

蛋白质 工程原理与技术

刘贤锡 主编



山东大学出版社
Shandong University Press

蛋白质工程原理与技术

主编 刘贤锡

山东大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

蛋白质工程原理与技术/刘贤锡等主编. — 济南: 山东大学出版社, 2002. 8
ISBN 7-5607-2465-5

- I. 蛋…
- II. 刘…
- III. 蛋白质-化学加工
- IV. TQ93

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 053725 号

山东大学出版社出版发行
(山东省济南市山大南路 27 号 邮政编码: 250100)
山东省新华书店经销
日照市黄海印刷厂印刷
787×1092 毫米 1/16 11.25 印张 257 千字
2002 年 9 月第 1 版 2002 年 9 月第 1 次印刷
印数: 1—2300 册
定价: 21.80 元

版权所有, 盗印必究

凡购本书, 如有缺页、倒页、脱页, 由本社发行部负责调换

主 编 刘贤锡

副主编 王守训 刘师莲 高 聆 刘传华

编 者 (按姓氏笔画)

王守训	王 伟	王晓明
卞继峰	刘师莲	刘传华
刘贤锡	胡海燕	高 聆

主 审 于修平

前 言

蛋白质工程是继基因工程之后发展起来的一门新学科，它诞生于20世纪80年代之初，在近20年的时间内发展非常迅速。它是当今三大生物技术的领头羊，是新技术革命的重要组成部分，是基础理论研究向产业化转化的典范。蛋白质工程的原理及技术已渗透到医药学、农牧林科学及轻工业等多种领域，对这些领域的发展起着重要推动作用。

蛋白质工程是通过了解蛋白质结构与功能关系，借助于生物信息学的知识和手段，利用基因定点诱变和基因重组等技术，特异性地改造蛋白质的结构基因，产生具有新的特性的蛋白质的技术。其创造性成就在于开创了按照人类意愿设计制造符合人类需要的蛋白质的新时期。在近20年的实践过程中，无论是在基础理论研究领域，还是在生产实际应用方面，蛋白质工程研究均已获得了惊人的成就，使得生命科学的研究发生了深刻的变化，并将对今后生命科学的研究起到重大促进作用。因此，作为生物学和医药科学研究者有必要了解和掌握蛋白质工程的原理、技术，以及新进展和新成就。而本书正是根据蛋白质工程学科的进展以及教学的需要所编写。

本书共十章，第一章简要介绍了蛋白质工程的基本理论、基本内容及其程序、应用和进展；第二章至第四章分别介绍了蛋白质结构与功能、基因重组及定点诱变技术的基本原理；第五章至第七章分别介绍了蛋白质工程在酶蛋白质、抗体以及蛋白质及多肽药物研究中的应用；第八章和第九章分别介绍了蛋白质分离纯化与结构分析常用技术的原理及其应用；由于在蛋白质工程中常需要生物信息学对蛋白质的结构和功能进行分析并为蛋白质的结构改造进行预测，所以，本书第十章，对生物信息学进行了简要介绍。

本书的宗旨是为生物学和医学高级人才的培养提供一本有益的参考书。从这一宗旨出发，编者对本书的内容进行了精心的设计，并在系统介绍各章主要内容的同时，重点介绍了该领域的新进展和新成就。由于我们经验不足，水平有限，编写时间仓促，错误和不当之处在所难免，敬请同行专家以及使用本书的师生和读者批评指正。

编 者

2002年4月于山东大学医学院

111111

目 录

第一章 绪论	(1)
第一节 蛋白质工程概论	(1)
一、蛋白质工程的理论基础	(1)
二、蛋白质工程的研究内容	(3)
三、蛋白质工程的基本程序	(4)
第二节 蛋白质工程的应用	(5)
一、研究蛋白质结构与功能的关系	(5)
二、改变蛋白质的特性	(6)
三、生产蛋白质和多肽类活性物质	(6)
四、设计合成全新蛋白质	(8)
第三节 蛋白质工程展望	(8)
第二章 蛋白质的结构与功能	(10)
第一节 蛋白质的基本结构与功能	(10)
一、蛋白质的组成	(10)
二、蛋白质的一级结构	(11)
三、蛋白质一级结构与功能的关系	(11)
第二节 蛋白质的空间结构与功能	(13)
一、蛋白质的二级结构	(13)
二、超二级结构和结构域	(13)
三、蛋白质的三级结构	(14)
四、蛋白质的四级结构	(16)
五、蛋白质空间结构与功能的关系	(16)
六、蛋白质-蛋白质相互作用	(18)
第三章 基因重组技术	(19)
第一节 工具酶	(19)

