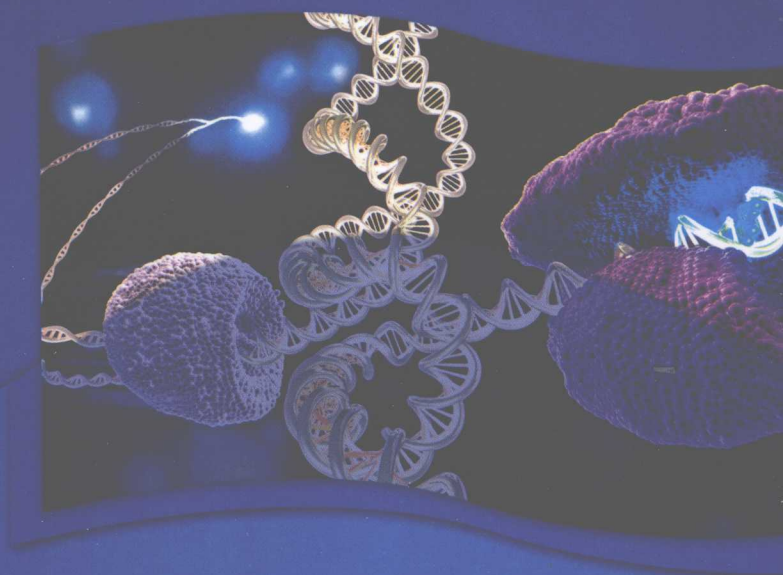




普通高等教育“十一五”规划教材

# 蛋白质工程

汪世华 主编



科学出版社

[www.sciencep.com](http://www.sciencep.com)

Warren DS, Cooper M, et al. 2004. Plasmapheresis, CMV hyperimmune globulin, and CD20 allow ABO-incompatible renal transplantation without splenectomy. *Am J Transpl*; 4 (8): 1315-1322

Worm U, Lalowski M, et al. 2005. A human protein-protein interaction network for annotating the proteome. *Cell*; 122 (6): 957-968

### 普通高等教育“十一五”规划教材

DNA shuffling. *Nature*; 370 (6901): 108-114

Design of a monomeric 23-residue polypeptide of compact, independent structure. *Nature*; 386 (6633): 653-657

# 蛋白质工程

Shen Y, Wang J, et al. 2005. Engineering for catalytic antibodies. *EUR J Biochem*; 261 (1): 108-114

汪世华 主编

Takai N, Jain A, Kawamata N, et al. 2005. A monoclonal antibody against HER2 suppresses the HER kinase signaling pathway. *Cancer Res*; 65 (12): 2701-2707

Thomas PQ, Neil BT, Robert WW, et al. 2005. Rational design, synthesis, and characterization of a 3-sandwich protein. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102 (18): 6374-6379

Tornschy A, Brugger R, Lehmann M, et al. 2002. Engineering of phytase for improved activity. *Enzyme Microb Technol*; 31 (1): 1-8

Tramontano A, Janda R, et al. 2005. Antibody engineering. *Science*; 308 (5718): 105-112

Tyden A, Kuehli A, Ehrman J, et al. 2005. Antibody engineering for kidney transplantation. *Transplantation*; 79 (6): 730-731

Vialard J, Lalumiere M, Verret T, et al. 1990. Synthesis of the membrane fusion and hemagglutinin proteins of measles virus, using a novel baculovirus vector containing the beta-galactosidase gene. *J Virol*; 64: 37-50

Vieira CA, Agarwal A, Book HK, et al. 2004. Rituximab for reduction of anti-HLA antibodies in patients awaiting renal transplantation; 1. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics. *Transplantation*; 77 (4): 542-548

Walsh G. 2005. 蛋白质生物化学与生物技术. 王恒等译. 北京: 化学工业出版社

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, et al. 1995. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*; 13: 1-52

Wisching P, Ashley J A, et al. 1995. Reactive immunisation. *Science*; 270: 1775-1781

Wissel MS, Bischoff N, et al. 2006. Guanidinium derivatives bind preferentially to long-distance conformations in an engineered T4 lysozyme. *Protein Sci*; 15 (12): 2581-2591

Wu H, Lu H, et al. 2004. A novel exposed domain in the severe acute respiratory syndrome virus spike protein induces neutralizing antibodies. *J Virol*; 78 (15): 7217-7225

Zhang XE, Liu H, et al. 2001. Construction of a fusion enzyme system for protein-protein molecular recognition element for a sequence biosensor. *Bioconjugate Chem*; 12 (1): 100-108

## 科学出版社

北京 100070

（邮购） 电话：010-64015000 网址：www.sciencep.com

## 内 容 简 介

本书在介绍蛋白质工程基本内容的同时,兼顾学科发展动态,着重介绍蛋白质分子基础、蛋白质分子设计、蛋白质的修饰和表达以及蛋白质的理化性质、结构测定和应用等,还对生物信息学和现代生物技术 in 蛋白质工程上的应用、蛋白质的分离纯化与鉴定作了介绍。

本书既可作为高等院校生物工程、生物科学、生物技术及相关专业的本科生教材,也适于相关专业研究生、教师和科研人员参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

