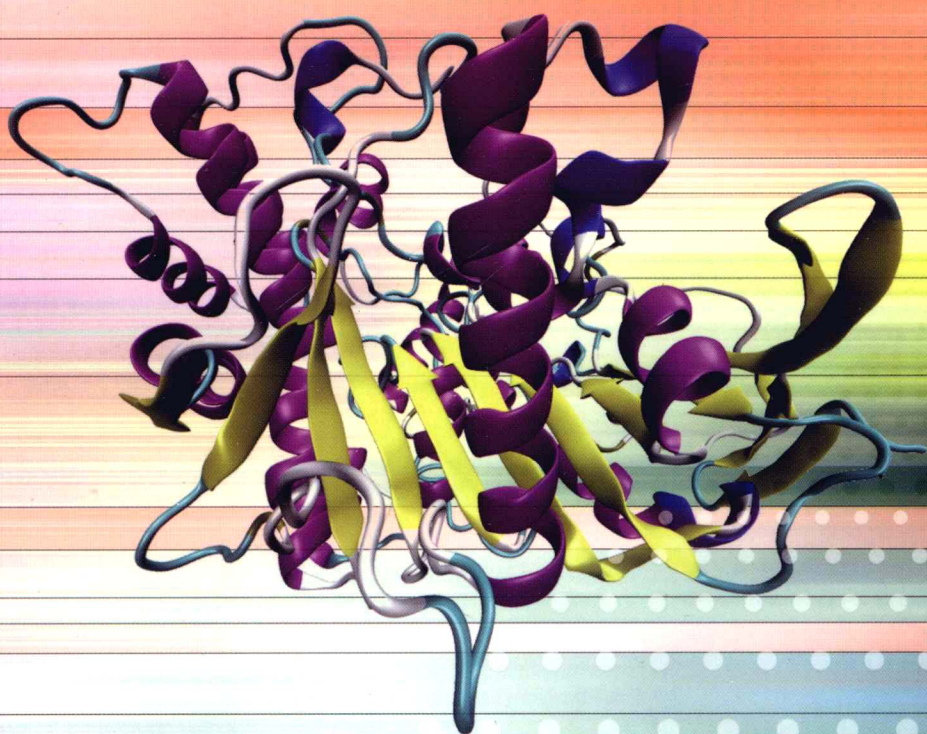


蛋白质分析 实验技术指南

主 编 李 玉 花



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

蛋白质分析 实验技术指南

Danbaizhi Fenxi Shiyān Jishu Zhinan

◎ 主 编 李 玉 花

副主编 张 旻 周 波 蓝 兴 国

编写人员（按姓氏拼音排序）

蓝 兴 国	李 玉 花	聂 玉 哲	解 莉 楠
闫 海 芳	张 旻	周 波	



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

图书在版编目(CIP)数据

蛋白质分析实验技术指南 / 李玉花主编. —北京:

高等教育出版社, 2010. 12

ISBN 978 - 7 - 04 - 031065 - 8

I. ①蛋… II. ①李… III. ①蛋白质 - 分析 -
实验 - 高等学校 - 教材 IV. ①Q51 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 237284 号

策划编辑 王 莉	责任编辑 王超然	封面设计 张 志	责任绘图 尹 莉
责任印制 朱学忠			

出版发行 高等教育出版社	咨询电话 400 - 810 - 0598
社 址 北京市西城区德外大街 4 号	网 址 http://www.hep.edu.cn
邮政编码 100120	http://www.hep.com.cn
印 刷 河北鹏盛贤印刷有限公司	网上订购 http://www.landaco.com
开 本 889×1194 1/16	http://www.landaco.com.cn
印 张 17.5	版 次 2011 年 4 月第 1 版
字 数 500 000	印 次 2011 年 4 月第 1 次印刷
购书热线 010 - 58581118	定 价 36.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物 料 号 31065 - 00