一、限制性核酸内切酶	(19)
二、其他工具酶	(21)
第二节 载体	(22)
一、质粒	(23)
二、噬菌体载体	(25)
三、表达载体	(27)
第三节 基因克隆的基本程序	(29)
一、目的基因的制备	(29)
二、目的基因与载体重组	(30)
三、重组 DNA 导入宿主细胞	(31)
四、重组体的筛选与鉴定	(32)
第四节 真核基因在大肠杆菌中的表达	(34)
一、真核基因在大肠杆菌中表达的基本条件	(34)
二、真核基因在大肠杆菌中的表达方式	(34)
第四章 定点诱变与蛋白质工程	(36)
第一节 定点诱变	(36)
一、M13DNA 寡核苷酸诱变	(37)
二、PCR 定点诱变	(39)
三、盒式诱变	(40)
四、随机诱变	(41)
第二节 蛋白质工程	(42)
一、加入二硫键	(42)
二、将 Asn 和 Gln 转换成其他氨基酸	(44)
三、减少游离 Cys 残基的数目	(44)
四、增加酶的活性	(45)
五、改变酶的特异性	(45)
第五章 酶蛋白质工程	(47)
第一节 酶的分子结构与催化功能	(47)
一、酶的结构特点与功能	(47)
二、酶催化作用的机制	(50)
三、酶促反应动力学参数	(52)
第二节 蛋白酶工程	(54)
一、枯草杆菌蛋白酶的定点改造	(54)
二、组织型纤溶酶原激活剂的定点改造	(56)
第三节 葡萄糖异构酶工程	(58)
一、结构特点及生物学性质	(58)

二、定点改造葡萄糖异构酶	(59)
三、应用	(60)
第四节 酶蛋白的定向进化	(60)
一、酶的定向进化的原理与思路	(61)
二、定向进化的常用技术	(62)
第六章 抗体工程	(65)
第一节 概述	(65)
一、多克隆抗体	(66)
二、单克隆抗体	(66)
三、基因工程抗体	(67)
第二节 抗体及其基因结构与抗体多样性的分子基础	(67)
一、抗体基因的基本结构	(67)
二、可变区基因的重组及其机制	(70)
三、CDR3 的多样性	(72)
四、抗体多样性的来源	(73)
第三节 鼠单抗的人源化	(73)
一、鼠单抗恒定区的人源化	(74)
二、鼠单抗可变区的人源化	(74)
第四节 小分子抗体	(75)
一、Fab 段	(76)
二、Fv 和单链抗体	(76)
三、胞内抗体	(78)
四、抗体融合蛋白	(79)
第五节 抗体库技术	(80)
一、初期的抗体库技术	(80)
二、噬菌体抗体库技术	(81)
第七章 蛋白质和多肽药物工程	(83)
第一节 概述	(83)
一、蛋白质多肽药物的表达系统	(83)
二、蛋白质多肽药物研究现状	(85)
第二节 激素类药物	(86)
一、胰岛素	(86)
二、生长激素	(88)
三、促红细胞生成素	(89)
第三节 细胞因子类药物	(89)
一、干扰素	(90)

