

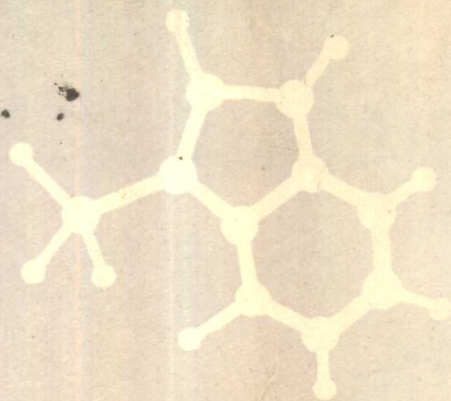
黑龙江教育出版社

HEILONGJIANG

JIAOYU

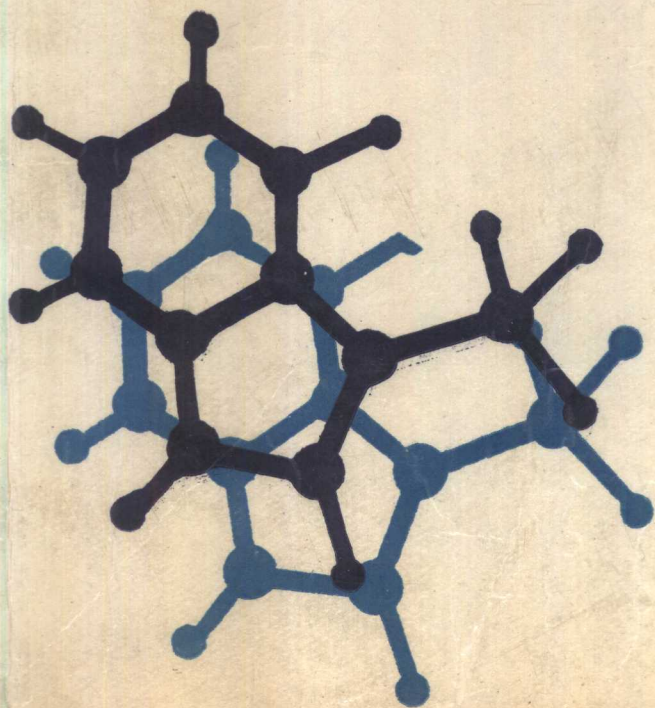
CHUBANSHE

王培之 主编



PROTEINENGINEERING

蛋白质工程



PROTEIN ENGINEERING

# 蛋白质工程

王培之 主编

江苏工业学院图书馆  
藏书章

(黑)新登字第5号

## 蛋 白 质 工 程

王培之 主 编

责任编辑：李秉千

封面设计：郑小鹏

---

黑龙江教育出版社出版（哈尔滨市道里九站街1号）  
哈尔滨龙华印刷厂印刷·黑龙江省新华书店发行  
开本787×1092毫米1/16·印张20.5·插页2·字数400千  
1991年12月第1版 1991年12月第1次印刷  
印数：1—1,006

---

ISBN 7-5316-1186-4/Q·1 定价：(精)11.00元(平)~~8.90元~~  
9.00

<b>主 编</b>	王培之	
<b>副主编</b>	鲁润龙	施建平
<b>编 委</b>	王培之	王林发
	王贤舜	冯佑民
	刘建宁	刘 兢
	朱德煦	毕汝昌
	陈常庆	施蕴渝
	施建平	崔 涛
	鲁润龙	潘仁瑞

## 序 言

蛋白质工程作为一个独立的学术领域是本世纪八十年代才出现的，它是基因工程、蛋白质结构和计算技术互补发展和渗透的结果。继七十年代基因工程兴起后，蛋白质工程的问世标志着人类不仅可以通过基因工程生产各种珍贵有用的蛋白质，而且还可以按照人类的意愿和需要改造已有的蛋白质，甚至设计和创造出自然界原来不存在的全新蛋白质。从进化的观点看，天然蛋白质的结构应该是最合理的，其性质也应该是最能适应环境要求的。但是，为了某一具体目的，现代医学和工业往往需要目的蛋白质具有新的结构和性质，而这些性质是天然蛋白质所不具备的。例如枯草杆菌蛋白酶第222位甲硫氨酸残基易被氧化而导致酶失活，用定点突变将此甲硫氨酸残基置换成丙氨酸或丝氨酸残基，则变体蛋白酶的抗氧化能力大大提高，因此已被作为洗涤剂中的添加剂而得以在工业生产中应用。用传统的技术如诱导突变或化学修饰，在一定程度上虽然也能达到改变蛋白质结构的目的，但却很难做到定向和完善，只有以蛋白质工程为手段才能为实现定向合理的改变蛋白质结构提供可能性。值得指出的是，蛋白质工程是研究蛋白质结构和功能之间关系的有效手段。特别是研究非共价作用力在蛋白质结构和功能中的作用，蛋白质工程更显示出威力，根据其空间结构酪氨酸tRNA合成酶与底物之间可能形成11对氢键，Fersht等将有关的氨基酸残基系统地置换并定量地研究了氢键对底物专一性和催化常数的影响，深入研究了结构和功能的关系，生动地说明了蛋白质工程作为研究手段的重要意义。