现代生物学的发展从 20 世纪 60 年代开始进入分子水平,20 世纪 90 年代以后进入以基因组学、蛋白组学、代谢组学、转录组学等为代表的组学时代。由于 DNA、RNA 和蛋白质等重要大分子检测技术的发展,使我们对生命的理解进入一个全新的境界,并由此创立了包括分子遗传学、分子细胞生物学、分子生理学、分子生态学和分子进化生物学等众多从分子水平上解析生命过程的科学,推动了包括生物工程和基因治疗等重要应用领域的发展。过去十多年间,高通量核酸、蛋白质和代谢物分析技术的发展引领我们对于生命的研究进入突飞猛进的时代,对包括人类在内的动植物生命过程的了解进入一个革命性的时期。这些开拓性创新迫使每一位选择从事生物学学习和研究的工作者必须清楚了解相关技术手段,也督促所有与生物学相关的大学和科研所在从事理论教学的同时开设相关实验课程。由东北林业大学李玉花教授主编,由高等教育出版社 2007 年出版的《现代分子生物学模块实验指南》一书为许多初次涉足分子生物学的大中专院校的本科生、研究生提供了一套翔实的实验操作指南。在此基础上,李玉花教授又主编了《蛋白质分析实验技术指南》,该书包含非常实用的 8 个模块:蛋白质样品的制备;蛋白质定量、电泳与染色分析;蛋白质的原核表达与纯化;蛋白质与蛋白质相互作用的研究;蛋白质与核酸相互作用的研究;差异表达蛋白质分析;磷酸化蛋白质的检测与分析;蛋白质质谱鉴定。该书的整体设计合理,实用性强,其中特别值得一提的是除了详尽的实验过程描述以外,作者还在每页增加了需要注意事项的说明,有助于解决实验过程中出现的问题。

回顾自己 20 多年的科学研究生涯,我觉得大学期间的实验课程对我的影响非常之大,尽管当时所涉及的实验不是很多,却让我从书本知识走进实验生物学这个绚丽多彩的世界,让我从虚无抽象的知识学习走进了知识获取过程,培养了我的科学研究过程中的实验设计理念。这些在西方的理科教育理念中已经司空见惯的东西离我们还有一定距离。必须意识到,科学的发展已经让我们不再有能力全面掌握知识,掌握获取知识的方法、培养科学研究的能力变得越来越重要,这种能力不光对于一个想从事科学研究的人意义深远,对于日常生活中的是非辨别也非常有用,不会人云亦云,不会产生过多超现实的想法。我认为只有帮助学生了解科学研究过程,才能使成为真正的创新型人才,才不会在知识爆炸的时代中迷失自己,才能真正走进科学的前沿,在未来的科技研发领域中发挥重要作用。

本书可以作为生物类专业本科生和研究生的实验课教材,也可以作为查阅实验方法的实验室日常用书;是研究型教学和科研不可多得的一本好书。

中国科学院植物研究所



刘春明

伴随人类基因组测序的完成,生命科学的研究进入了后基因组学时代。蛋白质是生命活动和功能的执行者,人类基因组中的基因及其功能有待于在蛋白质水平上进行分析和探讨,进而进一步揭示细胞生命活动的奥妙。蛋白质科学已经成为21世纪生命科学研究的热点领域之一。在分子生物学、细胞生物学、发育生物学、遗传学和生物信息学等相关学科发展的基础上,蛋白质科学的研究进入了崭新的时代。

蛋白质科学主要是研究蛋白质结构、表达、定位、翻译后修饰及蛋白质相互作用等方面。蛋白质的物理化学性质,既有共性也有个性的特点。可以通过蛋白质的保守结构预测其生物学的功能,而许多蛋白质性质方面的资料则更多地依靠蛋白质实验而获得。蛋白质实验技术日新月异,研究方法不断更新,使蛋白质科学得到了迅速的发展。

目前,在蛋白质科学研究上,无论是基础研究还是应用研究,都迫切需要一本具有先进性、技术性、实用性和全面性的蛋白质相关的实验技术工具书籍。《蛋白质分析实验技术指南》正是基于蛋白质组学发展的需要,目的在于为读者提供一本具有使用价值的蛋白质技术工具书。本书的编写原则是:使用方便,技术性强,原理精炼,方法经典,同时紧跟时代需要,把最先进的方法和技术提供给读者,使读者在阅读之后,可以根据实验的需求找到适合的技术、方法或路线。

为了加强蛋白质实验内容的完整性和先进性,我们结合自己的科研实践,编写了模块式的实验指南,对实验内容进行了精心选择,并注重将前沿性的技术从科研上借鉴过来,力求实验体系的内容新颖、方法先进、技术全面。即可作为本科、研究生的实验教材,又可为从事相关科研工作的专业人士,提供一本实用的工具书籍。

根据蛋白质组学研究的相关内容,本书共包括8个大的模块实验:模块一,蛋白质样品的制备;模块二,蛋白质定量、电泳与染色分析;模块三,蛋白质的原核表达与纯化;模块四,蛋白质与蛋白质相互作用的研究;模块五,蛋白质与核酸相互作用的研究;模块六,差异表达蛋白质分析;模块七,磷酸化蛋白质的检测与分析;模块八,蛋白质质谱鉴定。这些模块几乎涵盖了蛋白质科学最常用的技术方法,模块间有机结合,独立成章。