二、白细胞介素	(91)
三、集落刺激因子	(93)
第八章 蛋白质分离纯化技术	(95)
第一节 蛋白质分析分离中的电泳技术	(95)
一、概述	(95)
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳	(97)
三、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(101)
四、等电聚焦电泳	(102)
五、双向凝胶电泳	(104)
六、毛细管电泳	(105)
七、聚丙烯酰胺凝胶印渍转移电泳	(109)
第二节 色谱技术	(109)
一、色谱技术分类	(110)
二、离子交换层析	(110)
三、凝胶过滤层析	(112)
四、分配层析	(115)
五、亲和层析	(116)
第三节 高效液相色谱	(117)
一、高效液相色谱基本理论	(118)
二、高效液相色谱固定相、流动相	(120)
三、高效液相色谱仪构成	(121)
四、高效液相色谱分析方法	(124)
五、氨基酸、多肽和蛋白质的 HPLC 分析	(125)
第九章 蛋白质结构分析技术	(129)
第一节 蛋白质和多肽的氨基酸序列分析	(129)
一、N 端序列分析	(129)
二、C 端序列分析	(133)
第二节 物质谱技术在蛋白质和多肽结构测定中的应用	(135)
一、质谱技术的基本原理	(135)
二、物质谱仪	(136)
三、物质谱在蛋白质和多肽结构测定中的应用	(139)
第三节 X 射线晶体衍射技术在蛋白质晶体结构测定中的应用	(142)
一、基本原理	(142)
二、X 射线衍射技术在蛋白质分析中的应用	(143)
第四节 核磁共振波谱技术在蛋白质结构测定中的应用	(144)
一、NMR 的基本原理	(144)

二、生物 NMR 常用的实验技术.....	(150)
三、NMR 在蛋白质研究中的应用	(151)
第十章 生物信息学.....	(154)
第一节 概述	(154)
第二节 生物信息数据库.....	(155)
一、基因和基因组数据库.....	(155)
二、蛋白质数据库.....	(157)
三、功能数据库.....	(158)
四、序列比对和预测分析.....	(160)
第三节 生物信息学在蛋白质研究中的应用.....	(164)
一、蛋白质组.....	(164)
二、蛋白质结构.....	(164)
三、新药设计.....	(164)
主要参考文献.....	(166)

第一章 绪 论

蛋白质工程 (protein engineering) 研究在过去的 20 余年间发展迅速, 已取得一批较好成果, 并开始应用于医学、农业、轻工等各个领域, 产生了较大的经济和社会效益。2000 年 6 月 26 日, 人类基因组的工作草图宣告完成, 标志着人类跨进 21 世纪历史新纪元之际, 生命科学也迎来了一个崭新的时代, 即后基因组时代 (post-genome era)。在后基因组时代中, 生物学的中心任务是揭示基因组及其所包含的全部基因的功能, 并在此基础上阐明生命体的遗传、进化、发育、生长、衰老、死亡的基本生物学规律, 以及与人类健康和疾病相关的生物学问题。由于基因的功能最终总是通过其表达产物蛋白质来实现的, 因此, 在人类基因组测序之后进一步集中研究蛋白质的结构及功能, 是揭示基因组功能, 阐释生命体重要生命活动规律和生命现象本质的基本途径, 也是阐释疾病发生与发展的分子机理并进而战胜疾病的重要途径。而研究蛋白质的结构和功能, 并在此项研究基础上人工改造蛋白质的结构, 并获得我们所需要的活性蛋白质, 正是蛋白质工程的主要任务和目标。

第一节 蛋白质工程概论

蛋白质工程是在重组 DNA 技术应用于蛋白质结构与功能研究之后发展起来的一门新兴学科。所谓蛋白质工程, 就是通过对蛋白质已知结构和功能的了解, 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, 产生具有新的特性的蛋白质的技术, 并由此深入研究蛋白质的结构与功能的关系。蛋白质工程是在遗传工程取得的成就的基础上, 融合蛋白质结晶学、蛋白质动力学、计算机辅助设计和蛋白质化学等学科而迅速发展起来的一个新兴研究领域, 它开创了按照人类意愿设计制造符合人类需要的蛋白质的新时期, 因此, 被誉为第二代遗传工程。蛋白质工程的出现, 为认识和改造蛋白质分子提供了强有力的手段。

一、蛋白质工程的理论基础

酶的专一性强, 在温和条件下能有效地催化化学反应的能力使酶的应用日益广泛。药品、化学、食品工业及分析服务行业是酶开发的重要领地。目前已知的酶约有 8000 多种, 至少有 2500 种有可能应用, 而目前国际上工业用酶约为 50 种, 以吨量级出售的

