

VL 黄迎春 主编 赵伟 万平 副主编

CL

VH

CH1

CH2

ANBAIZHI GONGCHENG  
JIANMING JIAOCHENG

# 蛋白质工程

# 简明教程



化学工业出版社

# 蛋白质工程简明教程

黄迎春 主编  
赵 伟 万 平 副主编



化学工业出版社

· 北京 ·

蛋白质工程是在基因重组技术、生物化学、分子生物学、分子遗传学等学科的基础上，融合了蛋白质晶体学、蛋白质动力学、蛋白质化学和计算机辅助设计等多学科而发展起来的新兴研究领域。其内容主要是：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、空间结构与生物学功能之间的关系，实现从氨基酸序列预测蛋白质的空间结构和功能；设计合成具有特定功能的全新的蛋白质。

本书是作者在科研和教学工作的基础上，参考国内外有关文献资料编写而成，主要内容包括蛋白质的结构、蛋白质结构分析技术、蛋白质结构预测、蛋白质的修饰、蛋白质的分离纯化、蛋白质分子设计、蛋白质组学及蛋白质工程的应用。本书力求简洁、生动，希望能在较少的课时中使学生对蛋白质工程领域有清楚的认识，书中列举了大量的实例，便于学生在今后的工作中借鉴、参考。

本书适合作为高等学校生物工程、生物技术、生物科学及相关专业教材。

## 图书在版编目(CIP)数据

蛋白质工程简明教程/黄迎春主编. —北京: 化学工业出版社, 2009. 7

ISBN 978-7-122-06538-4

I. 蛋… II. 黄… III. 蛋白质-生物工程-教材  
IV. TQ93

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 147975 号

---

责任编辑: 李植峰 梁静丽  
责任校对: 郑捷

文字编辑: 焦欣渝  
装帧设计: 周遥

---

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)  
印 装: 北京云浩印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张 11¼ 字数 293 千字 2009 年 7 月北京第 1 版第 1 次印刷

---

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899  
网 址: <http://www.cip.com.cn>  
凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

---

定 价: 26.00 元

版权所有 违者必究

# 《蛋白质工程简明教程》编写人员

主 编 黄迎春（北京联合大学）

副主编 赵 伟（北京联合大学）

万 平（北京农学院）

参编人员（按姓名笔画排列）

万 平（北京农学院）

王 力（总装备部后勤部防疫大队）

刘京国（北京农学院）

张君胜（江苏畜牧兽医职业技术学院）

赵 伟（北京联合大学）

赵有玺（北京联合大学）

徐 芳（北京联合大学）

黄迎春（北京联合大学）

冀颐之（北京联合大学）

# 前 言

生物工程（现代生物技术）是 20 世纪 70 年代初开始兴起的一门新兴的综合性应用学科，是对生物有机体在分子、细胞或个体水平上通过一定的技术手段进行设计操作，以改良生命大分子的性质或生产特殊用途的生物大分子。它与微电子技术、新材料技术和新能源技术并列为影响未来国计民生的四大科学技术支柱，被认为是 21 世纪世界知识经济的核心，主要包括基因工程、细胞工程、蛋白质工程（包括酶工程）、微生物工程（发酵工程）。

蛋白质工程是在基因重组技术、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、蛋白质化学和计算机辅助设计等多学科而发展起来的新兴研究领域。其内容主要是：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、空间结构与生物学功能之间的关系，实现从氨基酸序列预测蛋白质的空间结构和功能；设计合成具有特定功能的全新的蛋白质。

本书是编者在科研和教学工作的基础上，参考国内外有关文献资料编写而成，主要内容包括蛋白质的结构、蛋白质结构分析技术、蛋白质结构预测、蛋白质的修饰、蛋白质的分离纯化、蛋白质分子设计、蛋白质组学及蛋白质工程的应用。本书力求简洁、生动，希望能在较少的课时中使学生对蛋白质工程领域有清楚的认识，书中列举了大量的实例，便于学生在今后的工作中借鉴、参考。

目前有关蛋白质工程方面的书籍大多数是研究型高等院校高年级和研究生的教材，本教材主要面向应用型本科层次的生物技术、生物工程、医药、食品加工、轻工、农牧业、环境保护等专业学生，也可供从事相关研究和生产的技术人员参考。

本书共分为九章，由北京联合大学黄迎春主编，具体编写分工为：黄迎春编写第一、第二章，解放军总装备部后勤部防疫大队王力编写第三章，北京联合大学冀颐之编写第四章，北京联合大学赵有玺编写第五章，江苏畜牧兽医职业技术学院张君胜编写第六章，北京农学院刘京国编写第七章，北京联合大学徐芳编写第八章，北京农学院万平编写第九章，北京联合大学赵伟负责组织协调工作。北京联合大学生物化学工程学院生物工程专业 04 级的任超、申婷婷、毛德奎、赵辉、娄义、刘一夫等同学参加了部分资料的收集整理工作。本书在编写过程中得到北京联合大学和北京联合大学生物化学工程学院精品教材项目经费的支持。在全书的编写过程中，编者参考了大量国内外相关的书籍和文献，在此向这些专家和同行们表示衷心的感谢！