蛋白质工程/汪世华主编. —北京:科学出版社,2008  
普通高等教育“十一五”规划教材  
ISBN 978-7-03-020812-5

I. 蛋… II. 汪… III. 蛋白质-生物工程-高等学校-教材 IV. TQ93

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 013229 号

责任编辑:甄文全 / 责任校对:张 琪  
责任印制:张克忠 / 封面设计:耕者设计工作室

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>

丽源印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2008 年 2 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2008 年 2 月第一次印刷 印张:20 3/4

印数:1—4 000 字数:554 000

定价:35.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈路通〉)

## 编委会名单

主 编 汪世华

副 主 编 周亚凤 毕利军 林善枝

编写人员 (以姓氏汉语拼音排序)

毕利军 陈 佳 董艳杰 刁 苗 范海延

郭永超 黄碧芳 黄加栋 黄友谊 焦航宇

李永进 连惠芾 刘华伟 刘丽华 刘晓雷

林 玲 林善枝 林志伟 苏国成 汪世华

王 磊 王荣智 王新军 肖莉杰 徐 虹

薛李春 杨 新 杨燕凌 游 凡 张 成

张 峰 张鸿泰 张吉斌 张建斌 张少斌

张 薇 张晓鹏 郑嘉熙 周亚凤

## 前 言

蛋白质工程是随着生物化学、分子生物学、结构生物学、晶体学和计算机技术等迅猛发展而诞生的，也与基因组学、蛋白质组学、生物信息学等的发展密切相关。蛋白质工程诞生于20世纪80年代，基因工程的诞生以及80年代分子生物学和分子遗传学的发展为基因的修饰和改造提供了重要的工具，蛋白质工程也就应运而生了。蛋白质工程在带动生物工程的进一步发展并推动与生产、生活关系密切的相关科学的发展方面有着广阔的应用前景。

蛋白质是生命的基础物质之一，在生物体中起着至关重要的作用。基因工程的研究与开发是以DNA为内容的。对DNA的研究与开发促进了另一个生物大分子即蛋白质的研究与开发，从而促使了蛋白质工程的产生。蛋白质工程在诞生之日起就与基因工程密不可分。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，它的产品是该基因编码的天然蛋白质。蛋白质工程则更进一步根据分子设计的方案，改造天然蛋白质以适应人类的需要，它的产品是经过改造的更加符合人类需要的蛋白质。

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。从广义上来说，蛋白质工程是通过物理、化学、生物和基因重组等技术改造蛋白质或设计合成具有特定功能的新蛋白质。蛋白质工程主要有两个方面的内容：根据需要合成具有特定氨基酸序列和空间结构的蛋白质，确定蛋白质化学组成、空间结构与生物功能之间的关系。在此基础之上，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的蛋白质，这也是蛋白质工程最根本的目标之一。

结构生物学尤其是结构基因组学近年来正迅速崛起，生命科学与技术也正酝酿着新的突破，一个全新的世纪将展现在我们面前。基因组学、蛋白质工程、生物信息学等学科的发展将使人类从分子水平上真正认识生、老、病、死。蛋白质工程是这个链条中的关键一环，对一些基本生物学问题的研究解决，以及结合基因工程改造天然蛋白质，制造全新的蛋白质等，都必将大有作为。

本教材作为生命科学本科生通用教材，在介绍蛋白质工程基本内容的同时，兼顾学科发展动向，着重涉及当今蛋白质工程的应用。内容不仅包括蛋白质分子基础、蛋白质分子设计、蛋白质的修饰和表达以及蛋白质的理化性

质、结构测定和应用等，还对生物信息学和现代生物技术 在蛋白质工程上的应用、蛋白质的分离纯化与鉴定作了介绍。旨在使本科生了解现代蛋白质工程理论的新进展并为相关学科提供知识和技术。

全书共分十章。绪论部分由汪世华编写，林善枝审稿；第一章介绍蛋白质的基本结构，由徐虹编写，汪世华审稿；第二章介绍蛋白质分子设计，由黄友谊编写，李永进审稿；第三章介绍蛋白质分子修饰和表达，由周亚凤、郭永超编写，李永进审稿；第四章主要介绍蛋白质的物理化学性质，由黄加栋、张建斌编写，王新军审稿；第五章介绍测定蛋白质结构的主要方法，由陈佳、汪世华编写，薛李春审稿；第六章介绍生物信息学在蛋白质工程中的应用，由刘华伟、黄碧芳编写，汪世华审稿；第七章对蛋白质的分离纯化与鉴定方法作了介绍，由张少斌编写，苏国成审稿；第八章介绍了现代生物技术在蛋白质工程中的应用，由张吉斌编写，董艳杰审稿；第九章对蛋白质组学作了介绍，由毕利军、张鸿泰编写，李永进审稿；第十章介绍蛋白质工程的应用情况，由肖莉杰编写，游凡审稿。同时杨燕凌、刘丽华、王荣智、林玲、林志伟、刁苗、连惠芾、张峰、张成、张薇、杨新、刘晓雷、张晓鹏、王磊、焦航宇、郑嘉熙在图表绘制、文字校对和排版方面作了大量的工作。