本书的突出特点主要体现在:将蛋白质科学的前沿研究技术方法分成若干模块,易学、易懂、易操作,对方法进行了详尽的介绍,同时根据作者的实践经验,总结归纳了每步操作的注意事项及如何对整个操作过程进行优化进而提高成功率;模块配有实验流程图和主要的实验结果图,图文并茂,具有很好的示范作用,能够引起学生的研究兴趣,并且有助于判断结果的正确性。

编者
2010年7月

模块一	蛋白质样品的制备	1
1-1	总蛋白质样品的制备	4
1-2	亚细胞器蛋白质样品的制备	11
1-3	修饰蛋白质样品的制备	20
模块二	蛋白质定量、电泳与染色分析	34
2-1	蛋白质浓度测定	37
2-2	聚丙烯酰胺凝胶电泳	54
2-3	蛋白质凝胶染色分析	66
模块三	蛋白质的原核表达与纯化	73
3-1	蛋白质的原核表达及检测	76
3-2	GST 融合蛋白的纯化	82
3-3	多聚组氨酸融合蛋白的表达与纯化	86
3-4	MBP 融合蛋白的表达与纯化	89
模块四	蛋白质与蛋白质相互作用的研究	93
4-1	酵母双杂交系统检测蛋白质的相互作用	96
4-2	酵母双杂交系统筛选相互作用的蛋白质	102
4-3	免疫共沉淀检测蛋白质的相互作用	108
4-4	蛋白质亚细胞共定位	112
4-5	融合蛋白沉降技术分析蛋白质的相互作用	117
模块五	蛋白质与核酸相互作用的研究	121
5-1	启动子调控元件分析	124
5-2	电泳迁移率实验分析	134
5-3	染色质免疫沉淀法分析	142
5-4	细胞瞬时相互作用分析	149
5-5	酵母单杂交分析	153
5-6	PCR 辅助蛋白质-DNA 序列特异性分析	167
模块六	差异表达蛋白质分析	173
6-1	双向电泳法分析差异表达蛋白质	176
6-2	荧光标记差异分析凝胶电泳法分析差异表达蛋白质	188
6-3	同位素标记法分析差异表达蛋白质	199
模块七	磷酸化蛋白质的检测与分析	205
7-1	^{32}P 放射性标记检测	208
7-2	PRO-Q Diamond 染色法	212
7-3	磷酸化抗体检测法	224
7-4	亲和富集法	230
7-5	固相金属离子亲和色谱法	235

II 目 录

7-6	强阳离子交换色谱(SCX)法	240
7-7	磷酸化肽段和磷酸化位点的质谱鉴定	243
模块八	蛋白质质谱鉴定	247
8-1	凝胶分离样品的质谱鉴定	250
8-2	液相色谱分离样品的质谱鉴定	262