本书的编写出版是校校结合、校企结合的结晶，然而，蛋白质工程发展迅速，加之编者水平有限，书中难免有不足之处，恳请广大读者批评指正。

编 者

2009 年 5 月

# 目 录

<b>第一章 绪论</b> .....	1
<b>第一节 概论</b> .....	1
一、蛋白质工程的诞生 .....	1
二、蛋白质工程的概念 .....	1
<b>第二节 蛋白质工程研究内容</b> .....	2
一、蛋白质的结构与功能 .....	2
二、结构、功能设计和预测 .....	2
三、蛋白质结构的修饰 .....	3
<b>第三节 蛋白质工程主要研究技术</b> .....	3
一、蛋白质结构分析技术 .....	3
二、蛋白质分离纯化 .....	3
三、蛋白质组学 .....	3
<b>第四节 蛋白质工程发展简史</b> .....	3
<b>第五节 蛋白质工程应用</b> .....	5
一、研究蛋白质结构与功能的关系 .....	5
二、改变蛋白质特性 .....	5
三、设计和研制新型抗体 .....	6
四、设计和研制多肽及蛋白质类药物 .....	6
五、设计生物计算机 .....	7
<b>参考文献</b> .....	7
<b>第二章 蛋白质的结构与功能</b> .....	9
<b>第一节 蛋白质的基本结构单位及蛋白质一级结构</b> .....	9
一、蛋白质的分子组成 .....	9
二、肽与多肽链 .....	12
三、蛋白质一级结构 .....	13
<b>第二节 蛋白质的二级结构</b> .....	13
一、肽键平面——二级结构的基础 .....	13
二、稳定蛋白质空间构象的作用力 .....	14
三、蛋白质二级结构的基本形式 .....	15
<b>第三节 蛋白质的超二级结构和结构域</b> .....	20
一、超二级结构 .....	20
二、结构域 .....	22
<b>第四节 蛋白质的三级结构和四级结构</b> .....	23
一、蛋白质的三级结构 .....	23
二、蛋白质的四级结构 .....	24
<b>第五节 蛋白质结构与功能的关系</b> .....	25
一、蛋白质一级结构与功能的关系 .....	25
二、蛋白质空间构象与功能的关系 .....	26
<b>本章小结</b> .....	27
<b>参考文献</b> .....	28
<b>第三章 蛋白质结构分析技术</b> .....	29
<b>第一节 蛋白质的氨基酸序列分析技术</b> .....	29
一、化学方法 .....	29
二、基因方法 .....	32
三、蛋白质测定的新技术 .....	32
四、蛋白质分子中二硫键和酰胺基位置的确定 .....	34
<b>第二节 X射线晶体衍射分析</b> .....	34
一、分析原理 .....	35
二、分析步骤 .....	36
三、现状与展望 .....	37
四、技术的局限性 .....	38
<b>第三节 核磁共振</b> .....	38
一、基本原理 .....	39
二、NMR测定蛋白质溶液三级结构 .....	40
三、生物NMR实验技术 .....	41
四、NMR在蛋白质研究中的应用 .....	42
五、展望 .....	43
<b>第四节 质谱技术</b> .....	44
一、质谱技术的分类及原理 .....	44
二、质谱技术在蛋白质结构测定中的应用 .....	46
<b>第五节 生物三维电子显微学</b> .....	49
一、概述 .....	49
二、三维电子显微学基本原理 .....	50
三、低温电镜技术 .....	51
四、生物电镜成像相关的几个因素 .....	52
五、生物三维电镜的应用领域 .....	53
<b>本章小结</b> .....	56
<b>参考文献</b> .....	57