由于蛋白质工程学科的边缘性，所包含内容没有统一的结论，以及编者水平有限，书中难免有疏漏之处，敬请广大读者批评指正。

编者

2007年11月于福州

## 目 录

## 前言

绪论	1
一、蛋白质工程的物质基础	1
二、蛋白质工程的原理	2
三、蛋白质工程的程序 and 操作方法	3
四、蛋白质工程的产生与发展	3
五、蛋白质工程的应用领域	6
第一章 蛋白质结构基础	9
第一节 蛋白质的功能及其应用	9
一、蛋白质的生物学功能	9
二、蛋白质类大分子的应用	11
第二节 蛋白质氨基酸与多肽链	11
一、常见蛋白质氨基酸的结构特征	12
二、蛋白质氨基酸的分类	13
三、肽和多肽链	16
第三节 蛋白质的空间结构	21
一、一级结构	21
二、二级结构	21
三、超二级结构	26
四、结构域	29
五、三级结构	32
六、四级结构	33
七、维持蛋白质空间构象的作用力	34
八、研究蛋白质空间构象的技术和方法	35
第四节 蛋白质结构与功能的关系	36
一、氨基酸序列决定蛋白质的结构与功能	36
二、蛋白质的空间结构与功能的关系	36
三、蛋白质间的相互作用与特殊结构	37
四、参与蛋白质与 DNA 分子间相互作用的结构域	39
五、蛋白质的变性与复性	40
第五节 多肽链的折叠	41
一、第二遗传密码	41
二、帮助折叠的蛋白质和酶	42
三、蛋白质的去折叠	43

四、蛋白质的错误折叠 .....	44
思考题 .....	45
<b>第二章 蛋白质分子设计</b> .....	46
<b>第一节 蛋白质分子设计原理</b> .....	46
一、蛋白质分子设计的分类 .....	46
二、蛋白质分子设计的基础 .....	47
三、蛋白质分子设计的原则 .....	50
四、蛋白质分子设计的程序 .....	52
<b>第二节 基于天然蛋白质结构的分子设计</b> .....	54
一、定位突变 .....	54
二、蛋白质分子拼接 .....	59
<b>第三节 全新蛋白质设计</b> .....	59
一、全新蛋白质设计方法 .....	59
二、蛋白质结构的从头设计 .....	62
三、蛋白质功能的从头设计 .....	66
四、全新蛋白质分子设计的展望 .....	67
思考题 .....	68
<b>第三章 蛋白质的修饰和表达</b> .....	69
<b>第一节 蛋白质的化学修饰</b> .....	69
一、蛋白质侧链基团的化学修饰 .....	69
二、蛋白质的位点专一性修饰 .....	72
三、蛋白质的聚乙二醇修饰 .....	73
四、蛋白质的化学交联和化学偶联 .....	73
<b>第二节 蛋白质的分子生物学改造</b> .....	76
一、基因突变技术 .....	76
二、基因融合 .....	82
<b>第三节 重组蛋白质的表达</b> .....	86
一、目标蛋白质在大肠杆菌中的表达 .....	86
二、目标蛋白质在酵母细胞中的表达 .....	91
三、昆虫杆状病毒表达系统 .....	96
四、哺乳动物细胞表达系统 .....	98
五、体外翻译系统 .....	99
思考题 .....	100
<b>第四章 蛋白质的物理化学性质</b> .....	102
<b>第一节 热力学函数与蛋白质构象</b> .....	102
一、热力学函数与热力学平衡 .....	102
二、热容量 .....	103
三、van't Hoff 焓 .....	103
四、蛋白质构象与热运动 .....	104



100	五、热力学参数在分子水平上的解释	104
100	六、折叠/退折叠转变	110
100	第二节 突变、稳定性和折叠	111
100	一、体外突变技术	112
100	二、突变与热稳定性	114
100	三、蛋白质折叠	116
100	第三节 蛋白质折叠热力学与动力学	120
100	一、蛋白质折叠的热力学研究	121
100	二、蛋白质折叠的动力学研究	126
100	思考题	131
100	<b>第五章 蛋白质结构解析</b>	132
100	第一节 X 射线晶体结构分析	132
100	一、X 射线晶体结构分析发展史	132
100	二、X 射线晶体结构分析基本原理	133
100	三、蛋白质 X 射线晶体结构测定程序	134
100	第二节 核磁共振波谱的溶液结构解析	142
100	一、概述	142
100	二、核磁共振方法测定蛋白质结构的实验技术	146
100	三、核磁共振波谱综合解析	150
100	四、核磁共振技术的发展和应	152
100	第三节 蛋白质结构测定的其他方法	152
100	一、现代光谱技术	153
100	二、三维电镜重构法	157
100	三、动力学全精研究技术	158
100	思考题	158
100	<b>第六章 生物信息学在蛋白质工程中的应用</b>	159
100	第一节 生物信息学与蛋白质工程	159
100	一、生物信息学概述	159
100	二、生物信息学与蛋白质工程	162
100	三、生物信息学与蛋白质组学	163
100	第二节 蛋白质常用数据库	163
100	一、核酸数据库	165
100	二、蛋白质数据库	170
100	第三节 蛋白质结构预测	183
100	一、蛋白质序列比对	183
100	二、蛋白质基本性质分析	186
100	三、蛋白质二级结构预测	187
100	四、蛋白质结构预测实例	189
100	思考题	198