蛋白质工程的研究内容以蛋白质分子的精细三维结构为基础，通过分子设计和基因操作定向改造蛋白质或者设计出全新的蛋白质。目前X衍射单晶结构分析，二维核磁共振溶液构象分析，计算机图像显示和辅助设计，DNA重组技术在定位突变和盒式突变中的应用以及基因的化学合成在技术上都已趋成熟，面对无限的研究机会，在技术上可以说都是可以办到的，因此最重要的工作是提出正确的课题。

本书内容主要涉及：(1) 基因操作；(2) 蛋白结构分析；(3) 蛋白质功能的研究方法；(4) 蛋白质工程的应用。编写一个正在迅速发展的领域，作者势必会面临一个难题，即书中的某些部分在不久的将来就会过时，有鉴于此，我们把重点放在一般原理上和已成熟的方法上，而较少涉及个别体系的细节。我们希望本书不但对从事蛋白质工

程及其相关领域的工作者有所帮助，而且对选修蛋白质结构和基因工程课程的大学生和研究生也是一本有用的辅助读物。

1987年4月在国家科委领导下制定了我国生物技术领域高技术发展规划，蛋白质工程是规划中三个主题项目之一。两年来该计划正在顺利实施并取得了一批有意义的成果，同时建立了我国蛋白质工程的研究队伍。本书各章节的作者都是这支队伍中的成员，借此机会对我国高技术发展规划的成功致以良好的祝愿，并仅以本书作为对我国高技术发展规划的献礼。

朱德煦

1989年6月2日于南京大学

# 目 录

## 序 言

<b>第一章 总 论</b> .....	( 1 )
第一节 蛋白质工程的诞生 .....	( 1 )
第二节 蛋白质工程的研究途径及其主要环节 .....	( 3 )
第三节 蛋白质工程的工作定义及各类研究策略 .....	( 6 )
<b>第二章 蛋白质工程的主要研究方法——基因工程方法</b> .....	( 11 )
第一节 寡核苷酸片段及基因的人工合成 .....	11 )
1.1 寡聚DNA片段合成的历史和意义 .....	( 11 )
1.2 寡聚DNA的合成方法 .....	( 12 )
1.3 基因合成 .....	( 26 )
第二节 目的基因的克隆和分析 .....	( 49 )
2.1 克隆目的基因的策略及步骤 .....	( 49 )
2.2 源DNA 的制备 .....	( 50 )
2.3 基因库的构建 .....	( 53 )
2.4 筛选目的基因的方法 .....	( 57 )
2.5 目的基因的结构分析 .....	( 63 )
2.6 克隆目的基因实例分析 .....	( 64 )
第三节 目的基因的定位诱变和随机诱变 .....	( 69 )
3.1 定位诱变技术 .....	( 69 )
3.2 随机诱变 .....	( 73 )
第四节 目的基因的表达 .....	( 76 )
4.1 大肠杆菌表达目的基因的“载体—宿主”系统 .....	( 77 )
4.2 枯草杆菌表达外源基因的“载体—宿主”系统 .....	( 85 )
4.3 酵母细胞表达外源基因的“载体—宿主”系统 .....	( 88 )
4.4 高等真核细胞的外源基因表达系统 .....	( 89 )
<b>第三章 蛋白质工程的研究方法——蛋白质的纯化和鉴定</b> .....	( 91 )
第一节 盐 析 .....	( 91 )
1.1 盐析原理 .....	( 91 )