<b>第四章 蛋白质结构预测</b> .....	58		
<b>第一节 蛋白质的序列分析</b> .....	58	一、常用的蛋白质序列数据库 .....	69
一、序列同源性分析 .....	58	二、常用的蛋白质结构数据库 .....	71
二、双重序列对比 .....	59	<b>第五节 应用生物信息学方法预测蛋白质</b>	
三、多重序列对比 .....	63	<b>结构</b> .....	72
<b>第二节 蛋白质二级结构的预测</b> .....	66	一、蛋白质序列检索 .....	72
<b>第三节 蛋白质三维结构的预测</b> .....	67	二、蛋白质基本性质分析 .....	73
一、三维结构的预测方法 .....	67	<b>第六节 蛋白质结构预测实例</b> .....	74
二、同源模型化方法 .....	68	<b>本章小结</b> .....	75
<b>第四节 蛋白质结构预测中的主要生物信息</b>		<b>参考文献</b> .....	76
<b>学资源</b> .....	69		
<b>第五章 蛋白质的修饰与克隆表达</b> .....	77		
<b>第一节 蛋白质的化学修饰</b> .....	77	<b>第三节 蛋白质的克隆表达</b> .....	88
一、蛋白质侧链基团的修饰反应 .....	78	一、目的基因的获得 .....	88
二、基于蛋白质片段的嵌合修饰 .....	80	二、基因工程载体 .....	91
三、蛋白质位点专一性的修饰 .....	81	三、目的序列与载体的连接 .....	95
四、蛋白质的 PEG 修饰 .....	82	四、基因序列导入细胞 .....	96
<b>第二节 蛋白质的分子生物学改造</b> .....	83	五、目的基因序列克隆的筛选与鉴定 .....	97
一、基因突变技术 .....	83	<b>本章小结</b> .....	98
二、基因融合 .....	87	<b>参考文献</b> .....	99
<b>第六章 蛋白质纯化</b> .....	100		
<b>第一节 蛋白质分离纯化概述</b> .....	100	<b>第四节 色谱技术</b> .....	109
一、蛋白质纯化的原理 .....	100	一、吸附色谱 .....	110
二、分离纯化的方法 .....	100	二、凝胶色谱 .....	111
三、蛋白质分离纯化的一般程序 .....	100	三、离子交换色谱 .....	112
<b>第二节 纯化前处理</b> .....	102	四、亲和色谱 .....	114
一、细胞破碎方法 .....	102	五、高效液相色谱 .....	116
二、蛋白质提取 .....	104	六、分配色谱 .....	118
<b>第三节 蛋白质的初级纯化</b> .....	105	七、疏水色谱 .....	118
一、沉淀法 .....	105	八、聚焦色谱 .....	119
二、透析 .....	108	<b>本章小结</b> .....	119
三、超滤 .....	109	<b>参考文献</b> .....	120
<b>第七章 蛋白质分子设计</b> .....	121		
<b>第一节 概述</b> .....	121	五、翻译后修饰位点突变 .....	127
一、蛋白质分子设计的概念与意义 .....	121	<b>第三节 天然蛋白质的剪裁</b> .....	128
二、蛋白质设计的分类 .....	121	一、抗体剪裁 .....	128
三、蛋白质设计的基础 .....	121	二、蛋白质关键残基嫁接 .....	131
四、蛋白质分子设计的流程 .....	122	<b>第四节 蛋白质分子全新设计</b> .....	132
<b>第二节 部分氨基酸的突变</b> .....	123	一、蛋白质分子全新设计的程序 .....	132
一、根据结构信息确定碱基突变 .....	124	二、蛋白质结构的全新设计 .....	133
二、随机突变 .....	124	三、蛋白质功能的全新设计 .....	135
三、缺失突变分析和接头分区突变 .....	124	四、蛋白质全新设计的现状和前景 .....	137
四、利用蛋白质的同源性确定功能		<b>本章小结</b> .....	137
<b>残基</b> .....	125	<b>参考文献</b> .....	137

<b>第八章 蛋白质组学</b> .....	139		
<b>第一节 概述</b> .....	139	<b>四、蛋白质芯片技术</b> .....	154
一、蛋白质组的概念 .....	139	<b>第三节 蛋白质组学的应用和发展趋势</b> .....	155
二、蛋白质组学的研究历史 .....	140	一、蛋白质组学与微生物 .....	155
三、蛋白质组学的研究内容 .....	142	二、蛋白质组学与医学 .....	155
四、蛋白质组学的特点 .....	143	三、蛋白质组学与药学 .....	156
<b>第二节 蛋白质组学研究技术</b> .....	145	四、蛋白质组学研究中存在的问题及 前景展望 .....	156
一、二维聚丙烯酰胺凝胶电泳技术 .....	145	<b>本章小结</b> .....	157
二、质谱技术 .....	148	<b>参考文献</b> .....	158
三、酵母双杂交体系 .....	153		
<b>第九章 蛋白质工程的应用</b> .....			159
<b>第一节 蛋白质工程在医药中的应用</b> .....	159	一、在畜牧业中的应用 .....	175
一、抗体工程的应用 .....	159	二、在农业生产中的应用 .....	176
二、抗体酶的应用 .....	163	<b>第四节 蛋白质工程在环境保护中的     应用</b> .....	177
三、融合蛋白质的应用 .....	165	一、水的净化 .....	177
四、蛋白质工程酶的应用 .....	166	二、清除白色污染 .....	177
<b>第二节 蛋白质工程酶在食品、轻工业中     的应用</b> .....	167	三、环境监测 .....	177
一、在食品、饮料和酿造业中的应用 .....	167	四、处理工业“三废” .....	177
二、在轻工业中的应用 .....	174	<b>本章小结</b> .....	178
<b>第三节 蛋白质工程在农牧业中的应用</b> .....	175	<b>参考文献</b> .....	178



