

现代生物技术前沿

夏其昌 曾嵘 等 编著

蛋白质化学与 蛋白质组学



科学出版社
www.sciencep.com

Q51
X292
2004
C.1

现代生物技术前沿

夏其昌 曾嵘 等 编著

蛋白质化学
蛋白质组学



科学出版社
北京

内 容 简 介

本书系统论述了蛋白质化学基础理论和实验技巧,也反映了蛋白质组学研究的最新成果。内容包括:蛋白质的表征,蛋白质的组成分析和序列测定,与此相关的实验方法,包括各种色谱、电泳、质谱技术等,以及应用在蛋白质表征研究和基因工程产品的质检方面的实际范例。在蛋白质组学领域介绍了基本概念、样品制备、双向凝胶电泳的图像分析和定量分析、质谱等常规方法,并介绍了国际上最新的多维技术在研究中的应用;同时充分体现了生物信息学在蛋白质组研究中的重要性。

本书可作为生物学、医学、化学专业大学生,研究生和教学人员的参考书,也是从事生物化学、分子生物学、医学等领域中分离分析工作人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

蛋白质化学与蛋白质组学/夏其昌、曾嵘等编著. —北京:科学出版社, 2004.4

(现代生物技术前沿)

ISBN 7-03-012401-4

I. 蛋… II. ①夏…②曾… III. 蛋白质-研究 IV. Q51

中国版本图书馆CIP数据核字(2003)第100086号

责任编辑:莫结胜 杨兆弘 谢灵玲 / 责任校对:宋玲玲

责任印制:安春生 / 封面设计:王浩 陈敬

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>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004年4月第一版 开本:787×1092 1/16

2004年4月第一次印刷 印张:36 1/4

印数:1—4 000 字数:828 000

定价:75.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

《蛋白质化学与蛋白质组学》编写人员名单

(按姓氏音序排序)

- 曹兴军 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 车发云 Department of Molecular Pharmacology, Albert Einstein College of
Medicine, New York, NY, USA
- 陈益强 中国科学院计算技术研究所 北京 100080
- 丁士健 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 付 岩 中国科学院计算技术研究所 北京 100080
- 龚蓁蓁 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
上海 200031
- 江晓胜 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 靳文海 中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱中心 大连 116023
- 李 辰 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 李荣霞 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 李素君 中国科学院上海生命科学研究院生物信息中心 上海 200031
- 李亦学 中国科学院上海生命科学研究院生物信息中心 上海 200031
- 刘 韜 Howard Hughes Medical Institute, University of Washington,
Seattle, WA, USA
- 马丹军 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 阮宏强 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 邵晓霞 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 沈海芳 中国科学院上海生命科学研究院药物研究所 上海 201203
- 史 律 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 宋金芳 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031

- 唐柳娅 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 屠成剑 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 屠红旻 Biocenter and Department of Medical Biochemistry & Molecular
Biology, University of Oulu, Oulu, Finland
- 吴家睿 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
上海 200031
- 夏其昌 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 徐来根 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 薛卫华 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 杨一鸣 中国科学院上海生命科学研究院药物研究所 上海 201203
- 俞利荣 Laboratory of Proteomics and Analytical Technologies SAIC-Frederick,
Inc. Natinal Cancer Institute at Frederick, MD, USA
- 曾 嵘 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 张 雷 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 张丽华 Medical Information Technology Inc., Boston, USA
- 周 虎 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
蛋白质组研究分析中心 上海 200031
- 邹汉法 中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱中心 大连 116023

前 言

我曾在1997年10月出版了《蛋白质化学研究技术与进展》一书。此书后来又重印了一次,这反映有一定的需求,但目前已完成其历史任务。因为,这几年中,蛋白质领域发生了翻天覆地的变化,进入了蛋白质组学的时代。在中国科学院,上海生命科学研究院和生物化学与细胞生物学研究所于2000年共建了蛋白质组研究分析中心。近年来,更多的研究单位和大专院校建立了蛋白质组学中心或蛋白质组学重点实验室。

蛋白质化学的研究是从细胞中成千上万种蛋白质中分离纯化到一种蛋白质来研究它;而在蛋白质组学研究中,是欲将细胞中全部的蛋白质系统地分离和鉴定,在整体水平上研究其结构和功能。有人说,早期蛋白质研究是个体作坊式的,而目前的蛋白质组研究是在团队水平上进行。由于工作量之大和高通量、高难度,不是少数几个人所能胜任的,这也要求研究者是团队式的。