1.2	硫酸铵是盐析的最佳盐类	( 95 )
1.3	硫酸铵盐析	( 95 )
<b>第二节</b>	<b>脱 盐</b>	( 97 )
2.1	透析法	( 97 )
2.2	凝胶柱层析	( 97 )
<b>第三节</b>	<b>离子交换层析</b>	( 98 )
3.1	离子交换剂的类型	( 99 )
3.2	离子交换剂的吸附能力	( 101 )
3.3	各种离子交换适用的 pH 范围	( 102 )
3.4	缓冲液的选择	( 102 )
3.5	根据蛋白质的等电点来选择交换剂	( 104 )
3.6	柱的选择、交换剂处理、再生和保存	( 104 )
3.7	洗脱	( 105 )
3.8	脱盐和浓缩	( 106 )
<b>第四节</b>	<b>凝胶过滤层析</b>	( 106 )
4.1	凝胶的类别及使用范围	( 107 )
4.2	使用凝胶层析应注意的问题	( 108 )
<b>第五节</b>	<b>亲和层析</b>	( 110 )
5.1	供配基连接已活化的基质种类	( 110 )
5.2	免疫亲和层析	( 111 )
5.3	染料配基亲和层析	( 112 )
<b>第六节</b>	<b>蛋白质和酶的纯度鉴定</b>	( 114 )
6.1	电泳分析	( 114 )
6.2	不连续的盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳	( 115 )
<b>第四章</b>	<b>蛋白质工程研究方法——蛋白质结构的分析方法</b>	( 125 )
<b>第一节</b>	<b>蛋白质晶体学方法</b>	( 125 )
1.1	概 论	( 125 )
1.2	单晶衍射法原理	( 126 )
1.3	晶态蛋白质的结构分析	( 134 )
<b>第二节</b>	<b>二维核磁共振方法</b>	( 158 )
2.1	核磁共振波谱学基本概念	( 158 )
2.2	二维核磁共振波谱 (2DNMR) 基本原理	( 160 )
2.3	用二维核磁共振波谱方法测定蛋白质空间结构的主要方法	( 164 )
<b>第三节</b>	<b>蛋白质折叠的研究方法</b>	( 171 )
3.1	变复性过程的热力学与动力学研究	( 172 )



3.2	折叠中间体与折叠途径	( 177 )
<b>第四节</b>	<b>蛋白质的分子力学和分子动力学的研究</b>	( 180 )
4.1	分子力场	( 180 )
4.2	能量极小化方法	( 183 )
4.3	分子动力学方法	( 185 )
<b>第五节</b>	<b>蛋白质工程计算机辅助分子设计</b>	( 189 )
5.1	蛋白质空间结构预测	( 189 )
5.2	自由能的计算	( 192 )
<b>第六节</b>	<b>蛋白质的序列分析</b>	( 194 )
6.1	蛋白质序列分析发展概况	( 194 )
6.2	蛋白质序列分析在战术上的进展	( 195 )
6.3	蛋白质序列分析的战略	( 198 )
6.4	超微量蛋白质序列分析	( 198 )
<b>第五章</b>	<b>蛋白质工程的主要研究方法——蛋白质功能的研究方法</b>	( 205 )
<b>第一节</b>	<b>酶学方法</b>	( 205 )
1.1	稳态动力学	( 205 )
1.2	酶活性的测定与动力学常数的求算	( 211 )
1.3	前稳态动力学	( 214 )
<b>第二节</b>	<b>激素、生长因子和受体蛋白质的研究方法</b>	( 219 )
2.1	蛋白质和多肽激素功能的研究方法	( 220 )
2.2	多肽生长因子研究方法	( 238 )
2.3	受体蛋白质功能的研究方法	( 240 )
<b>第三节</b>	<b>免疫活性蛋白质功能的研究方法</b>	( 248 )
3.1	概况	( 248 )
3.2	抗体研究方法	( 249 )
3.3	淋巴细胞表面标志的研究方法	( 271 )
3.4	淋巴因子的研究方法	( 278 )
<b>第四节</b>	<b>核酸结合蛋白的研究方法</b>	( 283 )
4.1	核酸结合蛋白的“螺旋—转折—螺旋”结构	( 283 )
4.2	核酸结合蛋白的“锌指”结构	( 287 )
4.3	核酸结合蛋白的“亮氨酸拉链”结构	( 289 )
4.4	研究核酸结合蛋白质的几种方法	( 290 )
<b>第六章</b>	<b>蛋白质工程的应用和发展前景</b>	( 293 )
<b>第一节</b>	<b>蛋白质结构与功能的理论研究</b>	( 293 )
<b>第二节</b>	<b>实际应用</b>	( 301 )