# 第一章

## 绪 论

### 第一节 概 论

#### 一、蛋白质工程的诞生

生物技术的兴起使得分子生物学理论与工程实践密切结合。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。基因工程的发展，特别是 DNA 重组技术和基因定点诱变等技术的建立，使人们能够从基因水平改造蛋白质分子中的氨基酸序列，为蛋白质工程的诞生奠定了技术基础；进入 80 年代，结构生物学揭示了大量蛋白质分子的精确立体结构及其与复杂生物功能的关系，为设计改造天然蛋白质提供了蓝图。两方面的融合，促成了生物工程领域中蛋白质工程的诞生。

1983 年，美国 Genex 公司 K. Ulmer 在《Science》上发表了以《Protein Engineering》为题的专论，第一次提出蛋白质工程的概念，并建立了专门的研究实体，制订了相应研究开发计划，标志着蛋白质工程的正式诞生。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、分子遗传学等学科基础上，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学科，是以蛋白结构和功能为基础，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”

蛋白质工程的研究在过去 20 多年里发展迅速，已经取得了一系列成果，一些经过蛋白质工程改造的酶和制剂相继生产，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。

#### 二、蛋白质工程的概念

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。狭义的蛋白质工程就是通过对蛋白质已知结构和功能的了解，借助于计算机辅助设计，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，通过重组技术将改造后的基因克隆到特定的载体上，并使之在宿主中表达，从而获得具有特定生物功能的蛋白质，并深入研究这些蛋白质的结构与功能的关系。所以，蛋白质工程包括：蛋白质的分离纯化，蛋白质结构、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。

蛋白质工程的研究，一方面根据需要合成具有特定氨基酸序列和空间结构的蛋白质；另一方面是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蛋白质，并最终生产出性能比自然界存在的蛋白质更加优良、更加符合人类社会需要的新型蛋白质。即根据人类的需要改造天然蛋白质或设计创造自然界没有的新蛋白质，提高其开发利用价值，这是蛋白质工程最根本的目标之一。

作为一种新型的强有力的研究手段，蛋白质工程对一些基本生物学问题的研究和解决，发挥了重要的作用。从酪氨酸 tRNA 合成酶开始，现在已经广泛地运用蛋白质工程方法来研究各种蛋白质的结构与功能、蛋白质折叠、蛋白分子设计等一系列基本分子生物学问题。由于基因定位诱变的自如性，使这方面的工作突破了过去所有方法的局限性，使有关研究达到前所未有的深度和广度。

实现蛋白质工程目标有三个环节的工作要做。第一，用结晶学技术诱生、培养获得蛋白质晶体，而且尽可能得到微晶；利用 X 射线技术通过晶体衍射仪收集衍射数据，经等密度图转换，对晶体进行测量、分析，确定蛋白质的三维结构。第二，借助电子计算机对蛋白质进行选择修饰，通过模拟三维图像进行能量计算和动力学研究，从氨基酸化学结构预见空间结构，也可通过建立数据库、专家系统和人工智能等途径确定蛋白质结构和功能的关系，找到所要修饰的位点。第三，通过改变编码蛋白质的基因的核苷酸实现蛋白质结构的改变，这首先需要了解基因序列，然后通过定点突变技术进行碱基替换，这建立在一整套的基因操作技术基础之上。

## 第二节 蛋白质工程研究内容

### 一、蛋白质的结构与功能

蛋白质工程是以蛋白质的结构与功能的关系为基础，了解蛋白质的一级结构以及由此而形成的不同的结构层次是关键。蛋白质一般由若干条多肽链组成，每条多肽链由 20 种氨基酸按一定顺序连接而成，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形成稳定结构，主要有  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲等几种；在此基础上进一步折叠、卷曲成球状分子（即三级结构）。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基础上形成超二级结构和结构域两个结构层次。通过非共价作用使两个或多个亚基聚集在一起，形成寡聚蛋白结构形式，成为蛋白质的四级结构。

蛋白质的功能与蛋白质特定的空间构象密切相关，蛋白质构象发生变化时，使其功能活性也随之改变。

### 二、结构、功能设计和预测

根据对天然蛋白质结构与功能分析建立起来的数据库里的数据，可以预测蛋白质氨基酸序列的空间结构和生物功能；反之，也可以根据特定的生物功能，设计蛋白质的氨基酸序列和空间结构。通过基因重组等实验可以直接考察分析结构与功能之间的关系；也可以通过分子动力学、分子热力学等，根据能量最低、同一位置不能同时存在两个原子等基本原则分析计算蛋白质分子的立体结构和生物功能。虽然这方面的工作尚在起步阶段，但可以预见将来能建立一套完整的理论来解释结构与功能之间的关系，用于预测蛋白质的结构和功能。