仅约 20 余种, 可见, 酶的开发利用尚有较大潜力。妨碍酶开发利用的原因主要有: ①生物材料中酶含量甚少, 用传统酶蛋白的分离纯化成本太高; ②酶蛋白分子结构的稳定性差, 过酸、过碱、高温、氧化等因素均可破坏其结构, 使其丧失生物活性, 因而在工业加工条件下, 酶的半衰期短, 利用率较低; ③酶催化活性的最适 pH 值及底物专一性的范围较窄, 与工业应用的要求有较大差距。因此, 要想扩大酶蛋白的开发利用, 需要建立适当的方法, 以改善酶蛋白的生物特性, 使之适合于工业应用的需求。

随着基因工程理论和技术的发展, 人们已经能克隆特异蛋白质的基因, 并令其在适宜宿主菌中表达, 使蛋白质的产量大大提高, 因而降低蛋白质纯化成本的问题已基本解决。重要的问题是提高酶蛋白的稳定性, 改良其生物学特性。

稳定蛋白质空间构象的主要因素是蛋白质分子众多基团间的相互作用, 如肽键和侧链间的氢键、带有不同电荷的侧链间的静电作用、极性氨基酸残基侧链间的偶极作用、疏水残基间的疏水作用以及分子内的二硫键等。蛋白质结构与功能研究表明, 上述稳定蛋白质空间构象的因素是由蛋白质一级结构中某一个或某一段氨基酸序列决定的, 人工改变或修饰这些氨基酸残基, 有可能增加蛋白质的稳定性, 又不影响其生物学活性。如野生型枯草杆菌蛋白酶的 218 位 Asn 是酶活性部位有关的氨基酸残基, 若将其变成 Ser, 用 65℃ 的失活半衰期衡量, 从 59 分钟增加到 223 分钟, 酶的稳定性显著增加。再如氧化失活使枯草杆菌蛋白酶在工业上的应用受到严重限制。很早就有人证实枯草杆菌蛋白酶在少量 H₂O₂ 作用下很快失活是由于埋藏在催化部位 Ser221 邻近的 Met222 氧化成硫氢化物的原因。1985 年 Wells 证明若用其他氨基酸取代 Met222, 可以提高酶的氧化稳定性而又保持高催化活性。

以上以酶为例介绍了蛋白质工程的重要性。实际上, 在多肽药物、抗体以及其他活性蛋白质的基础与应用研究中, 同样存在着蛋白质结构的改造问题。如白细胞介素-2 (IL-2) 是一种免疫反应调节因子, 在医学上具有广泛的用途。结构研究证明, IL-2 是由 133 个氨基酸残基组成的多肽, 有 3 个半胱氨酸, 1 个二硫键, 而 125 位上的半胱氨酸处于游离状态, 这可能与结构的稳定性有关。在分离纯化 IL-2 的过程中, 人们发现在产品纯化和恢复活性过程中, IL-2 多肽链中的三个半胱氨酸之间易发生二硫键错配, 致使整个多肽活性降低。对此, 科学家通过定点诱变将编码链上编码 125 位半胱氨酸的密码子 TGT 转换成 TCT 或 GCA, 也就是把半胱氨酸转换成丝氨酸或丙氨酸, 结果可以避免二硫键的错配, 使产品 IL-2 的活性提高了 7 倍。可见, 改造蛋白质的空间结构以改变蛋白质的某些生物学特性, 在拓宽蛋白质的用途, 推动生物技术产业化方面至关重要。而蛋白质精细结构的改造, 只有利用蛋白质工程技术才能得以实现。

蛋白质工程的重要目标之一, 是通过改造蛋白质的结构来提高其开发利用的价值。这就是说, 蛋白质的结构改变了, 其生物学功能不能变。人所共知, 蛋白质的功能是由其结构所决定的, 蛋白质的结构改变了, 其生物学功能能保持不变吗? 蛋白质结构与功能关系的研究表明, 蛋白质功能部位的几个氨基酸残基决定着蛋白质的功能, 但是这几个负责功能的氨基酸残基必须处于一个极其精密的空间状态下才能发挥功能。这就是说, 只要能维持蛋白质结构域的必须氨基酸及空间构象不变, 其功能域的生物学活性就会保持不变。变异研究已经证明, 许多蛋白质分子中多个氨基酸被改变, 但其生物学功