30多年前,很多医学家已经考虑到疾病不是单因素而是多种因素综合作用的结果,他们发展了现代双向电泳技术来研究这些复杂的因素,看到了可喜的前景。当时犹如看天上众多的星星,但理不出头绪。后来发展的电泳图像分析和质谱技术,才解决了这些疑难问题。

我近年常用“从蛋白质化学到蛋白质组学”这一题目讲课,这也反映一种历程。国际上一些科学家用疑惑的眼光询问,也有很多人表示赞同。事实上,不少蛋白质组学专家,过去也是蛋白质化学家。当然,也有不少蛋白质组学专家来自医学界。

1997年,我应邀参加在澳大利亚举行的Lorne蛋白质结构和功能讨论会,当时Williams的报告“The Establishment Phase for the Australian Proteome Analysis Facility”(即著名的APAF)使我很受启发,次年我访问美国一些实验室时,特别注意有关内容,并请顺访上海的蛋白质化学专家潘裕敬博士作了蛋白质组的报告,重点在双向电泳。当时,我们已有CE、Mimi-IEF、FFE等多种电泳技术,但没有建立双向电泳的要求,也不太明白为何在国际有名的电泳杂志上总有一半论文涉及2-DE。当对蛋白质组学有所了解后,也就明白了。

金善纬教授多次建议我:做蛋白质研究一定要有质谱!在后来工作中,还得到质谱专家杨一鸣进一步的指点和帮助。

我步入蛋白质化学这一领域首先是在复旦大学的课堂上听邹承鲁、钮经义先生和曹天钦先生的精彩讲课,当时很多名教授为大学生讲系列的基础课。进入中国科学院上海生物化学研究所后,得益于王应睐先生和戚德芳先生的直接教诲。值得指出的是:在著名的生化所这样的研究氛围中,我受到国内一批享有盛名的研究蛋白质的前辈熏陶;同时也获益于同事们有益的交流讨论,他们在当时生活和研究条件极其艰难的情况下开展工作。

蛋白质组学这一新的热点学科在国内外都有不同程度的理解。可以作为大学科来组织,也可以作为一种研究方法在小范围内对所感兴趣的课题进行研究。但有一点是肯定的,即大家都对蛋白质组学寄予厚望,并在不同水平和不同范畴上进行工作,这是值得庆

贺的。如今已有全球性的蛋白质组机构——人类蛋白质组组织(Human Proteome Organization, HUPO),蛋白质组学的专业性刊物也不断涌现,一派欣欣向荣景象。

我们在《蛋白质化学研究技术与进展》的基础上,结合当前的研究进展,写作了本书,如果本书能在我国蛋白质组学的发展中,引起人们更多的兴趣,起到普及和引导入门的作用,我们将感到非常欣慰。

夏其昌

2003年4月21日

中国科学院 上海生命科学研究院

生物化学与细胞生物学研究所

蛋白质组研究分析中心

<http://www.proteomics.ac.cn>

目 录

前言

上篇 蛋白质化学

第一章 蛋白质的表征	3
第一节 蛋白质结构的基本概念	3
第二节 蛋白质的纯度	6
第三节 蛋白质的定量	7
一、光吸收法	8
二、双缩脲法	8
三、福林-酚法	8
四、考马斯亮蓝 G-250 法	9
五、氨基酸分析法	9
第四节 蛋白质的脱盐(除去盐和非共价结合的小分子)	9
第五节 蛋白质的分子质量测定	10
第六节 蛋白质的等电点测定	11
第七节 氨基酸定量分析	12
第八节 肽 谱	14
第九节 质 谱	16
第十节 蛋白质及多肽的序列测定和末端分析	18
一、N 端分析	19
二、C 端的测定	19
第十一节 蛋白质的二硫键分析	19
一、不同同位素标记法	20
二、4-乙烯吡啶标记法	20
三、直接色谱法	21
四、质谱法	21
第十二节 突变点的分析	22
第十三节 原位分析和快速分析	24
一、原位分析	24
二、快速分析	24
第十四节 蛋白质翻译后修饰的分析	25
参考文献	25
第二章 蛋白质结构分析	27
第一节 蛋白质样品的准备	27