<b>第七章 蛋白质的分离纯化与鉴定</b> .....	199
<b>第一节 蛋白质的分离纯化概述</b> .....	199
<b>第二节 蛋白质的提取</b> .....	201
<b>第三节 蛋白质粗分级</b> .....	203
一、硫酸铵分级沉淀.....	203
二、有机溶剂分级沉淀.....	204
三、超速离心法.....	205
四、等电点沉淀法.....	205
五、透析法.....	206
六、超滤法.....	207
七、结晶法.....	207
八、其他方法.....	208
九、蛋白质粗分级举例.....	208
<b>第四节 蛋白质细分级</b> .....	209
一、分子筛层析.....	209
二、离子交换层析.....	215
三、吸附层析.....	217
四、亲和层析.....	218
五、电泳.....	219
六、其他技术.....	223
七、蛋白质细分级举例.....	224
<b>第五节 蛋白质的鉴定</b> .....	225
一、蛋白质含量测定.....	225
二、蛋白质鉴定.....	226
<b>思考题</b> .....	231
<b>第八章 现代生物学技术在蛋白质工程中的应用</b> .....	232
<b>第一节 蛋白质分析鉴定技术</b> .....	232
一、蛋白质芯片技术.....	232
二、蛋白指纹图谱技术.....	236
<b>第二节 研究蛋白相互作用技术</b> .....	237
一、表面等离子体共振技术.....	237
二、酵母双杂交技术.....	238
<b>第三节 表面展示技术</b> .....	240
一、噬菌体展示技术.....	241
二、核糖体展示技术与 mRNA 展示技术.....	243
三、细菌表面展示技术.....	245
四、酵母表面展示技术.....	246
<b>第四节 其他新蛋白质工程技术</b> .....	248
一、原子力显微镜技术.....	248

二、蛋白质打靶技术 .....	250
三、蛋白质分子印迹技术 .....	250
四、蛋白质截短技术 .....	254
五、蛋白质错误折叠循环扩增技术 .....	254
思考题 .....	255
<b>第九章 蛋白质组学</b> .....	<b>256</b>
<b>第一节 概述</b> .....	<b>256</b>
一、蛋白质组的概念及发展简史 .....	256
二、蛋白质组学研究的思路与策略 .....	259
<b>第二节 蛋白质组学的研究内容</b> .....	<b>260</b>
一、蛋白质组学的研究内容 .....	260
二、蛋白质组学的难点 .....	262
<b>第三节 蛋白质组学研究的技术方法</b> .....	<b>263</b>
一、蛋白质分离技术 .....	264
二、蛋白质分析和鉴定技术 .....	266
<b>第四节 蛋白质组学的应用与发展趋势</b> .....	<b>273</b>
一、蛋白质组学的应用 .....	274
二、蛋白质组学的研究现状及发展趋势 .....	278
思考题 .....	281
<b>第十章 蛋白质工程的应用</b> .....	<b>282</b>
<b>第一节 抗体工程</b> .....	<b>282</b>
一、概述 .....	282
二、抗体的结构与分类 .....	282
三、抗体融合蛋白 .....	286
四、抗体的应用 .....	290
<b>第二节 酶的蛋白质工程</b> .....	<b>294</b>
一、枯草杆菌蛋白酶 .....	294
二、木糖异构酶 .....	297
三、植酸酶 .....	299
四、溶菌酶 .....	301
五、其他酶 .....	302
<b>第三节 抗体酶</b> .....	<b>304</b>
一、抗体酶的作用机理 .....	304
二、抗体酶的制备 .....	306
三、抗体酶的应用 .....	309
思考题 .....	312
<b>主要参考文献</b> .....	<b>314</b>

## 绪 论

20 世纪 80 年代初,美国 GENE 公司的 Ulmer 博士在 *Science* 上发表了以“Protein Engineering”为题的专论,首次明确提出蛋白质工程的概念,标志着蛋白质工程的诞生。迄今为止,蛋白质工程仍没有一个明确的定义,就其研究内容来说,蛋白质工程是在生物化学、分子生物学、分子遗传学等学科的基础之上,融合了蛋白质晶体学、蛋白质动力学、基因工程技术以及计算机辅助技术等手段的新兴研究领域,是以蛋白质的结构和功能为基础,通过基因修饰或基因合成而改造现存蛋白质或组建新型蛋白质的现代生物技术,是基因工程的深化和发展。因此,又被称为“第二代基因工程”。

随着人类基因组计划的完成和后基因组时代的到来,2001 年国际人类蛋白质组组织宣告成立,并正式提出启动了两项重大国际合作项目:一项是由中国科学家领头执行的“人类肝脏蛋白质组计划”;另一项是由美国科学家带头执行的“人类血浆蛋白质组计划”。人类蛋白质组计划的深入研究必将推动蛋白质工程的进一步发展,并为之提供更有力的理论支持。