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的肽链或结构域替换，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、蛋白质结构的修饰

蛋白质的改造,有简单的物理、化学法,生物化学法和复杂的基因重组等多种方法。物理、化学法是对蛋白质进行变性、复性处理,修饰蛋白质侧链官能团,分割肽链,改变表面电荷分布,促进蛋白质形成一定的立体构象等;生物化学法是利用蛋白酶选择性地分割蛋白质,利用转糖苷酶、酯酶等去除或连接不同化学基团,利用转酰胺酶使蛋白质发生交联等。以上方法可以对相同或相似的基团或化学键发生作用。采用基因重组技术或人工合成 DNA,不但可以改造蛋白质,而且可以实现全新蛋白质的合成。

## 第三节 蛋白质工程主要研究技术

### 一、蛋白质结构分析技术

蛋白质工程的核心内容之一就是收集大量的蛋白质分子结构信息,建立结构与功能之间关系的数据库,奠定蛋白质结构与功能之间关系的理论研究基础。三维空间结构测定是验证蛋白质设计的假设,是证明新结构改变了原有生物功能的必需手段。蛋白质空间结构十分复杂,测定难度很大。迄今为止,主要的测定方法是射线晶体衍射法和核磁共振,此外,电子晶体和电子显微学三维重构、扫描隧道显微镜、各种波谱技术(特别是拉曼光谱)、计算机分子图形学、量子力学对构象研究作出了贡献。

### 二、蛋白质分离纯化

研究蛋白质的结构和功能,首先需要获得目的蛋白;通过分子设计获得自然界存在或者不存在的蛋白质,必须通过分离纯化后才能造福于人类。成功的蛋白质分离纯化是非常繁杂但也是令人称奇的工作,无论是从大肠杆菌中提取重组蛋白,还是从动、植物体内分离目的蛋白,都要从以克计量的多种蛋白质、核酸、多糖等复杂混合物中提取毫克(乃至微克)级的高纯度的目的蛋白。目前蛋白质分离纯化已经越来越受到人们的重视,正不断地向着自动化、智能化、快速、高效的方向发展。

### 三、蛋白质组学

与传统的针对单一蛋白质进行的研究相比,蛋白质组学采用高通量和大规模的研究手段,在回答有关生命活动机制的基本问题方面达到空前的规模和速度。它是阐明生命活动本质所不可缺少的基因组研究的后续部分,该研究可以实现与基因组的对接与确认,直接揭示人类重大疾病发生的病理机制。

## 第四节 蛋白质工程发展简史

1926年,Sumner从刀豆中提纯了脲酶,制成结晶纯品,首次证明酶的本质是蛋白质。

1932年,英国化学家Krebs等提出合成尿素的鸟氨酸循环多酶反应途径。

1937年,Krebs公布了三羧酸循环的研究成果,这是糖、脂类和氨基酸彻底氧化的多酶反应途径。

1940年,德国生物化学家Embelen和Megerbof公布了糖酵解途径。随后,脂肪酸氧化和核苷酸代谢途径也相继被阐明。

同时期,我国生物化学家吴宪等提出蛋白质变性学说,这是当时最完备的学说。其基本论点至今仍然适用。他在血液化学方面创立的无蛋白血滤液的制备方法及血糖测定等方法,

迄今还为人们所采用。

1953年，英国生物化学家桑格破译出由17种51个氨基酸组成的牛胰岛素两条多肽链的全部结构。这也是人类第一次弄清多肽链中氨基酸残基的特定序列与蛋白质分子的空间结构的关系。

1965年，中国学者首先在世界上成功地人工合成具有天然生物活力的蛋白质——结晶牛胰岛素。这项成果表明新中国学者在人类认识生命、揭示生命奥秘的历程中向前迈进了一步。

20世纪60年代，Merrifield建立了多肽固相合成技术，该技术对一些含量很少的生物活性肽（如神经肽）的功能和结构研究、有重要应用价值的多肽的大规模制备具有重要意义。

1975年，O'Farrel建立了双向电泳（2-DE）技术，极大提高了对蛋白质的分辨能力，因而可以用于组织与细胞中大规模蛋白质的分离；20世纪90年代，开发的多种图像分析系统与软件，使得大规模样品处理系统如虎添翼。

20世纪80年代末期，Hillenkamp发展了激光解吸质谱，Fenn设计了电喷雾质谱，可以高效、精确地测量生物大分子的质量并测定部分序列，进而用于数据库的检索；Mann等在此基础上，通过建立“肽指纹图谱与肽序列标签”等技术，实现了质谱准确、快速、自动化和大规模鉴定蛋白质的飞跃。