一、SDS-PAGE 纯化的样品	27
二、HPLC 纯化的样品	27
三、蛋白质样品中的二硫键和巯基(-SH)	27
第二节 蛋白质的化学裂解	28
一、裂解于甲硫氨酸 (Met)	28
二、裂解于半胱氨酸(Cys)	29
三、裂解于色氨酸 (Trp)	30
四、部分酸水解	30
五、选择性及限制性化学裂解	30
第三节 蛋白水解酶酶解	31
一、常用蛋白水解酶	31
二、酶解操作条件	31
三、讨论	32
第四节 蛋白质中存在着封闭的 N 端	33
一、除去蛋白质中封闭的 N-乙酰丝氨酸和 N-乙酰苏氨酸	33
二、除去 N-乙酰甲硫氨酸	33
三、除去 N 端的焦谷氨酸残基 (pyroglutamate)	33
四、除去其他的 N-乙酰氨基酸	34
五、选择性纯化 N 端封闭的肽	34
第五节 蛋白质中的 C 端残基的测定	34
一、羧肽酶法	34
二、化学降解法	35
第六节 蛋白质中一些特殊肽段的检出	35
一、含巯基肽的分离纯化和分析	35
二、含芳香族氨基酸肽的分离纯化和鉴定	37
三、含 Lys-肽的分离纯化和鉴定	40
参考文献	42
附录一 微量蛋白质实验室注意事项	44
附录二 常用试剂处理	44
第三章 氨基酸组成分析	46
第一节 氨基酸组成分析的目的	46
第二节 蛋白质的水解方法	46
第三节 特殊氨基酸的保护和定量	48
第四节 氨基酸组成原位分析	50
第五节 衍生方法及原理	50
第六节 测定氨基酸组成的实验步骤	52
一、OPA 法	52
二、PTC-AA 法	53
三、茚三酮法	54

四、氨基酸直接分析法	55
第七节 结 语	55
参考文献	56
第四章 蛋白质和多肽的氨基酸序列测定	57
第一节 N端分析原理	57
一、耦联	57
二、裂解	57
三、转化	58
四、PTH-氨基酸的鉴定	58
第二节 N端蛋白质序列仪	58
一、液相旋转杯序列仪	58
二、固相序列分析仪	59
三、气相序列仪	59
第三节 影响N端Edman反应裂解率的因素	60
第四节 测序前样品处理	62
一、纯度鉴定	62
二、脱盐	62
三、巯基修饰方法	62
四、去除N端封闭的基团的方法	63
第五节 手工N端测序	64
第六节 C端序列分析	67
一、C端分析原理	67
二、C端蛋白质序列仪	69
三、C端测序的样品前处理	69
四、影响C端测序反应产率的因素	72
五、结语和展望	72
参考文献	73
第五章 薄层等电聚焦	74
第一节 原理	74
第二节 薄层IEF	75
一、仪器	75
二、试剂和储存液配制	75
三、制胶模具的准备	75
四、凝胶的制备	76
五、加样	76
六、电泳	76
七、染色和脱色	76
八、凝胶保存	77
第三节 等电聚焦中的注意事项	77

第四节 IEF 的优缺点	77
第五节 实例	78
参考文献	79
第六章 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	80
第一节 概况	80
第二节 材料	80
一、设备和材料	80
二、试剂	81
第三节 基本操作步骤	81
一、聚胶前准备	81
二、不连续系统下层分离胶的聚合	81
三、不连续系统中的上层浓缩胶和连续系统凝胶的聚合	82
四、加样	82
五、电泳	82
六、染色和脱色	82
七、干胶	84
第四节 几种不同凝胶电泳系统及其应用	84
一、Leamrli 系统	84
二、大孔胶系统	86
三、Tris-Tricine 系统	87
第五节 注意事项	88
一、形成凝胶的试剂要有足够的纯度	88
二、激活剂的用量	89
三、温度的影响	90
四、氧气的影响	90
五、凝胶添加剂	90
六、聚胶时间	90
七、单体的浓度 %T, %C	90
八、操作注意点	90
参考文献	91
第七章 液相电泳	92
第一节 毛细管电泳	92
一、概况	92
二、材料	95
三、基本操作步骤	96
四、毛细管电泳分离模式及应用	97
五、注意事项	104
六、结束语	104
第二节 连续自由流电泳	105