### 一、蛋白质工程的物质基础

蛋白质工程是以蛋白质的结构与功能的关系研究为基础,利用基因工程技术对现存蛋白质加以改造,组建成新型蛋白质的现代生物技术。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,所以改变其中关键的氨基酸就能改变蛋白质的性质。而氨基酸是由三联体密码决定的,所以只要改变构成遗传密码的一个或两个碱基就能通过改变氨基酸达到改造蛋白质的目的。

#### (一) 蛋白质的来源

蛋白质工程需要有合适来源的蛋白质作为研究对象。目前,蛋白质主要来源于微生物、植物和动物等。

微生物不仅具有生长周期短、容易实现遗传操作等优点,而且有些微生物还可以产生胞外酶,提纯工艺简单,这使得微生物可作为蛋白质的主要来源。目前,由微生物产生的许多蛋白质已在工业中得到广泛应用。

植物是很多生物活性分子的传统来源,但不易作为蛋白质的主要来源,这主要是由于它具有一些应用上的局限性,如生长周期长、季节性强、许多蛋白质不是植物所特有的,从其他生物中提取会更方便。尽管从其他生物体中获取蛋白质具有方便、经济等特点,但也有一些植物特有的或利用植物更容易获取的蛋白仍需要从植物中提取(如应乐果甜蛋白、木瓜蛋白酶等)。

以动物为来源的主要是一些医学方面的蛋白质,如胰岛素、凝乳酶和各种抗体等,但用动物作为蛋白质的来源一定要确保其来源的安全性。

#### (二) 蛋白质的结构

蛋白质一般是由若干条多肽链组成的,有不同的结构层次:一级结构、二级结构、三级结构和四级结构等,其中蛋白质的一级结构是由 20 种氨基酸通过肽键连接而成的,它包含了蛋白质分子为获得复杂结构所需的全部信息,可利用这些信息进行蛋白质高级

结构的分析、同源蛋白的比较以及蛋白质的远缘比较。蛋白质的二级结构是多肽链主链折叠并依靠不同肽键的 C=O 与 N-H 基团之间形成的氢键维系而成的稳定结构, 较常见的二级结构元件有  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ 转角和无规卷曲等几种。蛋白质的三级结构是多肽链在二级结构的基础上进行进一步折叠、卷曲而成的球状分子结构, 是二级结构的组装。由于在不同的蛋白质中, 有时会有相同的局部空间结构, 因此又可在二级结构与三级结构间进一步细分出超二级结构和结构域两个结构层次。三级结构往往是由一个或若干个结构域组成的。蛋白质的四级结构是寡聚蛋白的结构形式, 一般由两个或多个亚基通过非共价作用结合形成的聚合体。

### (三) 蛋白质的功能

自然界中种类繁多的蛋白质决定了其生物学功能的多样性, 作为生命物质基础的蛋白质是生物功能的载体。蛋白质的生物学功能主要体现在以下几个方面: ①具有生物催化功能; ②具有调节功能; ③具有运输功能; ④具有运动功能; ⑤可作为机体的结构成分; ⑥具有防御和保护功能; ⑦可作为生物体发育和生长的营养物质。另外, 蛋白质是人体必需的营养物质, 蛋白质的水解产物氨基酸可作为一些生理反应的原料及重要的中间代谢物, 而且蛋白质还可在必要时提供生物体急需的氮、硫、磷、铁等元素。

### (四) 蛋白质的结构与功能的关系

蛋白质的生物学功能总是与蛋白质的结构紧密相关的。一级结构相似的蛋白质, 其功能往往也相似, 如从不同种属的生物体分离出来的同一功能的蛋白质, 其同源性往往比较高, 即一级结构相似的蛋白质在系统发生和进化位置上相距较近。在蛋白质的一级结构中, 参与功能部位的残基或处于特定构象关键部位的残基对蛋白质的生物学功能往往起决定性作用。例如, 溶菌酶的活性部位是个界限清楚的裂缝, 而胰凝乳蛋白酶的活性部位是个深为 10~12Å 的口袋, 这些结构特征和它们结合的底物或抑制剂分子的性质有关。弹性蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶有十分相似的三维结构, 它们底物结合特异性的差别只是由于活性部位的少数残基不同。由于蛋白质的结构与其生物学功能的相关性, 在有些情况下, 即使在整个蛋白质分子中仅发生一个氨基酸残基的异常, 该蛋白质的功能也会受到明显的影响, 甚至导致机体发生病变, 如镰刀状细胞贫血症, 就是由于血纤蛋白的两条  $\beta$  链的第 6 位上的 Glu 转变为 Val, 在血红蛋白表面形成了一个疏水区, 并导致血红蛋白聚集成不溶性的纤维束, 进而引起红细胞镰刀状化和输氧能力降低。

许多研究表明, 蛋白质多种多样的功能与其特定的空间构象密切相关。当蛋白质的构象发生变化时, 会使其功能活性也随之改变。例如, 蛋白质变性时, 由于其空间构象被改变可引起功能活性丧失; 而变性的蛋白质在复性后, 随着构象的复原其活性即可得到恢复。