能不受影响或只受极少的影响。事实上,在许多个体中已发现一些变异蛋白,伴有氨基酸的插入、丢失、或替换,但蛋白质仍保持正常功能。如前所述,将枯草杆菌蛋白酶催化部位 Ser221 邻近的 Met222 置换,可以提高该酶蛋白的抗氧化性,又能保持酶的催化活性,就是一个典型的例子。随着蛋白质三维结构分析技术的不断发展,借助于电脑对蛋白质结构域与功能域信息的处理及设计,采用定点诱变技术从基因水平改变氨基酸编码顺序即可获得与天然蛋白质的理化性质相异而生物活性相似的突变蛋白质。

生物技术的兴起使得分子生物学的理论与工程实践紧密结合。20 世纪 70 年代初期, DNA 重组技术诞生,并成功地应用于基因操作,从而产生了基因工程。而基因工程的诞生,特别是 DNA 重组技术和基因定点诱变等技术的建立,使我们有可能从基因水平改造蛋白质分子中氨基酸的序列,为蛋白质工程的诞生,奠定了技术基础。所谓基因定点诱变,就是在 DNA 水平上,通过对蛋白质结构基因中某个或某些氨基酸编码顺序加以改变,从而改变蛋白质结构的技术。该技术不仅可用于改造天然蛋白质,而且可以用于确定蛋白质中每一个氨基酸在结构和功能上的作用,以收集有关氨基酸线性顺序与其空间构象和生物学活性之间的对应关系,为人工改造蛋白质提供理论依据。

总之,蛋白质结构和动力学研究是蛋白质结构与功能关系研究的重要手段,而改造蛋白质结构,则依靠基因工程,基因工程的发展从技术上提供了改变蛋白质个别氨基酸残基或肽段的手段,使结构改变已能在实验室实施,二者结合则产生了蛋白质工程。

二、蛋白质工程的研究内容

(一) 利用已知蛋白质一级结构的信息作为应用研究

蛋白质的结构决定蛋白质的功能和理化性质,而蛋白质功能区的某个或某些氨基酸残基可能在维持蛋白质的结构、功能、理化性质中起重要作用。因此,定点改变这些氨基酸序列,即可能改变蛋白质的功能和特性,使之更适合于工业化生产的要求。随着蛋白质结构与功能关系研究技术以及基因工程技术的发展,上述设想已不再是可想而知。通过蛋白质结构与功能研究,利用蛋白质构型信息的图像和程序分析,即可找出与蛋白质功能和特性密切相关的氨基酸序列,而采用定点诱变与盒式突变技术定向改变编码蛋白质的基因,即可改造蛋白质的结构,使它们的生物功能及理化特性得到改变。如前所述枯草杆菌蛋白酶之所以易被氧化失活,是由于催化部位的 Ser221 邻近的 Met222 易被氧化成硫化物,若以其他氨基酸取代 Met222,则可提高酶的氧化稳定性而又不影响其催化活性。这是结构分析和定点突变改造蛋白质的成功范例。枯草杆菌蛋白酶可作为洗涤剂的添加剂,但由于其只能水解 Phe 羧基所形成的肽键,底物作用范围过窄而限制了洗涤剂的高效性,若用带正电荷的 Lys 取代位于活性中心 166 位的 Gly,所获得的突变酶不仅能水解 Phe 羧基所形成的肽键,而且可以水解酸性氨基酸 Glu 所形成的肽键,使其底物作用范围拓宽,因而可能成为最高效的洗涤剂添加酶,这是定点诱变改变蛋白质生物学活性的成功例子。

(二) 从混杂变异体库中筛选和选择具有一定结构—功能关系的蛋白质

蛋白质的变异是蛋白质工程中很重要的研究内容和手段。研究者可有目的地在特定位点上使蛋白质发生变异，然后研究其结构与功能的关系。如果有了一个混杂的变异体库，也可从中筛选出具有一定结构—功能关系的蛋白质。例如，有人把对热不稳定的酶的基因转移到嗜热生物体内，然后利用酶的某种标志（如对卡那霉素的抗性）筛选出对热稳定的酶，既保持着酶的原来性质，又增加了热稳定性。目前从非定点诱变产生的或特定条件诱发的变异库中筛选，已得到耐热的卡那霉素核苷酰基转移酶。这是从混杂变异体库中筛选改造蛋白质性质的一个成功例子。这一类研究的主要困难是变异体库的获得及筛选方法的建立。