模块一

蛋白质样品的制备

- 1-1 总蛋白质样品的制备
- 1-2 亚细胞器蛋白质样品的制备
- * 1-3 修饰蛋白质样品的制备

模块实验目的与流程图



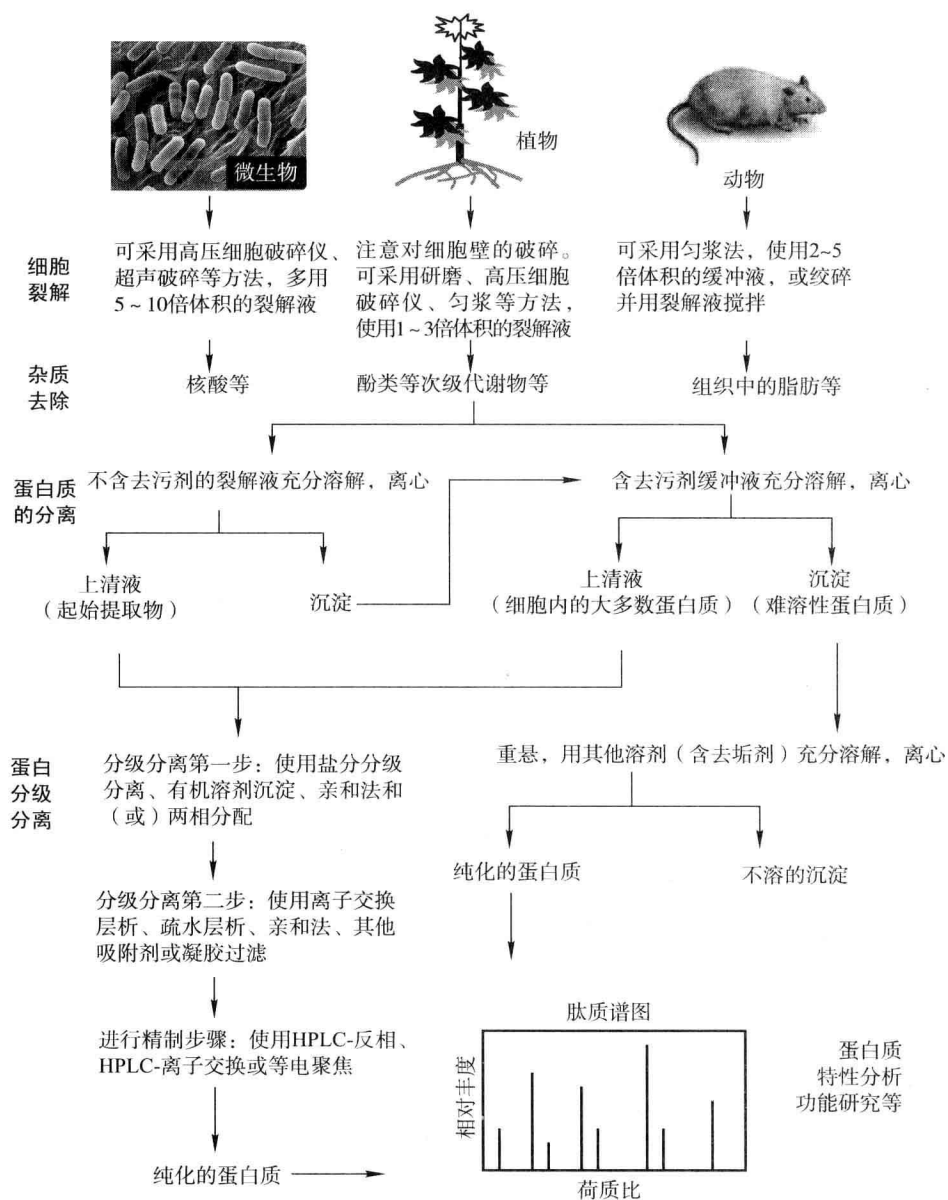
模块实验目的

蛋白质组学(proteomics)是后基因组时代研究细胞生命活动的重要策略之一,主要研究细胞内蛋白质群体的结构、组成和功能,着重对其时间、空间及功能上的变化进行动态分析。

蛋白质样品制备是蛋白质研究的第一步,是后续的蛋白质分离与鉴定的基础,直接关系到后续实验的结果。随着蛋白质组学研究的开展,针对不同生物、组织、细胞、细胞器和不同类型蛋白质发展出了众多的蛋白质样品制备的方法。在具体实验方案制定中,首要工作是针对研究目标制定合适的蛋白质样品制备方案,需要考虑诸如实验对象是植物样本还是动物样本,进行总蛋白质研究还是磷酸化蛋白研究,是核蛋白还是膜蛋白,后续实验是进行双向电泳还是需要进行色谱法分离等问题,根据具体需要权衡众多方法的优点和不足来确定实验方案。

本模块主要介绍蛋白质样品的制备,其中包括总蛋白质、亚细胞器蛋白质和修饰蛋白质的样品制备过程,文中将对这些常用方法的原理、步骤、应用和注意事项等方面进行叙述。希望本模块的内容能帮助相关研究人员掌握蛋白质样品制备的不同策略、主要流程及基本方法。

模块流程图



蛋白质制备的大致流程

1-1 总蛋白质样品的制备

蛋白质组学主要研究细胞蛋白质的表达情况,获得蛋白质的表达谱等信息,其研究对象不是单一一种蛋白,而是大规模的蛋白质。从这个角度而言,所制定的研究方案要能够尽可能获得更丰富的蛋白质。生物体内蛋白质种类繁多,表达丰度差异巨大,物化特性多样,真正做到总蛋白质的制备难度很大。总蛋白质样品的制备实际上是相对的概念,在具体实验操作中需要根据基本的样品制备原则,进行分步、分级制备,以获得种类相对丰富的蛋白质。其过程主要涉及细胞破碎、蛋白质沉淀和蛋白质溶解。

目前针对不同的生物材料、组织、细胞及特定目的蛋白已经发展出了很多成熟的制备方法,在制订实验方案时可以参照文献和经验建立相应的提取方法,以制备高质量的蛋白质样品。总体说来主要遵循以下原则:

1. 用尽量简单的方法,获得尽可能丰富的目的蛋白,同时要尽可能地去起干扰作用的高丰度或无关蛋白质,在减少蛋白质损失的同时保证待研究蛋白质的检测效果。
2. 应使所有待分析的蛋白质样品全部处于溶解状态(包括多数疏水性蛋白),且制备方法应具有可重现性。
3. 减少在蛋白质提取过程中可能对蛋白质造成人为修饰的操作。如当样品中存在尿素时,不要将样品保存于 37 °C,这样会使尿素转化为能够修饰蛋白质的异氰酸酯。
4. 注意结合后续实验的具体要求设计总蛋白样品制备的实验方案,如后续采用等电聚焦分离则需注意降低离子浓度,这就需要在样品制备中注意控制离子浓度或在样品制备后进行脱盐处理;如后续实验为二维液相色谱(PF-2D)分离,则要注意在样品制备中不要使用离子型去污剂。



实验目的

掌握蛋白质样品制备的总体原则,结合实验目的设计总蛋白质样品制备的技术流程。掌握针对不同性质、不同组织、不同器官的总蛋白质样品制备方案。掌握实验中主要试剂的作用,进而在蛋白质样品制备中选择合适的试剂。



实验原理

蛋白质在组织或细胞中以复杂的混合物形式存在。每种类型的细胞都含有上千种不同的蛋白质,蛋白质的分离(separation)、提纯(purification)和鉴定(characterization)是生物学研究领域的重要部分,至今还没有一个单独的或一套现成的方法能够把任何一种蛋白质从复杂的混合蛋白质中提取出来,而多采取几种方法联合使用。蛋白质样品制备是一门艺术,方法从简单的缓冲液溶解,到应用离液剂、还原剂及去污剂来进行复合物的提取,以及到更复杂的顺序提取和亚细胞分离。尽管方法诸多,但总的说来,总蛋白质样品的制备主要为3个步骤:细胞破碎、蛋白质沉淀和蛋白质裂解。

1. 细胞破碎^{*1}

根据破碎程度分为温和的破碎方法(表1-1-1)和强烈的破碎方法(表1-1-2)。根据破碎方法分为机械方法和化学方法两类。一般来说,机械方法属于比较强烈的破碎方法,化学方法则属于温和的破碎方法。

^{*1} 为避免细胞破碎时释放出的蛋白酶及其他引起蛋白质修饰的酶,在实验中应加入蛋白酶抑制剂,同时在操作中保持低温。

表 1-1-1 温和的破碎方法

方法	适用对象	操作步骤
渗透法 ^{*2}	血细胞 组织培养细胞	细胞悬浮于渗透溶胞溶液中,细胞溶胀后释放细胞内容物
冻融法	细菌细胞、组织培养细胞	利用液氮快速反复冻融细胞来破碎细胞膜
裂解液法	组织培养细胞	将细胞置于含有去垢剂的裂解液中悬浮,使细胞裂解
酶裂解 ^{*3}	植物细胞、细菌细胞、真菌细胞	细胞悬浮于含有特定酶的等渗溶液中,通过酶解去除细胞壁来裂解细胞

^{*2} 非常温和的破碎方法,可用于进一步亚细胞分级。

^{*3} 用于不易破碎或具有坚硬细胞壁细胞。

表 1-1-2 比较强烈的破碎方法

方法	适用对象	操作步骤
超声波法 ^{*4}	悬浮细胞	超声波仪处理悬浮细胞,利用超声波产生的剪切力来破碎细胞
研磨法 ^{*5}	固体组织 微生物细胞	组织或细胞液氮冷冻,研钵中研成粉末
匀浆法	固体组织 细菌悬液	组织切成块,加入含蛋白酶抑制剂的冷匀浆液匀浆,过滤或离心收集
压力杯法 ^{*6}	微生物细胞 含细胞壁细胞	细胞悬浮液置于预冷压力杯中,利用高压使细胞穿过小孔,产生剪切力破碎细胞,收集挤出液

^{*4} 需间歇处理,以减少产生的热和泡沫,样品处理应在冰浴中进行。

^{*5} 可加入氧化铝或砂,有助于研磨。

^{*6} 压力杯:French press cell。

2. 蛋白质沉淀

蛋白质分子凝集从溶液中析出现象称为蛋白质沉淀(precipitation),蛋白质所形成的亲水胶体颗粒具有两种稳定因素,即颗粒表面的水化层和电荷。在没有外加条件的情况下,蛋白质颗粒间不互相凝集,但是,当除掉这两个稳定因素(如调节溶液 pH 至等电点和加入脱水剂)后,蛋白质便容易凝集析出。