2.1 工业用酶的改造.....	( 301 )
2.2 工业用酶的重建.....	( 317 )
<b>编后语</b> .....	<b>( 319 )</b>

# 第一章 总论

## 第一节 蛋白质工程的诞生

科学家研究和认识自然界的目的是，归根结底是为了掌握自然界发展的规律，从而能动地改造自然，造福人类。

长期以来，遗传学家梦寐以求的是，揭示生物遗传的奥秘，并且用他们已经掌握的生物遗传规律，定向地改良生物品种，或者甚至创造自然界所从未有过的生物新品种，以造福于人类。同样，分子生物学家梦寐以求的是，弄清生物大分子结构和功能的关系，并用他们已经掌握的生物大分子“结构—功能”的规律，定向地改良生物分子，或者甚至创造自然界所从未有过的新的生物分子，以造福于人类（图1.1）〔M. Mutter

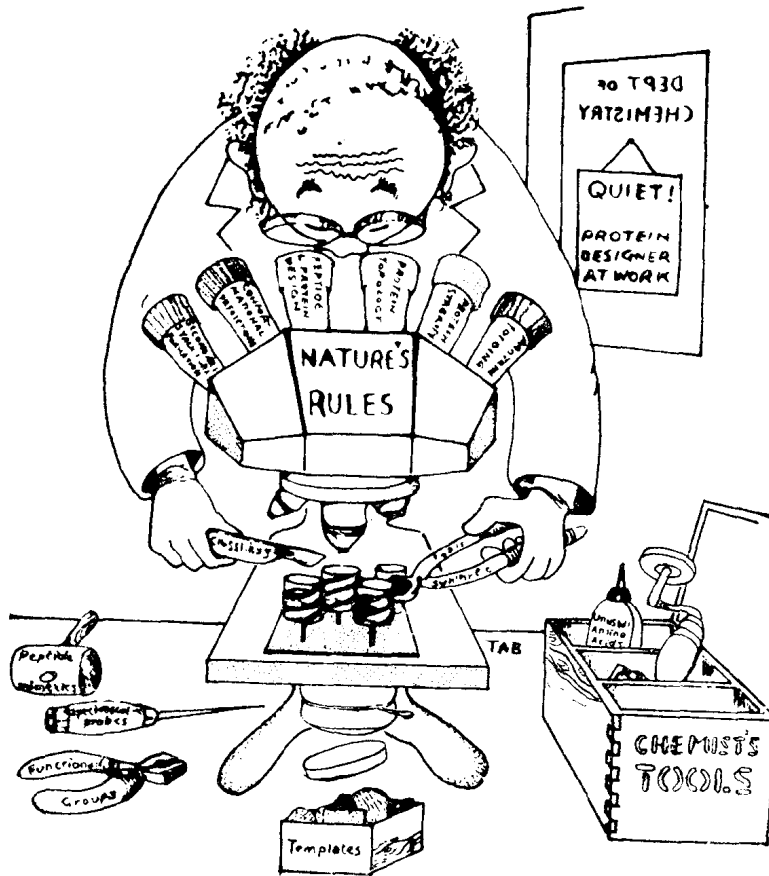


图 1.1

1988〕。尽管人类对自然的认识是无止境的，人类改造自然的能力也是逐步提高的，但最近几十年以来，由于生物科学理论和技术的迅速发展，使生物学家在定向改造或创造生物分子以及生物品种方面的能力，达到了一个新的飞跃。在分子遗传学，基因工程和蛋白质结构功能研究基础上发展起来的蛋白质工程，就是体现这种“新的飞跃”的一个重要方面。