(三) 定量蛋白质结构与功能关系的研究

这是目前蛋白质工程研究的主体。这一类研究的课题很广泛，包括蛋白质三维结构模型的建立，配体结合和酶催化的性质，蛋白质折叠和稳定性研究，蛋白质变异等等。这类研究看起来偏重理论，但对于指导实际工程意义重大。

(四) 根据已知结构—功能的关系人工改造蛋白质

蛋白质工程是研究蛋白质结构和定点改造蛋白质结构的一门学科，其创造性成就在于开创了按照人类意愿设计制造符合人类需要的蛋白质的新时期。根据蛋白质结构和功能的关系，采用基因定位诱变工程技术，人工改造蛋白质则是蛋白质工程的主要研究内容之一。其主要研究内容如下：①通过改变蛋白质的活性部位，提高其生物功效及独立工作的能力；②通过改变蛋白质的结构顺序，提高其在极端条件（如酸、碱、热等）下的稳定性；③通过改变蛋白质的结构顺序使其便于分离纯化。这项研究虽然难度较大，但随着人类基因组研究、后基因组研究的不断深入和完善，随着蛋白质工程研究技术和手段的不断发展，该项研究必将获得丰硕的成果。

三、蛋白质工程的基本程序

蛋白质工程是从 DNA 的水平改变基因入手，设计合成或改造蛋白质的技术。该技术综合运用蛋白质的三维结构，结构与功能的详细信息，重组 DNA 基因操作技术，用定点诱变基因的方法直接修饰改变或人工合成基因，有目的地按照设计来改变蛋白质分子中某一种氨基酸残基或结构区域，从而定向改变蛋白质的性质，使其成为具有人们所希望性能的新型蛋白质，或者创造自然界不存在的性质独特的蛋白质（见图 1-1）。