如将蛋白质溶液 pH 调节到等电点,蛋白质分子呈等电状态,虽然分子间同性电荷相互排斥的作用消失了,但是还有水化膜起保护作用,一般不至于发生凝集作用,如果这时再加入某种脱水剂,除去蛋白质分子的水化膜,则蛋白质分子就会互相凝集而析出沉淀;反之,若先使蛋白质脱水,然后再调节 pH 到等电点,也同样可使蛋白质沉淀析出。

蛋白质沉淀的方法通常也可作为蛋白质样品浓缩的一种方法,来获得高浓度的蛋白质溶液。蛋白质沉淀的方法见表 1-1-3。

表 1-1-3 蛋白质沉淀的方法

盐析 ^{*7}	
常用试剂	硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠
原理	将盐加到蛋白质溶液中,高浓度的盐离子(如硫酸铵的 SO_4^{2-} 和 NH_4^+)有很强水化力,可夺取蛋白质分子的水化层,使之“失水”,于是蛋白质胶粒凝集并沉淀析出
一般过程	在含有 EDTA(>50 mmol/L)的缓冲液中处理蛋白质,使蛋白质的最终浓度大于 1 mg/mL。慢慢地将硫酸铵加至饱和度,搅拌 $10\sim 30$ min,离心收集蛋白质

^{*7} 一般在低盐浓度下随着盐浓度升高,蛋白质的溶解度增加,此称盐溶;盐浓度继续升高时,蛋白质的溶解度不同程度地下降并先后析出,称为盐析。

续表	
缺点	不能获得所有蛋白质,残留的硫酸铵会影响等电聚焦 ^{*8}
有机溶剂沉淀	
常用试剂	TCA、丙酮、乙醇、丁醇
原理	有机溶液因稀释水浓度而降低水活性,蛋白质亲水性区域的水合度降低,开始聚集在一起,产生沉淀
一般过程	样品悬浮于含 0.07% β-巯基乙醇的 10% TCA 溶液中。-20℃沉淀蛋白质至少 45 min,离心收集蛋白质沉淀,用含有 0.07% β-巯基乙醇的预冷丙酮溶液清洗。冷冻干燥除去残留的丙酮
缺点	蛋白质很难再溶。长时间暴露于低 pH 溶液中,蛋白质会被降解和修饰
高盐与有机溶剂结合	
常用试剂	乙酸铵、甲醇、丙酮等
一般过程	样品中的蛋白质被抽提进入酚中,酚相用含有 0.1 mol/L 乙酸铵的甲醇溶液沉淀蛋白质,沉淀用含有乙酸铵的甲醇溶液清洗后用丙酮清洗,最后将残留的丙酮蒸发掉
缺点	复杂且费时

^{*8} 蛋白质在用盐析沉淀分离后,通常采用透析法将蛋白质中的盐除去。此外也可用葡萄糖凝胶 G-25 或 G-50 柱层析法除盐。

3. 蛋白质裂解

为获得最佳的后续实验效果,在蛋白质样品的裂解过程中会使用到变性剂、去污剂、还原剂等使其变性并充分溶解^{*9}(表 1-1-4)。蛋白质裂解液的选择要兼顾其“产量”及对后续实验的影响。蛋白质裂解液的配方有很多种,如何选择合适的蛋白质裂解液是获得理想的蛋白质样品的第一步。含 SDS(十二烷基硫酸钠)和强离子去污剂(脱氧胆酸钠)的蛋白质裂解液能从组织或细胞中提取出大量的蛋白质,却很容易使蛋白质变性。这会干扰后续的免疫印迹中抗体对抗原表位的识别。

^{*9} 在变性剂和表面活性剂联用条件下,加用还原剂可使已变性的蛋白质展开更完全,溶解更彻底。

表 1-1-4 蛋白质裂解中的常用试剂

种类	作用原理
变性剂	改变氢键等次级键结构,使蛋白质充分伸展,将其疏水中心完全暴露,降低接近疏水残基的能量域 常用试剂:尿素、硫脲
去污剂 ^{*10}	破坏蛋白质分子之间的疏水相互作用。经过变性剂处理而暴露蛋白质的疏水基团后,还常需至少一种去污剂来溶解疏水基团 常用试剂:SDS、Triton X-100、NP-40、CHAPS、OBG、ASB-14
还原剂	断裂蛋白质分子 Cys 残基之间的二硫键,增加蛋白质的溶解性 常用试剂:β-巯基乙醇、DTT 或 DTE、TBP

^{*10} 去污剂的使用需注意其离子特性。阴离子去污剂:SDS;非离子去污剂:Triton X-100、NP-40;两性离子去污剂:CHAPS、OBG、ASB-14。