一、概况	105
二、材料	109
三、自由流电泳操作步骤	110
四、分离模式	111
五、自由流电泳的应用	113
六、自由流电泳在微重力下的特点	115
七、展望	116
第三节 液相等电聚焦	117
一、旋转式等电聚焦	117
二、循环式等电聚焦	119
三、制备型连续流等电聚焦	122
参考文献	123
第八章 高效液相色谱	127
第一节 高效液相色谱的类型及分离原理	127
第二节 高效液相色谱的装置	131
一、输液系统	131
二、进样系统	132
三、分离系统	132
四、检测系统	136
第三节 各类高效液相色谱应用实例	137
一、反相高效液相色谱	137
二、高效离子交换色谱	138
三、高效疏水作用色谱	138
四、高效排阻色谱	138
五、高效亲和色谱	139
第四节 讨论	140
参考文献	142
第九章 质谱	144
第一节 引言	144
第二节 四极和离子阱质谱	144
一、四极质谱仪(quadrupole mass spectrometry)	144
二、四极离子阱质谱(quadrupole ion trap mass spectrometry)	147
第三节 飞行时间质谱	154
第四节 傅里叶转换回旋共振质谱	160
一、基本原理	160
二、质量分辨率、质量精度和质量范围	163
参考文献	165
第十章 毛细管电泳-质谱联用	167
第一节 介绍	167

一、概况	167
二、CE/MS 联用的接口	169
三、其他联用方式	172
四、CE/MS 的限制性因素及其改进方法	173
五、应用	177
第二节 材料	179
一、试剂和溶剂	179
二、多肽和蛋白质	180
三、酶	180
四、仪器	181
第三节 方法	181
一、胰蛋白酶酶解	181
二、血红蛋白的脱盐和纯化	181
三、蛋白磷酸酶去磷酸化	181
四、蛋白质二硫键的羧酰胺甲基化及产物的 HPLC 纯化和蛋白酶酶解	182
五、N-糖苷酶 F 酶解	182
六、 α -甘露糖苷酶酶解	182
七、正离子非共价涂层毛细管电泳	182
八、毛细管电泳-质谱联用	182
九、蛋白质序列数据库搜索	183
十、特殊肽段的选择性离子监测	184
十一、毛细管等电聚焦-质谱联用	184
第四节 结果	185
一、多肽和蛋白质的分析与鉴定	185
二、蛋白质点突变的鉴定	190
三、蛋白质磷酸化的鉴定	193
四、蛋白质 N-糖基化和氧化的鉴定	194
五、蛋白质混合物的毛细管等电聚焦-质谱联用分析	199
第五节 展望	203
参考文献	203
第十一章 毛细管电泳在蛋白质磷酸化和糖基化分析中的应用	208
第一节 毛细管电泳分析多肽和蛋白质磷酸化	208
一、简介	208
二、材料	209
三、方法	209
四、结果和讨论	210
第二节 毛细管电泳分析单糖和寡糖	212
一、简介	212
二、材料	216

三、方法	216
四、结果和讨论	217
第三节 毛细管电泳分析糖蛋白不均一性	221
一、简介	221
二、材料	223
三、方法	223
四、结果和讨论	223
第四节 结语和展望	225
参考文献	226

下篇 蛋白质组学

第十二章 导论	233
一、蛋白质组学的历史和背景	233
二、蛋白质组学的特点与难点	234
三、蛋白质组学发展趋势	239
参考文献	240
第十三章 样品的全息制备	242
第一节 双向凝胶电泳常规样品制备及其改进	242
一、概述	242
二、样品裂解液中各种成分分析	243
三、双向凝胶电泳常规样品制备	245
四、蛋白质顺序提取法	245
五、注意事项	246
第二节 培养细胞蛋白质样品的制备	246
一、细胞破碎的处理方法	246
二、培养细胞总蛋白质的提取	247
第三节 组织样品制备	249
一、概述	249
二、动物组织样品的制备	249
三、植物组织样品的制备	260
四、注意事项	261
第四节 分泌蛋白质样品的制备	261
一、真核细胞的分泌蛋白质样品制备	262
二、细菌分泌蛋白质样品制备	263
第五节 体液蛋白质样品的制备	263
一、血清蛋白质样品的制备	263
二、脑脊液蛋白质样品的制备	264
三、总结	265
参考文献	265