人们早就知道，在催化化学反应方面，就其经济性、效率、以及用途的多样性而言，很难有其它化学物质能超过生物酶。酶已被用于人类生活的许多方面，包括：食品、饮料、医用药品、医疗诊断、化学工业以及洗涤剂的生产等。然而，这些由数百个氨基酸按一定的精确顺序连接起来而发挥作用的生物大分子的用途不是没有限制的。虽然天然酶已进化到了能适应于在生物体内发挥各种功能，但是在生物体外的条件下，特别是在粗放的工业条件下，例如高温、高压、机械力、重金属离子、有机溶剂、氧化剂、极端 pH 等，天然生物酶常常会遭到破坏，从而使生物酶的生产和使用受到很大的限制。虽然在世界市场上酶的销售已达每年六亿美元，但由于上述原因，近几年开始进展缓慢。因此，很自然地使人们想到能否用迅速发展的生物技术来改造天然酶，以得到有较好的耐受力、更高的效率、并能适应特殊工业过程的酶；或者甚至设计制造全新的人工酶或人工蛋白，以生产完全新型的医用药品、农业药物、工业用酶、以及生物电子设备的功能部件和天然酶不能催化的化学反应催化剂。此外还可以制造一些类似蛋白的氨基酸多聚物，这类多聚物在结构和功能方面将会比经典有机化学涉及的物质要优越得多。例如模仿天然羊毛、蚕丝、甚至蜘蛛丝设计的人工蛋白质纤维，有可能看起来很像天然纤维，但又具有超强度、重量轻、不易燃等特点。能适应上述要求的新的生物技术无疑就是“蛋白质工程”。〔J.B.Tucker 1985〕

由于解释了血红蛋白的结构功能而获诺贝尔奖金的 Max Perutz 博士说〔1985〕，在 1960 年末他曾出过一些关于未来应用分子生物学的考试题。其中有一个问题是要求应试者设计一个可以催化一种特异性有机反应的酶；另一个问题是要求他们设计一种酶的模板，使这种酶可以由三种特殊单体结合成一个多体，而且它们的序列是 1,2,3,1,2,3,……。何时我们才能真正回答这份试卷上提出的问题并付之实现呢？今天，迅速发展的生物技术，特别是遗传工程的发展和定位诱变方法的发明，已为我们解决上述问题提供了手段。但可惜的是我们在酶或者蛋白质结构功能方面的理论知识，现在却显得落后于我们的技术能力了，要真正像第一个问题提出的那样随意设计并制造一种新酶，实际上还是很难做到的。然而，通过氨基酸替换来对有些天然酶进行一些有限的改造的可能性还是存在的，特别是对某些结构功能相对比较清楚的酶来说，通过分子设计来改变它的某些特性，目前也已经开始能够做到了。从这个角度看，“蛋白质工程”在目前也还是可以进行的，而且实际上也已经取得了不少可喜的结果。

看来，随着生物理论和技术的发展，以及生产实践和生物科学研究的客观需要，科学家和实业家都觉得有必要也有可能对蛋白质工程进行研究和应用了。

那么，究竟什么是“蛋白质工程”呢？简单地说，就是运用蛋白质结构功能和分子遗传学方面的知识，从改变或合成基因入手，定向地改造天然蛋白质或者设计制造新的蛋白质。据说是由美国 GENE 公司的厄尔默 [Ulmer, K, 1983] 在 1981 年第一个把这种技术或方法命名为“蛋白质工程”，并且还在该公司建立了专门的研究部门，和制订了相应的研究计划。

美国斯坦福大学的 Charles Yanofsky 教授，在 1987 年的美国微生物学会的年会上说，生物理论和技术在下列九个方面的发展促成了蛋白质工程的诞生 [McCormick, 1987]：

- (1) 新的克隆技术，特别是完整的 cDNA 的克隆技术；
- (2) 快速测定 DNA 顺序的方法；
- (3) 从 DNA 顺序推算蛋白质顺序的较好的计算机程序系统；
- (4) 蛋白质顺序数据库的建立，使一级结构相似的蛋白能被很快地鉴定出来，并由此研究其功能上的相似性；
- (5) 对原核生物和真核生物基因表达调控的进一步深入了解；
- (6) 用于基因体外诱变的化学，酶学和合成技术的进展；
- (7) X 光晶体学的进展，包括较好的长晶体策略，同步辐射的应用，电子区域检测器的出现，以及计算机辅助的数据分析；
- (8) 用计算机图像系统为工具直接观察晶体数据；
- (9) 核磁共振技术的改进，使溶液中的原子分布能得到直接检测。

从他的综述中，我们可以看出：从第一到第六点，主要是和分子遗传学有关的理论和技术；从第七到第九点，主要是和蛋白质结构分析有关的理论和技术。但是，由于这两大类理论和技术本身又是借助于多学科的渗透而建立的，因此进行蛋白质工程的研究和应用时，也必须有多学科的合作。同时，蛋白质工程的发展不仅取决于分子遗传学和蛋白质结构功能研究的发展，而且还取决于其它有关学科的发展。因此，要求参加蛋白质工程的研究和应用的科学工作者不但要有较高的专业水平，而且还必须对蛋白质工程所涉及的其它学科有一定程度的了解，以便在工作中进行更好的协作和配合。这也正是我们编写本书的主要原因之一。