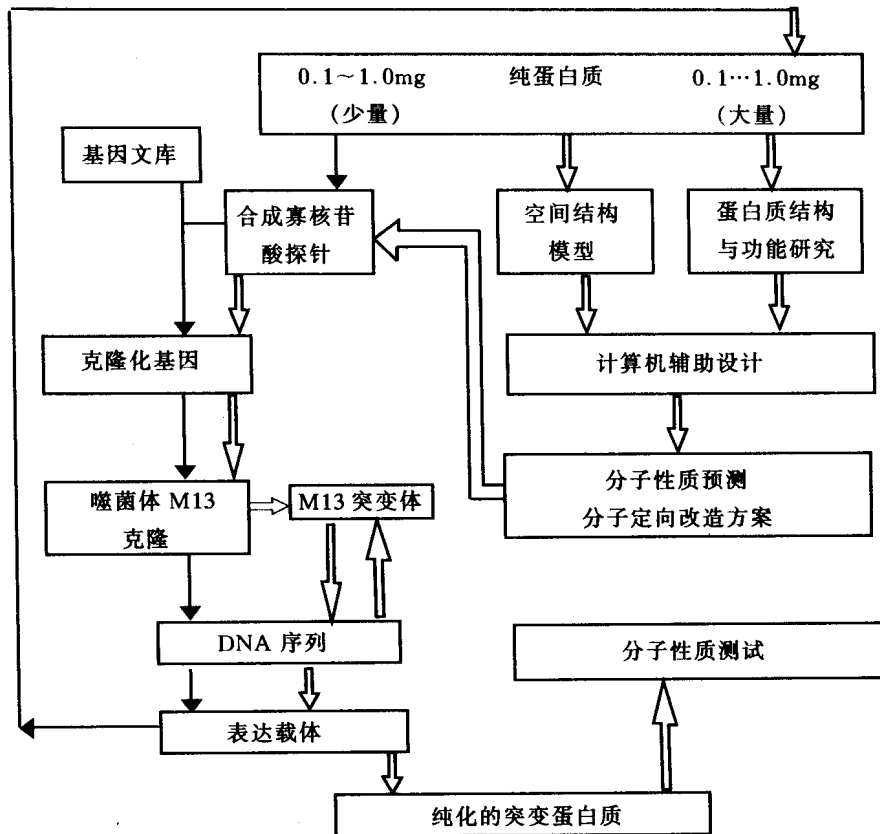


图 1-1 蛋白质工程的程序

首先分离纯化 0.1~1.0mg 纯蛋白质，测定其部分肽段的一段结构，根据编码原则合成相应同位素标记的寡核苷酸探针，以此从基因库中分离编码该蛋白质的克隆化基因，转入噬菌体 M13 系统，用双脱氧末端终止法进行 DNA 序列分析。通过表达载体获得较大量（0.1~1.0 克）该蛋白质用于空间结构测定及结构与功能研究，借助计算机提出分子预测性质及改造方案。通过寡核苷酸 M13 系统定点诱变并分离其突变体，引入表达载体生产并纯化多量突变性蛋白质，分析其性质指导进一步分子设计，以最终获得所预期性质的分子。

第二节 蛋白质工程的应用

蛋白质工程的研究层次已经深入到基因内部，而且所进行的一切改变都是理性的，有目的的和有根据的，其结果一般的说是可以预期的，而不是盲目的，因此，蛋白质工程从一开始就显示出无限的发展前景。在 20 余年的实践过程中，无论是在基础理论研究领域，还是在生产实际应用方面，蛋白质工程研究均已取得了惊人的成绩，使得生命科学的研究发生了深刻的变化。

一、研究蛋白质结构与功能的关系

研究蛋白质结构与功能的关系是按照人类的意愿改造蛋白质的特性、产业化生产活

性蛋白质、甚至设计和制造全新蛋白质的基础。而蛋白质工程则为研究蛋白质结构与功能的关系提供了必要的理论和技术,使我们有可能利用基因工程技术研究蛋白质的结构与功能的关系。

胰蛋白酶和弹性蛋白酶的酶原在激活时发生类似的构象变化,它们的三维结构和催化机制也很相似,但是,在对底物专一性上都表现出较大差异。晶体结构研究显示,二者与底物结合部位都有一个“口袋”,口袋边上的第 216 和 226 位氨基酸残基,胰蛋白酶均是甘氨酸 (Gly 216, Gly226),弹性蛋白酶分别为缬氨酸 (Val216) 和苏氨酸 (Thr226)。Val 和 Thr 的侧链比 Gly 的大,由于空间位阻关系,弹性蛋白酶的专一性底物只能是小分子的疏水氨基酸,胰蛋白酶的口袋则允许大分子氨基酸进入。由于胰蛋白酶口袋的底部第 189 位氨基酸残基是天冬氨酸 (Asp189),能与带正电荷的氨基酸侧链基团静电结合,这决定了其只能专一性的水解精氨酸 (Arg) 和赖氨酸 (Lys) 羧基所形成的肽键。Craik 用定点诱变获得 Ala (丙氨酸) 216, Ala226 和 Ala216+Ala226 三种突变体,以研究氢原子被甲基取代所产生的空间效应对底物专一性以及酶的催化活性的影响。Craik 等将三个突变酶分别在猴肾细胞表达,并对产物进行了动力学分析,发现三种突变酶的活力均下降,但对 Arg 肽键和 Lys 肽键的水解速度的下降在不同突变酶中表现不同。例如突变酶 Ala216 对 Arg 肽键的催化活性高于对 Lys 肽键,这是因为 216 位引入甲基,使 414 位水分子因空间障碍不复存在,底物赖氨酰与酶的结合是通过该水分子与 189 位 Asp 形成的氢键网络,而底物精氨酰可以通过胍基直接与 Asp189 形成氢键,并不必需依赖于水分子,因此 Ala216 突变体对赖氨酰肽键催化活性的降低较对精氨酰肽键更为明显。与此相反,Ala226 位甲基由于空间障碍,影响了 414 位水分子的存在以及精氨酰通过该水分子与 Asp189 的氢键配对,从而大大降低了它对精氨酰肽键的水解速度。双突变酶 Ala216+Ala226 由于 216, 226 位两个甲基的取代使结合口缩小,而且由于局部构象的变化使结合状态的底物的取向可能与酶的活性部位不相匹配,因而催化活性最低。这项研究充分证明了酶活性部位空间位阻对酶催化功能的影响。这种蛋白质的精细结构改变对其功能影响的研究,只有通过蛋白质工程才能完成。