## 二、蛋白质工程的原理

### (一) 蛋白质工程的理论依据

蛋白质工程的理论依据是基因指导蛋白质的合成, 人们可以根据需要对负责编码某种蛋白质的基因进行重新设计和改造, 借以改善蛋白质的物理和化学性质, 使合成出来的蛋白质的结构和性能更加符合人们的要求。由此可见, 蛋白质工程是在基因工程的基础上发展起来的, 这也是蛋白质工程被称为“第二代基因工程”的原因所在。

## (二) 蛋白质工程设计原理

蛋白质工程设计就是在知道需要改造的蛋白质的结构和功能的基础上,通过理论的方法,提出蛋白质改造的设计方案。蛋白质分子设计既可以在基因水平上又可以在蛋白质水平上。基因水平的改造是在功能基因开发的基础上对编码蛋白质的基因进行改造;蛋白质水平的改造则主要是对制造出的蛋白质进行加工、修饰,如糖基化、磷酸化等。蛋白质分子设计为蛋白质工程提供指导性信息,又为探索蛋白质的折叠机理提供重要方法。

蛋白质分子设计按照被改造部位的多寡分为三种类型:一为“小改”,即对已知结构的蛋白质进行几个残基的替换来改善蛋白质的结构和功能;二为“中改”,即对天然蛋白质分子进行大规模地肽链或结构域替换以及对不同蛋白质的结构域进行拼接组装;三为“大改”,即在了解蛋白质结构和功能的基础上,从蛋白质一级结构出发,设计自然界不存在的全新蛋白质。

## 三、蛋白质工程的程序 and 操作方法

蛋白质工程主要是研究蛋白质的分离纯化、蛋白质的结构与功能的分析、设计及预测,通过基因工程手段进行蛋白质的改造与创造,其中对蛋白质结构与功能关系的研究是蛋白质工程的核心内容。

### (一) 蛋白质工程的程序

蛋白质工程的程序可简述如下:筛选纯化需要改造的目的蛋白,研究其特性常数等;制备结晶,并通过氨基酸测序、X射线晶体衍射分析、核磁共振分析等研究,获得蛋白质结构与功能相关的数据;结合生物信息学的方法对蛋白质的改造进行分析;由氨基酸序列及其化学结构预测蛋白质的空间结构,确定蛋白质结构与功能的关系,进而从中找出可以修饰的位点和可能的途径;根据氨基酸序列设计核酸引物或探针,并从cDNA文库或基因文库中获取编码该蛋白的基因序列;在基因改造方案设计的基础上,对编码蛋白的基因序列进行改造,并在不同的表达系统中表达;分离纯化表达产物,并对表达产物的结构和功能进行检测等。

### (二) 蛋白质工程的操作方法

生物化学和结构分子生物学的发展为蛋白质工程提供理论基础;计算机辅助设计相关软件的开发与飞速发展,为蛋白质工程提供了蛋白质结构模拟预测的设计平台;而分子生物学理论基础和基因工程技术以及生物信息学领域技术的迅猛发展则提高了蛋白质分子设计的效率和正确性。

合理化的分子设计是蛋白质成功改造的前提,目前,人们已通过突变、重组和功能筛选等技术获得改造的蛋白质分子。其中常用基因突变技术主要有寡核苷酸引物介导的定点突变、盒式突变、PCR突变;易错PCR随机突变和DNA改组基因突变技术等;蛋白质筛选系统有噬菌体表面展示技术、细菌表面展示技术和体外展示技术等。

## 四、蛋白质工程的产生与发展

蛋白质工程是20世纪80年代初诞生的一个新兴生物技术领域,其产生和发展涉及到生物化学、生物物理学、分子生物学、分子遗传学、计算机和化学工程以及一些相关的相邻学科和生物工程技术。由此可见,蛋白质工程的产生和发展是许多学科及相关生

物工程技术相互融合、共同发展的结果,已成为生物工程技术的重要组成部分。

### (一) 蛋白质工程与发酵工程

发酵工程是利用微生物的特定性状,通过现代工程技术大规模培养微生物菌体,利用微生物的生理代谢活动生产有用的物质或直接应用于工业生产的一种技术体系。

几千年前,人们就已发展起了酿造技术,这就是最早的发酵技术。20世纪40年代,青霉素的大规模制备标志着发酵工程技术的建立。20世纪70年代以来,基因工程技术的发展使定向改变生物的性状和功能成为可能,并利用基因工程技术和细胞杂交技术选育出一大批生长速度快、代谢能力强、且易于大量表达外源产物的新菌种,标志着发酵工业的新变革。

从广义上讲,发酵工程是由上游工程、发酵工程和下游工程三部分组成。上游工程是指优良菌株的选育及最适发酵条件的确立;发酵工程是指在最适条件下,利用发酵罐进行细胞培养和生产代谢产物的技术;下游工程是指发酵产品的分离纯化。因此,发酵工程技术可为蛋白质工程提供优良稳定的工程菌株、并可为蛋白质工程中前期材料的制备等奠定重要基础。

### (二) 蛋白质工程与基因工程

基因工程是以DNA双螺旋分子结构为理论基础,以DNA的体外操作为技术基础,按人们的意愿对不同生物的遗传基因进行切割、拼接或重新组合,再转入生物体内产生出人们所期望的产物,或创造出具有新遗传性状生物的技术。