## 第二节 蛋白质工程的研究途径及其主要环节

由于上述一系列生物技术构成了蛋白质工程研究的主要环节，因此只要建立了这些

技术,就有可能对目的蛋白质进行设计和施工了。图(1.2)简示了进行蛋白质工程研究的全过程〔邹承鲁和雷克健1987〕,也就是在蛋白质结构与功能研究的基础上,借助于计算机图像显示和分子辅助设计,提出对目的蛋白分子的改建或构建方案,由于在一般情况下,蛋白质的空间结构信息主要隐含在它的氨基酸排列顺序中,而氨基酸的排列顺序又是由编码这个蛋白质的基因的核苷酸序列所决定的,因此只要按预定的目的蛋白分子的改建或构建方案,来修饰或构建编码目的蛋白的基因,并通过遗传工程途径,就可以获得所需的目的蛋白。如果要对工程蛋白进行进一步的修饰或改进,只要重复上述过程就可以了。

但是,和任何事物都有一个发展过程一样,蛋白质工程也有一个从建立到成熟的过程。正如 Yanofsky 教授在上述同一个报告中指出的那样,和蛋白质工程有关的一些学科的理论和技术,目前还存在不少问题和不足之处。他列举了下列几个方面:

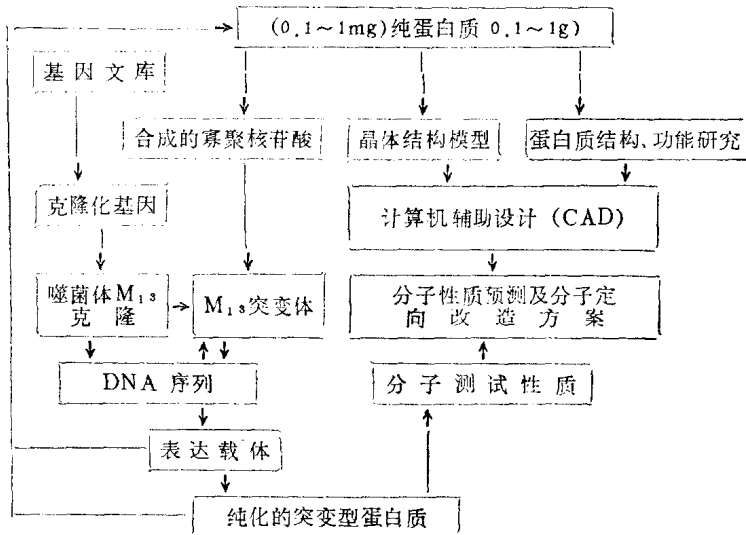


图 1.2 蛋白质工程的程序

分离纯化 0.1—1.0mg 目的蛋白质,并解析其部分肽段的一级结构。据此及编码原则设计并合成相应同位素标记寡核苷酸片段,以此从基因文库中分离编码该蛋白质的克隆化基因。转入噬菌体  $M_{13}$  系统,用双脱氧链端终止法完成其 DNA 序列分析,通过表达载体获得较多量 (0.1—1.0g) 该蛋白质。从晶体结构模型及结构与功能研究出发,借助计算机辅助分子设计,提出分子预期性质及改造方案。通过合成寡核苷酸— $M_{13}$  系统定位突变,并分离其突变体,引入表达载体生产并纯化多量突变型蛋白,分析并测试其性质,再指导进一步分子设计以最终获得所预期性质的分子。

- (1) 还不能准确地从蛋白质的一级结构推测它的空间结构;
- (2) 对区域可变性以及分子内动力学与蛋白功能之间的关系了解不够;
- (3) 对酶和底物的结合及其催化机制的了解还不够;

- (4) 还需要更有效的 cDNA 克隆技术；
- (5) 需要能使蛋白质更好地摺叠成天然状态的技术；
- (6) 需要更好地了解蛋白质的翻译后修饰；
- (7) 定位诱变技术尚需进一步改进；
- (8) 晶体学研究至今还是过分依赖于长成好的晶体结构这一环节的成败；
- (9) 对于一个蛋白质在晶体、溶液和细胞中呈现的不同状态，仍然了解甚微。