当前，蛋白质工程发展较快。这是因为在进行蛋白质分子设计后，可以应用高效的基因工程来进行蛋白质的合成。

1982年，Winter等首次报道通过基因定点诱变获得改性酪氨酰 tRNA 合成酶。

1983年，Ulmer在《Science》上发表了《Protein Engineering》（蛋白质工程）的专论，标志着蛋白质工程的正式诞生。

1982~1985年期间，Forsht等对酪氨酰 tRNA 合成酶的分子进行了改造，他们根据XRD（X射线衍射）实测该酶与底物结合部位的结构，通过定点突变技术改变与底物结合的氨基酸残基，还用动力学方法测量所得变体酶的活性，深入探讨了酶与底物的作用机制。这是最早的蛋白质工程。

1984年，Perry通过将溶菌酶中Ile3改成Cys3，并进一步氧化生成Cys3-Cys97二硫键，提高了酶的热稳定性，显著改进了这种食品工业用酶的应用价值。

1987年，Forsht通过将枯草杆菌蛋白酶分子表面的Asp99和Glu156改成Lys，而导致了活性中心His64质子 $pK_a$ 从7下降到6，使酶在 $pH=6$ 时的活力提高10倍。工业用酶最佳 $pH$ 的改变预示着其可带来巨大的经济效益。

那些已开始懂得蛋白质工程意义的政府、公司及科研机构，制订出了各自的生产目标，如生产特殊抗体、医学界梦寐以求的“魔弹”型药物免疫球蛋白、精确的治疗药物、特异性疫苗、诊断用药、生物感受器和纯化的药物试剂等。1986年起，日本通产省的一项6年计划投资300亿日元到蛋白质工程上来。著名的美国Cetus公司准备将其预算的15%~20%投放到蛋白质工程上。

蛋白质工程还可对酶的催化活性、底物专一性、抗氧化性、热变性、碱变性等加以改变，可见，蛋白质工程的前景广阔。上述各例是通过关键氨基酸残基的置换与增删进行的蛋白质工程，另一类是根据某种典型的折叠，“从头设计”蛋白质的方法。

1988年，杜邦公司宣布，成功设计并合成了由四段反平行 $\alpha$ -螺旋组成为73个氨基酸残基。这显示，按人们预期要求，通过从头设计，折叠成新蛋白质的目标是可以实现的。预测结构模型法，在奠定分子生物学基础时起到重大作用。

## 第五节 蛋白质工程应用

蛋白质工程的研究已经深入到基因内部,而且所进行的一切改变都是理性的、有目的和有根据的,结果一般是可预期的,而不是盲目的。因此,蛋白质工程从一开始就显示出广阔的发展前景。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,蛋白质工程研究均取得了惊人成就,给生命科学研究带来了深刻的变化。

### 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。蛋白质工程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,在对底物专一性上表现出较大的差异。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(Gly216, Gly226),弹性蛋白酶分别为缬氨酸(Val216)和苏氨酸(Thr226)。Val 和 Thr 侧链比 Gly 大,由于空间位阻的关系,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因静电结合,这决定了其只能专一性地水解精氨酸(Arg)和赖氨酸(Lys)羧基所形成的肽键。Craik 等用定点诱变获得丙氨酸 Ala216、Ala226 和 Ala216-Ala226 三种突变体,他们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。将三个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,不同突变酶表现不同。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,底物精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,而导致催化活性最低。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,只有通过蛋白质工程才能完成蛋白质精细结构改变对其功能影响的研究。

### 二、改变蛋白质特性

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 pH 值的变化、温度变化以及溶剂系统变化条件下分子结构的稳定性等。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进行更换、增加、删除或修饰来实现。

通过酶的结构或局部构象的调整与改造,可大大提高酶的耐高温性、抗氧化能力,增加酶的稳定性和适宜的 pH 值范围,从而获得性质更稳定、作用效率更高的酶用于食品、化工、制革、洗涤等工业生产。这方面已取得了许多成功的实例,如食品工业中用于制备高果

糖浆的葡萄糖异构酶、用于干酪生产的凝乳酶、用于洗涤工业的枯草杆菌蛋白酶等蛋白质工程产品开发利用。

蛋白质工程的目标之一是提高蛋白质的稳定性，在酶反应器中可延长酶的半衰期或增强其热稳定性，也可以延长治疗用蛋白质的贮存寿命或重要氨基酸抗氧化失活的能力。该领域已取得了一些重要研究成果。如人的 $\beta$ -干扰素和白细胞介素-2（白介素-2）的分子结构中，有一个不成对的基团，是游离的，因而很不稳定，会使蛋白质失去活性。通过蛋白质工程修饰这种不稳定的结构，就可以提高这两种抗癌物质的生物活性。美国的Cetus公司成功地修饰了这两种治疗癌瘤的蛋白质，大大提高了它们的稳定性，已用于临床试验并取得了良好的效果。具有抗癌作用的蛋白质工程产品免疫球蛋白是一种高效的治疗癌症药物，它能成为征服癌症的“生物导弹”，即具有对准目标杀死特定癌细胞而不伤害正常细胞的特效。澳大利亚医学科学研究所的一个微生物研究课题组经过多年的研究后发现了激发基因开始或停止产生癌细胞的蛋白质。这种蛋白质在癌细胞生长过程中对癌基因起着开通或关闭的作用。这个发现对于通过蛋白质工程研制鉴别与控制多种类型的血液癌的蛋白质有很好的作用，并为诊断和治疗癌症提供了新的方法。