二、改变蛋白质的特性

蛋白质工程的建立,使人们有可能通过改造蛋白质的结构来改变蛋白质的生物学特性。如改变酶的催化活性、酶对底物的专一性、酶与配体的结合能力、酶在 pH 变化、温度变化以及溶剂系统变化条件下分子结构的稳定性等等。这些都可以通过蛋白质工程将酶分子中某个或某一段氨基酸残基更换、增加、删除或修饰来实现。有关这方面的例子本书中多有述及,此处不再赘述。

三、生产蛋白质和多肽类活性物质

(一) 提高酶的产量和创建新型酶

天然酶的产量低、稳定性差,限制了酶的开发利用。DNA 重组技术对酶工业的渗透,导致了酶工业的迅速发展。目前已有多种酶实现了克隆化,并在适宜宿主菌中表达

成功,从而极大地提高了酶的产量。蛋白质工程技术的兴起,给创建新型酶、改变酶的生理特性提供了强有力的工具。如利用基因定点诱变技术,将 T4 溶菌酶的第 3 位异亮氨酸变成半胱氨酸,后者与第 97 位的半胱氨酸形成二硫键,从而稳定了两个结构域所形成的活性中心,使酶在高温下的稳定性大大提高。如果将该酶的第 51 位苏氨酸换成脯氨酸,可使酶的活性提高 25 倍。蛋白质工程技术使酶的产量增加,稳定性提高,从而促进了酶的开发利用。当前商品化的蛋白质工程酶,除了药用酶外,还有枯草杆菌蛋白酶、水解酶、酯酶、 α -淀粉酶和凝乳酶等多种。

(二) 设计和研制新型抗体

传统的抗体是经过抗原免疫动物获得的,称为多克隆抗体。1975 年, Kohler 及 Milstein 等通过杂交瘤技术制备了单克隆抗体(简称单抗),这是免疫学上划时代的伟大进展之一。单抗用于临床疾病治疗,效果不尽如人意,原因在于目前用于治疗的单抗多为小鼠单抗,对人而言是一种异体蛋白,会引起人产生人抗鼠抗体(human anti-mouse antibodies, HAMA),此时再使用小鼠单抗, HAMA 与小鼠单抗结合后,不但会中和单抗使之失效,还会产生有害的过敏反应。为解决这一问题,人们应用基因工程等手段进一步研究抗体的结构与功能的关系,并对抗体基因进行改造,制备出了第三代抗体——基因工程抗体(genetic engineering antibody, GeAb),使抗体的制备更加简化,并且拓宽了抗体的应用范围。

基因工程抗体技术主要包括两部分内容:①对已有的单克隆抗体进行改造,包括单抗的人源化、小分子抗体以及抗体融合蛋白的制备;②通过抗体库的构建,使得抗体不需抗原免疫即可筛选并克隆新的单抗。运用蛋白质工程技术对抗体进行改造,被称为抗体工程,主要包括嵌合抗体、重构抗体、单链抗体、单区抗体及新近出现的全套抗体的研究。

(三) 设计和研制多肽及蛋白质类药物

随着蛋白质工程技术的建立和发展,医药生物高科技产品也迅速发展。当前,人们不仅可以利用基因克隆和表达技术,使可以应用于临床的微量蛋白质(如胰岛素、干扰素、某些酶类等)得以产业化生产,而且可以应用蛋白质工程“重新设计”的思想,以 DNA 重组技术为手段,对多肽和蛋白质类药物的结构加以改造,以期更好地解决蛋白质类药物的导向性问题。如把白介素 2 的基因同白喉毒素的第 II 和第 III 区段拼接,通过基因工程获得白介素 2-白喉毒素的杂合蛋白。该杂合蛋白可定向与 T 细胞表面的白介素 2 受体结合,进入细胞继而杀死 T 细胞,因而具有特异性的治疗 T 细胞白血病的作用,并可抑制器官移植的免疫排斥作用和治疗某些自身免疫性疾病。目前已能产业化生产并应用于临床治疗的基因工程药物有激素类及神经递质类药物、细胞因子类药物、酶类药物及凝血因子等不同类别的多种药物。基因工程药物是目前国内外发展较快的一个产业,同时也使人类疾病的防治水平得到了提高。