



**Purifying Proteins
for Proteomics**

A LABORATORY MANUAL

蛋白质组学中的 蛋白质纯化手册

[澳] 理查德 J. 辛普森 (Richard J. Simpson) 主编

茹炳根 主译



化学工业出版社
生物·医药出版分社



Purifying Proteins

for Proteomics

A LABORATORY MANUAL

蛋白质组学中的 蛋白质纯化手册

[澳] 理查德 J. 辛普森 (Richard J. Simpson) 主编

茹炳根 主译



化学工业出版社
生物·医药出版分社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

蛋白质组学中的蛋白质纯化手册/[澳] 辛普森
(Simpson, R. J.) 主编; 茹炳根主译. —北京: 化
学工业出版社, 2008. 2

(生物实验室系列)

书名原文: Purifying Proteins for Proteomics: A
Laboratory Manual

ISBN 978-7-122-01833-5

I. 蛋… II. ①辛…②茹… III. 蛋白质-纯化-技术
手册 IV. Q510.3-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 003739 号

Purifying Proteins for Proteomics: A Laboratory Manual/by Richard J. Simpson
ISBN 0-87969-696-6

Copyright©2004 by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New
York. All rights reserved.

Authorized translation form the English language edition published by Cold Spring Harbor
Laboratory Press.

本书中文简体字版由 Cold Spring Harbor Laboratory 授权化学工业出版社独家出版发行。
未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2004-3309

责任编辑: 邱飞婵 郎红旗 周 旭

装帧设计: 关 飞

责任校对: 凌亚男

出版发行: 化学工业出版社 生物·医药出版分社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 化学工业出版社印刷厂

787mm×1092mm 1/16 印张 47 字数 1077 千字 2009 年 3 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: 186.00 元

版权所有 违者必究

出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了“生物实验室系列”。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，邀请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国

际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列”的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列”的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提出宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社
生物·医药出版分社

译者的话

本书的主旨是结合当前应用日益广泛的蛋白质组学研究中蛋白样品的制备和分析的需要,介绍为其配套的技术,但就从生物材料中进行多种微量蛋白样品的制备和分离纯化及鉴定来说,也不失为一本具有现实应用价值的专著,因此其应用范围也就较为广泛。特别是当前分子生物学和现代医学的发展,对不同生物组织中微量蛋白质的研究日益增多,了解和掌握此类微量分离、分析的现代化方法也显得尤为重要、尤为基础,这就是我们愿意接受这个翻译委托之首要原因。

其次,作为蛋白质工程国家重点实验室的主要成员之一,译者长期从事蛋白质化学、蛋白质结构功能方面的研究,尤其是有关蛋白质的分离纯化和分析是我们最常规的技术。早在20世纪60年代,国内就广泛应用多种色谱、电泳方面的技术。近十几年来随着分离技术的发展,也广泛地采用了超滤技术、酶标技术、基因技术和晶体结构分析技术以及近来的质谱技术、多维 HPLC 技术、NMR 分析技术,使我们的工作越来越趋向于微量化、多元化。

最后,值得提出的是,现代比较蛋白质组学,尤其是某些病理的比较蛋白质组学研究,要从不同组织、细胞中动态地识别出极其微量的目的蛋白表达水平及其病理变化,对于各种表达蛋白的分离、分析要求更高、更精细,可想而知应用这些微量乃至超微量的分离、分析技术是必不可少的。只有熟练掌握这些技术,才能在工作中综合运用多种蛋白质组学技术,以解决我们研究中的关键问题。这对长期从事这方面研究工作的我们来说是一个压力,也是促使我们翻译此书的动力之一。这里尤其应该提到的是本课题组中几乎所有的研究生,他们都具备了涉及此领域的各方面的理论基础和实验操作的技能,所以一开始就跃跃欲试,非常乐意来承担这项翻译任务。为了不至于压制他们的积极性,同时也为了能尽快完成此项任务,结果有众多的同学分担了各章节的翻译工作。当然,从另一方面来说,由于翻译人员较多,翻译水平和风格各异,所以在统一全部译稿时就花了不少气力。尽管我们进行了比较仔细的校译,但由于水平所限,难免还会有些差错,希望读者、专家们能从中进行指点,以备纠正,为此十分感谢。就翻译此书的亲身体会而言,作为本领域的专业工作者,我们相信广大读者和专家们会喜欢这本书并从中受益,当然主要功劳是本书的原著者 Richard J. Simpson 教授及其同事们。