这里既有分子遗传学和基因工程方面的理论和技术问题，又有蛋白质结构功能研究方面的理论和技术问题。但总的来看，后者的问题更突出，是目前开展蛋白质工程研究和应用的主要限制因素。

但是，一方面，生产实践迫切需要运用蛋白质工程这样的方法，来改良或者构建符合工农医等各种需要的蛋白质制品；另一方面，即使在目前蛋白质工程还很不成熟的情况下，运用蛋白质工程于蛋白质制品，特别是酶制品的改良，所取得的成绩已经是十分令人神往的了。例如经过蛋白质工程改造的  $\alpha$ -淀粉酶居然能耐 160℃ 的高温，这给食品工业带来的好处是不言而喻的；最突出的例子是枯草杆菌碱性蛋白酶的蛋白质工程，到目前为止已取得了一系列具有新的特性的酶，其中有耐碱的，耐热的，以及抗氧化的等各种新型的碱性蛋白酶。这些酶除了在用作洗涤剂的添加剂时有特殊的功效以外，而且能在工业上降低生产成本，扩大产品的使用范围。现在，上述一系列具有新的特性的枯草杆菌碱性蛋白酶，已成为世界上第一批获得专利的、经过蛋白质工程改造所取得的新酶（图 1.3）〔Biotechnology 1987〕。同时，由于蛋白质工程本身又是研究蛋白质结构功能的一种强有力的工具，它在解决生物理论问题方面所起的作用，到目前为止已足以和任何重大的生物研究方法相提并论。基于上述理由，蛋白质工程不仅受到了各方面的重视，而且被认为已经很快地成为当代主流科学的一个组成部分〔Moffat, A.S., 1988〕。

### 工程酶获得专利

首批工程酶将获得专利。Gene cor 得到的枯草杆菌蛋白酶的 32, 33, 64, 104, 155, 157, 166, 169, 189, 217, 222 之突变酶将获得专利。Jonathan MacQuity (Gene cor 的副总裁) 任何氨基酸的取代物都将受到专利的保护。

枯草杆菌蛋白酶是一种丝氨酸蛋白酶，并且是一种广谱的水解酶。Genecor 的科学家利用定位突变的方法改变了酶的 pH 范围，热稳定性底物专一性，甚至反应类型。某些突变型大大提高了酶的催化速率，另外一些则对一些新的底物具有很高的催化效率。MacQuity 说枯草杆菌蛋白酶是第一批获得专利的，经过蛋白质工程改造所取得的新酶。

美国“生物技术”杂志上有关枯草杆菌蛋白酶的蛋白质工程产物获得专利的报道(译文)。

### 第三节 蛋白质工程的工作定义及各类研究策略

正因为生产实践和理论研究迫切需要运用蛋白质工程这样的方法，而这个方法的某些方面，特别是蛋白质结构功能研究方面，在目前，甚至在以后相当长的一段时间内，还不能达到十分成熟的地步，所以在实际运用的时候，科学工作者就会很自然地想到用一些其它的生物学方法和策略来弥补，或者改善上述种种不足之处，并且由此总结出所谓“广义的蛋白质工程”，或者叫做“蛋白质工程的工作定义”，来指导研究工作和实际应用，而不是拘泥于所谓“严格的”蛋白质工程定义〔Wetzel, R., 1986〕。这样做的结果，不仅扩大了蛋白质工程的使用范围，而且使有些原来在目前还无法用蛋白质工程方法解决的问题，得到了较快和较好的解决。

R. Wetzel (1986)在“什么是蛋白质工程？”一文中，把广义的蛋白质工程方法中的研究策略概括成四大类。下面我们就对这些方法作一些简单的介绍和说明：

第一类是在某些蛋白质或多肽的部分功能，可以由相应的一级结构所决定的情况下，建立起应用蛋白质工程方法的系统。

现代的蛋白质结构理论告诉我们，有些蛋白质的立体结构，实际上是由一些结构元件组装起来的，而且它们的各种功能也是和这些结构元件相对应的。

因此，如果我们想通过对这些蛋白质的功能元件进行分解或重组，来获得具有单一或复合功能的新的蛋白质，就可以用“分子剪裁”的方法来实现，也就是对这些蛋白的功能元件相应的一级结构进行分解或重组，而不需要从空间结构的角度进行考虑。蛋白质的这种结构功能组织形式，很可能也是由蛋白质进化的一种方式所决定的，也就是生物在进化过程中也可以通过蛋白质功能元件的重新组合，来获得具有适应环境需要的新的功能的蛋白质。因此，对于已经获得基因的蛋白质来说，就可以用基因重组(剪裁)的方法来实现蛋白质功能元件的重组。由于有了基因定位诱变方法，就可以根据“中性突变”的原理(利用大多数氨基酸都有几种DNA编码的情况，可以改变DNA顺序而不改变编码的氨基酸)很容易地把为蛋白质结构元件编码的DNA顺序两端，修饰成限制性内切酶位点，但又不改变原来的氨基酸顺序，从而方便地对有关的基因编码顺序进行分解或重组，以达到对蛋白质“结构—功能”区域分解或重组的目的。