### 三、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 antimouse 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改造抗体被称为抗体工程，主要包括嵌合抗体、重构抗体、单链抗体、单区抗体及新出现的全套抗体的研究。

### 四、设计和研制多肽及蛋白质类药物

利用生物细胞因子进行人类疾病治疗的独到作用已越来越被人们重视，基因工程技术诞生后首先就被用于生产人体生长激素释放抑制因子和胰岛素等医用蛋白质产品的开发，大大降低了治疗成本。利用大肠杆菌进行真核生物蛋白质表达会遇到生物活性低的问题，解决这些问题的出路是研究开发新的表达系统，如酵母、哺乳动物细胞表达系统，该研究领域已取得较大成效。国内外利用分子设计和定点突变技术获得胰岛素突变体的工作都取得了相当多的成果；干扰素、尿激酶等方面的蛋白质工程研究也都取得进展，即将得到长效、速效、稳定、作用更广的蛋白质药物。医用蛋白质的市场广大，待开发的产品也非常多，利用蛋白质工程技术进行分子设计，通过肽模拟物（peptidomimetics）构象筛选药物等方面的研究更加丰富了蛋白质工程的内容。

重组蛋白质药物在药品中占有重要地位，其主要产品有细胞因子、生长因子和酶。用蛋白质定向进化技术可以选择性地改造这些产品的基因，获取所需的性质，排除不利的活性。

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(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区段拼凑,通过基因工程获得白介素-22-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-22受体结合,进入细胞继而杀死T细胞,因而具有特异性治疗T细胞白血病的作用,并可抑制器官移植的免疫排斥作用,治疗某些自身免疫性疾病。目前已能够产业化生产并应用于临床治疗的基因工程药物有激素类和神经递质类药物、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,同时也提高了人类疾病的防治水平。

### 五、设计生物计算机

随着计算机技术的不断发展,进入了生物集成电路的时代。1978年,美国人McAlear首次提出生物集成电路的概念,随后就有人提出全集成型生物芯片或生物计算机的设想,即用生物技术获得的分子电子元件所制成的产品和装置,即生物芯片计算机(BCC)。实验发现,利用生物材料在分子水平上进行信息传输和处理集成度比传统半导体高10亿到1万亿倍,这是一场真正的变革。已经有人用有机分子制成像硅一样的分子逻辑电路,并实现了加减法运算,麻省理工学院已制成比晶体管的运算速度快得多的有机晶体管,美国科学家还计划将生物芯片植入人脑,以改变大脑功能,提供额外感觉系统。

目前科学家已确定了研制生物计算机所必须解决的关键问题:存储器件、门电路和开关器件、输入/输出器件、接线器件的目标分子。担负计算存储、开关等基本功能的特定蛋白质分子是目标之一,生物计算机在现阶段所面临的关键问题除了有关生物计算机本身及其与之相关的领域(如蛋白质结构与功能的关系)外,再就是利用蛋白质工程对目标蛋白分子进行必要的改造,特别是蛋白质的导电性和稳定性。

由于分子生物学和技术科学的结合,蛋白质工程研究已经完成了几十种蛋白质分子结构的改造,在蛋白质结构与其功能的研究上已获得很多有价值的资料。人们已经初步掌握了基因定位、诱变等蛋白质工程技术程序。在了解蛋白质三维结构与功能的基础上,对突变后的一维线性肽链进行分子设计,从而构建全新的蛋白质分子。当今,在该技术程序的控制手段方面的研究已经获得了突破性进展。

蛋白质工程技术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 $v_{max}$ ,提高反应的催化效率,提高酶对底物的亲和力和增强酶的转移性,提高蛋白质的抗氧化能力,改变酶的别构调节部位,减少反馈抑制,提高产物的产率,增强蛋白质对胞内蛋白酶的抗性,简化催化过程,提高产率,改变酶的底物专一性等。

蛋白质工程的应用领域极为广泛,学者们普遍认为,蛋白质工程是在生物工程领地上冒出的特富魅力的新芽。它不仅可以带动生物工程进一步发展,还可以推动与人类生产、生活关系密切的相关学科的发展,如抗蛋白质变性延缓衰老、遗传病的防治、农牧业遗传育种、生产可再生能源、航天科技、创造新型生物材料等。

### 参 考 文 献

- [1] 季文明,张和春,陈毅力,王武. 蛋白质工程与生物制药. 上海生物医学工程, 1999, 20(4): 21-24.
- [2] Oostra B A, Harvey R, Ely B K, Markham A F and smith A E. Transforming Activity of polyoma vi-

rus middle-T antigen probed by site-directed mutagenesis. *Nature*, 1983, 304: 456-459.