实验准备

1. 主要仪器设备

微量移液器、高速离心机、超速离心机^{*11}、超声破碎仪、研钵。

2. 实验材料

培养细胞、植物或动物组织、细菌培养液。

3. 主要试剂

(1) 常用裂解液^{*12}

裂解液 A(适于提取水溶性蛋白):

40 mmol/L

Tris - base(pH 9.5)

裂解液 B(经典配方):

8 mol/L

尿素

4%^①

CHAPS

40 mmol/L

Tris - base

1%

DTT

1%

蛋白酶抑制剂^{*13}

基于经典配方的裂解液配方(C-E)^{*14}:

裂解液 C:

7 mol/L

尿素

2 mol/L

硫脲

2%~4%

CHAPS

40 mmol/L

Tris - base

1%

DTT

2%

Pharmalyte(pH 3~10)

1%

蛋白酶抑制剂

裂解液 D:

9.5 mol/L

尿素

2%

CHAPS

1%

DTT

0.8%

Pharmalyte(pH 3~10)

5 mmol/L

Pefabloc 蛋白酶抑制剂

裂解液 E:

9 mol/L

尿素

2%~4%

CHAPS

1%

DTT

2%

Pharmalyte(pH 3~10)

5 mmol/L

蛋白酶抑制剂

^{*11} 一般认为,转速为 10 000~25 000 r/min 的离心机称为高速离心机;转速超过 25 000 r/min,离心力大于 89 000 *g* 者称为超速离心机。目前超速离心机的最高转速可达 100 000 r/min,离心力超过 500 000 *g*。

^{*12} 裂解液一般为新鲜配制或分装后存储于 -20 °C 备用。

^{*13} 蛋白酶抑制剂(a cocktail of protease inhibitors)和 DTT 通常在使用前加入。

^{*14} 裂解液 C-E 可用于分步提取。

① 每 100 mL 溶液中加入 4 g 试剂,即 40 g/L,习用 4% 表示,此类余同。

裂解液 F(适于提取膜蛋白):

5 mol/L	尿素
2 mol/L	硫脲
2%	SB 3 - 10
2%	CHAPS
1%	DTT
0.5%	CA
5 mmol/L	蛋白酶抑制剂

裂解液 G(适于提取难溶的沉淀蛋白):

1%	SDS
0.375 mol/L	Tris - HCl(pH 8.8)
50 mmol/L	DTT
25%(体积分数)	甘油

裂解液 H*¹⁵ (PF - 2D*¹⁶ 适用):

7.5 mol/L	尿素
2.5 mol/L	硫脲
12.5%	甘油
62.5 mmol/L	Tris - HCl
2.5%	正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷
6.25 mmol/L	三(2-羧基乙基)膦盐酸盐 TCEP
1.25 mmol/L	蛋白酶抑制剂

(2) 蛋白酶抑制剂

在组织细胞的破碎过程中,加入二异丙基氟磷酸(DFP)可以抑制或减慢自溶作用;加入碘乙酸可以抑制那些活性中心需要有巯基的蛋白水解酶的活性;加入苯甲磺酰氟化物(PMSF)也能清除蛋白水解酶的活力,实验中可根据实际情况加入(表 1-1-5)。

表 1-1-5 广谱蛋白酶抑制剂混合物

成分	终浓度
PMSF	35 μg/mL(1 mmol/L)
EDTA	0.3 mg/mL (1 mmol/L)
抑肽素(pepstatin)	0.7 μg/mL
亮肽素(leupeptin)	0.5 μg/mL

实验方法

实例 1. 细菌细胞裂解*¹⁷

(1) 向 0.5 mL 细菌细胞沉淀中加入 2.0 mL 裂解液悬浮细胞。剧烈旋涡振荡,冰浴超声悬浮细胞。超声每次 30 s,重复两次。



(2) 裂解产物 18℃*¹⁸, 20 000 g 离心 60 min。



(3) 收集上清液,长期保存可分装后置于-80℃(推荐)或-20℃保存。

* 15 后续实验方法通常会对蛋白质样品制备提出特殊要求,如蛋白质提取后需要进行 PF - 2D 分离,则在蛋白质裂解中避免使用离子型去污剂和高磺基化或含钠离子的物质。

* 16 PF - 2D, ProteomeLab™ PF - 2D; Beckman Coulter, 二维液相色谱分离蛋白质系统。

* 17 欲了解更详细的样品制备信息,可参考:
<http://us.expasy.org/ch2d/protocols/protocols.fml.html>。

* 18 在蛋白质提取操作中一般要保持低温以降低蛋白酶的活性,保证蛋白质的完整性,但在加入裂解液后的离心、溶解过程可采用 15~18℃来防止裂解液沉淀,以获得较好的溶解效果。