1944年,Avery等发表了关于“转化因子”的论文,证实了DNA是遗传信息的载体。1953年,Watson和Crick提出了DNA结构的双螺旋模型。1961年Jacob和Monod提出了操纵子学说,开创了基因调控的研究。1952年美国分子生物学家Luria在大肠杆菌中发现了所谓的“限制”现象,随后瑞士微生物学家对此作进一步深入的研究,并认为一定的细菌株系具有某种特定的限制性内切酶,能够识别或降解某些专一位点。自20世纪70年代以来,人们已纯化得到600多种限制性核酸内切酶,使得分子切割成为可能,为基因工程的发展提供了有利的技术支撑。1967年可将两条DNA片段连接起来的DNA连接酶被发现;1970年具有更高连接活性的T4 DNA连接酶被发现,这种酶还能促使DNA平齐末端的连接;1973年美国斯坦福大学教授Cohen和Boyer在体外构建了含有两种抗生素抗性基因的重组质粒分子,并成功转入了大肠杆菌,这是基因工程诞生的标志。基因工程使人类从单纯的认识和利用生物的传统模式跳跃到了改造和创造生物的新时代。

蛋白质工程是从DNA水平改变基因入手,通过基因重组技术改造蛋白质或设计合成具有特定功能新蛋白质的新兴研究领域,也就是说蛋白质的改造通常需要经过周密的分子设计,进而依赖基因工程获得突变型蛋白质。目前,基因工程已为实现蛋白质工程提供了基因克隆、表达、突变及活性检测等关键技术。

### (三) 蛋白质工程与细胞工程

细胞工程是指以细胞为单位,应用细胞生物学与分子生物学等的理论和技术,在细胞和亚细胞水平上有目的地进行遗传操作,通过细胞融合、核移植等方法,培养出人们需要的新物种,克服了远缘杂交的局限性;或获得有商业价值的细胞株或细胞系,并通过大规模培养增殖而获得对人类有用的产品。目前,细胞工程研究的主要内容是动植物细胞与组织培养技术、细胞融合技术、细胞拆合技术、染色体改造及导入技术以及与基因工程技术相结合的基因转移技术等。

植物细胞工程的发展最早可追溯到 20 世纪初,早在 1902 年,德国科学家 Haberlandt 就预言了植物细胞的全能性;1937 年,胡萝卜的离体培养获得了成功,并实现了细胞增殖;1943 年,美国科学家 White 正式提出了植物细胞全能性学说。

在动物细胞工程方面,1952 年美国科学家 Robert Briggs 和 King 利用两栖类的卵细胞建立了细胞移植技术。1977 年英国采用胚胎工程技术成功培育出世界首例试管婴儿。1981 年,Evans 和 Kaufman 分别从小鼠早期胚胎中成功分离培养胚胎干细胞,并建立了细胞系。1982 年,美国学者 Brackett 等获得世界上第一胎试管牛。1997 年英国利用绵羊的成年体细胞克隆出绵羊“多莉”,成功证明了成年动物体细胞也具有全能性。1999 年 2 月 19 日,上海医学遗传研究所培育出携带有人体蛋白基因的中国首例转基因试管牛。2000 年 12 月 24 日,我国科学家已成功地将人抗胰蛋白酶基因导入到山羊,所培育出的转基因山羊的羊奶中含有治疗慢性肺气肿和先天性肺纤维化囊肿等疾病的成分。2001 年,英国又成功培育出世界首批转基因克隆猪。

目前,细胞工程技术已为蛋白质工程提供了改良性状的微生物细胞以及稳定的动植物细胞系,以便更好的生产蛋白质;另外细胞工程可通过细胞融合、转基因等技术改变生物的遗传性状或实现新型生物的构建,进而为蛋白质的生产提供更多良好的载体。

#### (四) 蛋白质工程与酶工程

酶工程是生物工程的重要组成部分,是酶的生产与应用的技术过程,是从应用的目的出发研究酶,利用酶的催化作用,在一定的生物反应器中,将相应的原料转化为所需要的产品。

真正认识到酶的存在是从 19 世纪开始的。1833 年 Payen 和 Persoz 从麦芽的水抽提物中用酒精沉淀法提取到了一种可以使淀粉水解成可溶性糖的对热不稳定的活性物质,称为淀粉酶。19 世纪中叶, Pasteur 等经过大量研究指出活酵母内有一种可使糖发酵成酒精的物质。1878 年 Kunne 将这种物质称为酶,取义“在酵母中”。1898 年 Buchner 兄弟研究发现,酵母的无细胞抽提物也可将糖发酵生成酒精,这说明酶不仅可在细胞内,也可在细胞外进行催化作用,该发现促使了对酶的分离及其理化性质的研究,因此一般认为这是酶学研究的开端。1926 年 Sumner 从刀豆提取液中分离纯化得到脲酶结晶,证明了其蛋白质的性质,并提出酶的化学本质为蛋白质的观点。Jacob 和 Monod 提出操纵子学说,阐明了微生物的调控机制。1963 年牛胰核糖核酸酶 E 的一级结构被确定,1965 年蛋清溶菌酶的空间结构被证明,1969 年人工合成核糖核酸酶 E 获得了成功。