第十四章 双向凝胶电泳	269
第一节 介绍	269
一、双向凝胶电泳简介	269
二、IPG-DALT 双向凝胶电泳	270
第二节 试剂、设备和溶液配制	275
一、试剂	275
二、仪器	275
三、溶液配制	276
第三节 实验操作	277
一、样品制备	277
二、蛋白质定量	278
三、双向凝胶电泳	279
第四节 胶上蛋白质的检测	280
一、介绍	280
二、染色方法	283
参考文献	286
第十五章 电泳图谱的图像分析	290
第一节 介绍	290
第二节 PDQuest 软件简介	290
第三节 PDQuest 软件的使用	291
一、材料	291
二、方法	292
第四节 双向凝胶电泳软件的实际应用	299
一、双向凝胶电泳的重复性和定量定性差异分析	299
二、双向凝胶电泳矢量图	304
第五节 双向凝胶电泳数据库和网上比较	305
一、双向凝胶电泳网络数据库资源	305
二、双向凝胶电泳数据库的构建	308
三、双向电泳凝胶的网上比较	309
参考文献	310
第十六章 物质谱技术和蛋白质鉴定	311
第一节 物质谱基本原理和工作模式	311
第二节 质谱法分析完整蛋白质和多肽	316
第三节 质谱法对蛋白质和多肽一级结构的分析及鉴定	317
一、质谱分析多肽序列的原理	317
二、质谱法结合数据库检索对多肽和蛋白质进行鉴定	318
三、多肽从头测序	325
第四节 质谱前蛋白质或多肽样品制备方法和关键步骤	328
参考文献	335

第十七章 蛋白质组研究中的定量方法	340
第一节 介绍	340
一、概述	340
二、化学标记定量方法	341
第二节 材料	346
一、试剂和溶剂	346
二、多肽、蛋白质和细胞	347
三、仪器	347
第三节 方法	347
第四节 结果和讨论	349
第五节 展望	356
参考文献	356
第十八章 蛋白质组研究中的翻译后修饰分析	358
第一节 磷酸化蛋白质组研究	358
一、介绍	358
二、材料	369
三、方法	370
四、结果	371
五、展望	372
第二节 糖基化蛋白质组研究	374
一、介绍	374
二、材料	383
三、方法	383
四、结果和讨论	384
五、展望	388
参考文献	389
第十九章 亚细胞蛋白质组学	394
第一节 概论	394
一、亚细胞蛋白质组学内涵	394
二、亚细胞蛋白质组学的意义	395
三、亚细胞蛋白质组学的技术基础	396
四、亚细胞蛋白质组学研究进展	404
五、总结	405
第二节 细胞膜的蛋白质组学研究进展	406
一、细胞膜的结构与功能	406
二、膜蛋白质的特点	406
三、膜蛋白质的双向凝胶电泳技术研究	407
四、膜蛋白质的非双向凝胶电泳技术研究	408
五、总结	408

第三节	高尔基体蛋白质组学研究进展	408
一、	高尔基体的结构和功能	408
二、	高尔基体的蛋白质组学研究	409
三、	蛋白质组学研究发现新的高尔基体蛋白质	410
四、	不同功能状态高尔基体的比较蛋白质组学研究	410
五、	总结	411
第四节	核孔复合体蛋白质组学研究进展	411
一、	核孔复合体的结构和功能	411
二、	酵母核孔复合体蛋白质组学研究	412
三、	哺乳动物核孔复合体蛋白质组学研究	413
四、	总结	413
第五节	核仁蛋白质组学研究进展	414
一、	核仁的结构与功能	414
二、	核仁的蛋白质组学研究进展	415
三、	总结	415
第六节	线粒体蛋白质组学研究	415
一、	线粒体蛋白质组学研究进展	416
二、	材料	420
三、	方法	421
四、	结果	422
第七节	展望	422
参考文献	424
第二十章	蛋白质组研究中的非凝胶技术	432
第一节	概况	432
第二节	非凝胶色谱技术	433
一、	一维色谱及其与质谱联用技术	433
二、	多维色谱及其与质谱联用技术	435
第三节	非凝胶电泳	439
一、	液相等电聚焦	439
二、	毛细管电泳	444
第四节	毛细管电色谱及其在蛋白质组学研究中的初步应用	444
一、	毛细管电色谱简介	444
二、	毛细管电色谱在蛋白质和多肽分离中的应用	448
第五节	展望	449
参考文献	450
第二十一章	蛋白质相互作用和蛋白质芯片	456
第一节	蛋白质相互作用	456
一、	概况	456
二、	蛋白质相互作用研究策略和方法	457