英国剑桥大学的 Winter 在抗体分子上作了这样的试验。抗体分子是由两条重链和两条轻链组成的。重链有四个结构域，轻链有二个结构域。抗体分子上识别抗原的高度可变区，是由重链和轻链的 N' - 端的结构域所组成的，而且抗体或抗原互补的决定子是由可变区的一些环状肽段组成的。Winter 等用上述基因操作方法，把人抗体分子重链上的抗原互补决定子换成小鼠的。结果，原来那个小鼠单抗分子所具备的抗原结合专一性，确



实被转移到人的抗体分子上了。这个实验在医学上是很重要的，因为小鼠的单抗虽然比人的单抗容易制备，但在医学上最好还是使用人的单抗。因此，现在就可以如上述那样先制备小鼠单抗，然后再把它的互补决定子转移到人的普通抗体分子上，使之和人的单抗具有同样的效果。

还有一些蛋白质，它们的某些功能或特性，仅仅是由它们一级结构中的某些氨基酸残基侧链的化学特性所决定的。因此就有可能通过改变或者消除这些侧链来改变它们的有关功能或特性，一般来说，也不需要以空间结构为基础进行分子设计。但是，当这些残基的改变从空间结构上影响到其它有关功能时，就必须对用于取代的残基进行仔细的选择或者筛选了。这方面的典型例子，就是对枯草杆菌蛋白酶氧化稳定性的改造 [Estell, D. A. et al. 1985]。已知枯草杆菌蛋白酶的氧化不稳定性，是由于有一个容易被氧化的甲硫氨酸残基，位于靠近活性中心的 222 位。分别用其它十九种氨基酸替换这个残基的结果表明，大部分突变型酶的氧化稳定性是得到了明显的提高，但它们的活力都有不同程度的降低，而且那些看来和甲硫氨酸比较相似的氨基酸被用于替换的结果，酶活力降低得反而更加明显。因此，对这类蛋白的改造，往往还需要经过仔细的分子设计或者全面筛选，才能实施。

第二类是在目的条件下对随机诱变基因库进行定向的筛选和选择。这种方法的前提是必须有一个对目的基因表型的高效检测筛选系统。

正如前面所述，由于目前我们对很多蛋白质的结构功能关系的认识还很不够，还很难按照预定的目标进行分子设计。对于这些蛋白质来说，在目前就不能用“严格”定义的蛋白质工程方法来进行分子改造。但是，由于近几年来在基因操作技术中，已建立了对限定的 DNA 顺序在体外进行随机诱变的方法，也就是可以对目的基因或其某个区域在体外进行随机诱变（这和涉及整个细胞的经典随机诱变方法有本质的区别），因此只要能对经诱变所得的突变型基因表达的突变型蛋白质，在预定的条件下进行高效的检测和筛选，就有可能获得具有预期特性的新的蛋白质。

例如，Liao 等（1986）把经过随机诱变的抗卡那霉素酶的基因转入嗜热杆菌中，然后在高温中筛选能在含有卡那霉素培养皿上生长的转化子，结果获得了耐热的抗卡那霉素酶。

又如：枯草杆菌蛋白酶是一类芽孢杆菌的胞外碱性蛋白酶，只要在培养基中加入脱脂牛奶，就可以通过观察培养皿上蛋白水解圈的有无或大小，来筛选蛋白酶基因阳性或表达强弱的菌落。只要进一步把从菌落分泌到培养基中的蛋白酶，转移到一种带有蛋白酶活力指示剂的薄膜上，就可以在目的条件（例如高温、极端 pH、有机溶剂、氧化剂等）下进行酶反应，从而筛选出在目的条件下具有高活力的蛋白酶及其相应的菌落。然后通过测定相应的蛋白酶基因的 DNA 顺序，来定出基因上的突变位点。到目前为止，