再组装 PCR 技术。它是将一群密切相关的序列, 在 DNase I 作用下, 随机酶切成许多片段, 这些小片段之间有部分重叠碱基序列, 通过自身引导 PCR (self-priming PCR), 使这些小片段重新组装成全长基因, 建立突变文库, 对突变文库进行筛选, 选择改良的突变体组成下一轮 DNA 改组的模板, 重复多次重排与筛选, 直到获得性状较为满意的突变体。

### 3. 体外定向进化技术

定向进化的主要目的是在短时间内, 获取想筛选的突变体, 即定向进化等于随机突变加高通量筛选。酶的体外定向进化 (direction evolution of enzyme *in vitro*), 又称分子进化 (molecular evolution), 就是在实验室模拟自然进化机制 (随机突变、重组和自然选择), 通过容错 PCR (error-prone PCR) 等方法, 对编码酶的基因进行随机诱变, 再通过高通量筛选或选择方法定向选择出性能更加优良的酶或创造出自然界所没有的而且具有优良性质的新酶。定向进化与定点突变的不同点是它不需要已知酶的结构信息, 因此该技术又称非理性设计。

## 四、蛋白质工程学与其他学科的关系

### 1. 工程学

工程学是研究自然科学应用在各行业中的应用方式、方法的一门学科, 同时也研究工程进行的一般规律, 并进行改良研究。它赋予了蛋白质工程学的工科性质及其研究的应用方式、方法。由此, 我们定义蛋白质工程学是研究蛋白质优质生产和高效利用的方式与方法的学科。

### 2. 基因工程

基因工程是通过基因操作把外源基因转入适当的生物体内, 并在其中进行表达, 它的产品还是该基因编码的天然存在的蛋白质。基因工程在原则上只能生产自然界已存在的蛋白质, 它们的结构和功能符合特定物种生存的需要, 却不一定完全符合人类生产和生活的需要。蛋白质工程就是根据蛋白质的精细结构与功能之间的关系, 利用基因工程的手段, 按照人类自身的需要, 定向地改造天然的蛋白质, 甚至创造新的、自然界本不存在的、具有优良特性的蛋白质分子。它的产品已不再是天然的蛋白质, 而是经过改造的、具有了人类所需要的优点的蛋白质。天然蛋白质都是通过漫长的进化过程而形成的, 而蛋白质工程对天然蛋白质的改造, 好比是在实验室里加快了进化的过程。蛋白质工程自诞生之日起, 就与基因工程密不可分。设计合成具有特定生物功能的全新的蛋白质, 是基因工程将蛋白质工程改进蛋白质的技术提高到了理想的境界。

### 3. 酶工程

酶是蛋白质当中的一类。蛋白质工程包含的范围比酶工程的范围广。酶工程是蛋白质工