- [3] 唐建国, 茹炳根, 徐长法, 胡美浩, 朱圣庚. 蛋白质工程的研究. *北京大学学报: 自然科学版*, 1998, 34 (2-3): 342-349.
- [4] 刘志昕. 蛋白质工程及其应用前景. *华南热带农业大学学报*, 1999, 5 (1): 39-48.
- [5] 王大成. 蛋白质工程. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [6] 孙毅. 蛋白质工程的研究进展及前景展望. *科技情报开发与经济*, 2006, 16 (9): 162-163.
- [7] 刘贤锡. 蛋白质工程原理与技术. 济南: 山东大学出版社, 2002.
- [8] 汪世华. 蛋白质工程. 北京: 科学出版社, 2008.



## 第二章

# 蛋白质的结构与功能

蛋白质工程的基本目标是，按预期的结构和功能，通过基因修饰或基因合成，对现有蛋白质加以定向改造，设计、构建并最终生产出性能比天然蛋白质更加优良、更加符合人类社会需要的新型蛋白质。这些都必须以蛋白质分子的结构规律及其与生物功能的关系为基础，以天然蛋白质分子的三维结构为基本蓝图。蛋白质是一种含有由 DNA 编码的 20 种 L 型  $\alpha$ -氨基酸，通过  $\alpha$ -碳原子上的取代基间形成的酰胺键连接而成的生物大分子，在其自然状态或活性形式下，都具有特征性且稳定的空间构象。一旦这种专一的空间构象遭到破坏，即使化学结构完全不变，蛋白质的功能也会立即消失。没有特征性的空间构象就没有复杂的蛋白质功能，因此蛋白质工程研究者必须深刻了解和把握蛋白质结构特别是空间构象知识。

蛋白质结构的研究很早就受到许多科学家的关注，并提出了多种假说，但是一直没有得到令人满意的结论。直到 1952 年丹麦生物化学家 Linderstrom-Lang 第一次提出蛋白质三级结构的概念，才使蛋白质结构的研究走上了正确的道路。Linderstrom-Lang 的三级结构概念包括：一级结构，指多肽链中氨基酸的一定的顺序，靠共价键维持多肽链的连接，而不涉及其空间排列；二级结构，指多肽链骨架的局部空间结构，不考虑侧链的构象及整个肽链的空间排列；三级结构，则是指整个肽链的折叠情况，包括侧链的排列，也就是蛋白质分子的空间构象或三维结构。这一概念提出之后，立即被各国科学家所接受。1958 年，英国晶体学家 Bernal 在研究蛋白质晶体结构时发现，并非所有蛋白质的结构都达到三级结构水平，而有些蛋白质则有更复杂的结构，即由几个蛋白质的亚基结合成几何状排列。许多蛋白质是由相同的或不同的亚基组成，靠非共价键结合在一起，他将这种结构称为四级结构。本章将概要介绍蛋白质结构知识，作为蛋白质工程的共同基础。

蛋白质是生命现象的主要体现者，一个真核细胞可有数千种蛋白质，各自有特殊的结构和功能。如酶、抗体、大部分凝血因子、多肽激素、转运蛋白、收缩蛋白等都是蛋白质，但结构和功能截然不同。在物质代谢、机体防御、血液凝固、肌肉收缩、细胞信息传递、个体生长发育、组织修复等方面，蛋白质发挥着不可替代的重要作用。没有蛋白质就没有生命。

## 第一节 蛋白质的基本结构单位及蛋白质一级结构

### 一、蛋白质的分子组成

#### 1. 蛋白质的元素组成

通过元素分析结果证明，所有的蛋白质分子都含有碳、氢、氧、氮、硫等元素，有些蛋白质含有少量磷或金属元素（铁、铜、锌、锰、钴、钼），个别蛋白质还含有碘。

单纯蛋白质的元素组成为：碳 50%~55%，氢 6%~7%，氧 19%~24%，氮 13%~19%。蛋白质的氮元素含量较为稳定，多种蛋白质的平均含氮量约为 16%。由于测定生物样品中的含氮量比测定其中蛋白质的量容易很多，因此，测定生物样品中的蛋白质含量时，可以通过测定生物样品中氮元素含量的方法间接求得蛋白质的大致含量：

$$\text{样品中的蛋白质含量} = \text{样品所测含氮量} \times 6.25 (\text{蛋白质系数})$$

这里，蛋白质系数 6.25 是蛋白质平均含氮量 16% 的倒数。