酶工程的发展一般被认为是从第二次世界大战开始的。20 世纪 50 年代开始,由微生物发酵液中分离出一些酶,制成酶制剂;60 年代固定化酶及固定化细胞技术的日益成熟;70 年代后期以来,微生物学、遗传工程及细胞工程等相关技术被引入到酶工程领域,促进了酶工程的发展。同时由于大部分酶的化学本质是蛋白质,因此酶工程与蛋白质工程的发展又有着密不可分的联系。

#### (五) 蛋白质工程与生物信息技术

生物信息学是生物学与信息技术的交叉学科。该学科包含了对核酸、蛋白质序列和蛋白质结构的信息处理,有助于对生物的基因组与蛋白质组理解。生物信息学的概念是在 1956 年美国田纳西州盖特林堡召开的“生物学中的信息理论研讨会”上产生的,但直到 20 世纪 80 到 90 年代,随着生物科学技术的迅猛发展和数据资源的指数性增长以及计算机科学技术的进步,生物信息学才获得突破性进展。

生物信息学的研究内容主要包括生物信息的收集、存储、管理和提供,基因组序列



信息的提取和分析,功能基因组相关信息的分析,生物大分子的结构模拟和药物设计等方面。利用生物信息学可以进行蛋白质结构的预测,其目的就是利用已知的一级序列来构建蛋白质的立体结构模型(包括二级和三级结构预测)。目前,已有大量的有关根据序列预测蛋白质二级结构的文献资料,大致可分为两类:根据单一序列预测二级结构和根据多序列预测二级结构。三级结构预测则需要利用数据库中已知结构的序列进行比对。

## (六) 蛋白质工程与其他相关技术

结构分析和遗传物质的研究在蛋白质工程的发展中作出了重要的贡献。1912年 Laue 曾预言,晶体是 X 射线的天然衍射光栅;随后 Bragg 父子开创了 X 射线晶体学,并成功地测定了一些相当复杂的分子以及蛋白质的结构。20 世纪中 X 射线衍射技术被正式应用到蛋白质的研究领域。1954 年英国晶体学家 Perute 等提出,在蛋白质晶体中引入重原子的同晶置换法可用来测定蛋白质的晶体结构。1955 年 Sanger 完成了胰岛素的氨基酸序列的测定,接着 Kendrew 和 Perute 在 X 射线分析中应用重原子同晶置换技术和计算机技术,并分别于 1957 年和 1959 年阐明了鲸肌红蛋白和马血红蛋白的立体结构。1960 年英国晶体学家 Kendrew 等首次测出肌红蛋白的三维结构;1965 年中国科学家合成了有生物活性的胰岛素,首先实现了蛋白质的人工合成。

噬菌体感染寄主后半小时内即可复制出几百个同样的子代噬菌体颗粒,因此噬菌体是研究生物体自我复制的理想材料。到 20 世纪 60 年代中期,关于 DNA 自我复制和转录生成 RNA 的一般性质已基本清楚,基因的奥秘也随之开始解开了。进入 20 世纪 70 年代,由于重组 DNA 研究的突破,基因工程已开始在实际应用中开花结果,根据人的意愿改造蛋白质结构的蛋白质工程也已经成为现实。20 世纪 80 年代美国的 Ulmer 在 Science 期刊上发表了以 Protein Engineering 为题的专论,一般被视为蛋白质工程诞生的标志。

## 五、蛋白质工程的应用领域

蛋白质工程技术的应用可以提高重组蛋白的活性及稳定性;延长制品在体内的半衰期;降低制品的免疫原性;提高酶的热稳定性;改变酶促反应的  $K_m$  与  $V_{max}$ ,以改变反应的催化效率;提高酶对底物的亲和力以增强酶的专一性;提高蛋白质的抗氧化能力;改变酶的别构调节部位,以减少反馈抑制,提高产物的产率;增强蛋白对胞内蛋白酶的抗性,简化纯化过程,提高产率;改变酶的底物专一性等。目前,蛋白质工程技术已在工农业和生物医药等领域表现出广阔的应用前景。

### (一) 医药领域

蛋白质药物具有高活性、特异性强、低毒性、生物功能明确、有利于临床应用的特点。由于其成本低、成功率高、安全可靠,已成为医药产品中的重要组成部分。基因工程技术诞生后首先应用于人胰岛素及人生长激素释放抑制因子等医用蛋白质的开发,大大降低了治疗的成本。目前,借助蛋白质工程,通过分子设计和定点突变技术获得人胰岛素突变体已在国内外取得极大进展,如降低了胰岛素的聚合作用,使胰岛素快速起作用等。此外,尿激酶、干扰素等的生产也通过蛋白质工程得到了长效、稳定、作用更广泛的产品。目前,各国制药公司正在加强研究新型的生物技术药物,用于新的适应病症。通过蛋白质工程改造特殊蛋白质为制造特效抗癌药物开辟了新的途径,如人的  $\beta$ -干扰素和白细胞-2 在修饰后稳定性得到提高,抗癌作用在临床试验中取得良好效果;病毒疫苗的重组研制,获得免疫原性很好的重组蛋白,从而提高疫苗的抗病效果;通过蛋