实例 2. 组织匀浆法

(1) 取材。



(2) 用研钵在液氮冷冻条件下将样品研成粉末, 每克样品加入 0.5 mL 裂解液, 使用组织匀浆器匀浆 30 s。



(3) 组织悬液 15 °C, 10 000 *g* 离心 10 min。



(4) 上清液 4 °C, 150 000 *g* 超速离心 45 min。



(5) 小心避开上层漂浮的脂质层, 吸取离心上清液, 6 °C, 40 000 *g* 再次离心 50 min。



(6) 取离心上清液。Bradford 法定量, 分装后置 -75 °C 保存。

实例 3. 三氯醋酸-丙酮沉淀法(TCA/acetone precipitation)^{*19}

(1) 取鲜嫩植物^{*20}叶片放入预冷研钵后, 加入液氮, 充分研磨至粉末状。



(2) 于 1.5 mL 离心管中加入 3 倍体积的提取缓冲液[含 10% 三氯醋酸(TCA)和 0.07% β-巯基乙醇(可用 DTT 替代)的丙酮溶液], 将粉末加入到离心管中, 混匀后, -20 °C 过夜。



(3) 4 °C, 40 000 *g*, 离心 1 h 后弃上清液。



(4) 使沉淀重悬浮于等体积的预冷丙酮(含 0.07% β-巯基乙醇)中, 4 °C, 40 000 *g*, 离心 1 h(可重复一次)。



(5) 真空干燥沉淀。



(6) 将沉淀用最小体积的裂解液充分溶解, 可旋涡振荡助溶。



(7) 15 °C, 40 000 *g*, 离心 1 h^{*21}, 上清液即为获得的蛋白质样品, 可分装放于 -80 °C 备用, 临时保存可放于 4 °C。

实例 4. 植物组织分级提取法

(1) 取冻存植物组织, 加入裂解液 A, 液氮浴中匀浆。



(2) 4 °C, 40 000 *g*, 离心 1 h, 收集上清液作为组分 I^{*22}。



(3) 将沉淀用最小体积的裂解液 B^{*23} 充分溶解, 可旋涡振荡助溶。



*19 可用于提取植物树叶总蛋白质。

*20 植物组织纤维素含量较高, 一般取植物纤维素含量低的部位制备样品, 如嫩叶、幼根、种子。

*21 该步骤离心以没有沉淀为标准, 可能需要多次及更长的时间。

*22 组分 I 主要为水溶性蛋白质。

*23 此步裂解液可加入经典配方中的任意裂解液, 或具体实验材料适用的裂解液。

(4) 15 °C, 40 000 g, 离心 1 h, 收集上清液作为组分 II *²⁴。



(5) 将沉淀用最小体积的裂解液 F 充分溶解, 可旋涡振荡助溶。



(6) 15 °C, 40 000 g, 离心 1 h, 收集上清液作为组分 III *²⁵。



(7) 将沉淀用最小体积的裂解液 G 充分溶解, 可旋涡振荡助溶。



(8) 15 °C, 40 000 g, 离心 1 h, 收集上清液作为组分 IV *²⁶。



(9) 蛋白质样品可保存在-80 °C或-20 °C *²⁷。

*²⁴ 组分 II 主要是提取过程中的大部分蛋白质, 蛋白质的溶解性介于水溶性及难溶的膜蛋白之间。

*²⁵ 组分 III 主要为膜蛋白。

*²⁶ 组分 IV 主要为难溶的蛋白质。

*²⁷ 由于蛋白质容易降解, 所以尽量不要长期保存, 且需保存于-80 °C(推荐)或-20 °C。



注意事项与建议

1. 样品制备是实验的开端, 也是整个实验的基础, 合适的样品制备方法是整个实验至关重要的部分, 要给予高度的重视。

2. 蛋白质样品制备过程中通常需要面临蛋白质溶解的问题, 尤其是膜蛋白的提取时, 对疏水性蛋白可使用分步提取法并使用不同的表面活性剂进行处理。

3. 蛋白质提取过程中需要注意对蛋白质的保护, 有些蛋白质易被降解, 可添加蛋白酶抑制剂、还原剂等并尽量保持在低温条件下操作。



参考文献

[1] Sambrook J, Russel D W. 分子克隆实验指南. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.

[2] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2002.

[3] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1999.

[4] Simpson R J. 蛋白质与蛋白质组学实验指南. 北京: 科学出版社, 2003.

???

思考题

1. 蛋白质变性与沉淀的关系是什么?

2. 在制定分步提取植物总蛋白质的策略时需注意哪些问题?