在翻译过程中,本课题组的唐永慧和贺小娜做了大量的打印、复印、编排文字和协助校正方面的工作,特此表示感谢。最后当然还要感谢化学工业出版社的有关领导、编辑和参与校对工作的同志,为使本书得以出版付出了大量的劳动和心血。在此一并表示我们衷心的感谢。

茹炳根

2008年5月于北京大学未名湖畔

译者名单

主 译 茹炳根

其他参译人员 (以姓氏笔画为序)

于 明 王海波 方 敏 李 杰

张宇坤 郝明强 茹 强 徐渊平

韩轶星

前 言

随着各种基因组序列计划的成功完成，包括人类基因组在内的 150 多个已公开的基因组计划，生物学家现在关注更多的是各个基因组中编码蛋白的结构和功能，试图确定基因的真正功能。由于此领域的兴趣不断增长，冷泉港实验室出版社（Cold Spring Harbor Laboratory Press）于 2003 年出版了《蛋白质与蛋白质组学实验指南》（*Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*）一书，全面介绍了各种蛋白质组学研究方法，包括蛋白质分离，特别是单向凝胶和双向凝胶（2D 胶）的方法，以及经典的“pull-down”技术，即用亲和标签来分离蛋白质及其相互作用配体。此书还包括如何用传统的氨基末端和羧基末端序列分析以及质谱方法，来鉴定通过这些手段分离出来的蛋白质（包括翻译后修饰，特别是磷酸化位点）。

现在，蛋白质组学这一领域刚开始趋于成熟，很明显，除了传统的单向凝胶和双向凝胶方法外，蛋白质组研究中还需要其他分离工具，特别是要想了解那些珍贵而又稀少的蛋白质时。对一些与疾病有关的低丰度生物标记物和某些难以用 2D 胶处理的蛋白质（如膜蛋白）更是如此。例如，大多数用 2D 胶获得的蛋白质表达谱实验中，只有在细胞或组织中分布量大的蛋白质（如管家蛋白和结构蛋白）才可以观察到。一个细胞内蛋白质的分布动态范围是 $10^5 \sim 10^6$ 数量级。例如，肌动蛋白（细胞中分布最为广泛的蛋白质）在每个细胞内的浓度为 10^8 个分子，而某些细胞受体或转录因子在每个细胞内只有 $10^2 \sim 10^3$ 个分子。当研究像血液这样的生物样本时，这个问题就更明显了，血清白蛋白以 40mg/ml 的量存在，细胞因子则以低达 pg/ml 的量存在，蛋白质分布的动态范围约为 10^9 。因为 2D 胶上能检测到的蛋白质的动态范围约为 10^4 ，如果结合某些预分级分离技术是可以去除高丰度蛋白的，使感兴趣的低丰度蛋白能分离出来。

《蛋白质组学中的蛋白质纯化手册》作为《蛋白质与蛋白质组学实验指南》的姊妹篇，其目的是为研究者提供重要的纯化策略（第 I 部分）、预分级分离的方法——色谱（第 II 部分）和电泳（第 III 部分），以避免动态范围的限制。除了这些预分级分离方法外，本书还涵盖了许多经典的蛋白质分离方法。这些方法可用来进行高分辨率三维结构分析，即以结构基因组学（也被称为结构蛋白质组学）和蛋白质微阵（蛋白质芯片）分析为目的的高通量制备纯化蛋白质。此外，第 IV 部分介绍了测定纯化蛋白功能完整性的方法（如构象稳定性、精确分子量、聚合状态的测定以及用表面等离子体共振测定结合特性），还描述了糖蛋白中糖的分析；提供的实验方案详述了如何从糖蛋白中除去聚糖和制备单糖用于 GC-MS 鉴定。

《蛋白质组学中的蛋白质纯化手册》以从事蛋白质和多肽分离以及进行蛋白质组学分析的研究人员为对象，读者对象涵盖从研究生到资深科研人员。我们认为单一作者不可能了解所用的全部方法，本书中涉及的某些特殊领域则是由这些领域的相关专

家撰写。

除了为本书写作的各位专家外，我还要深深感谢那些为本书得以出版而做出显著贡献的人。我非常感谢冷泉港实验室出版社的编辑和制作人员，正是他们在订正参考文献和论据、完善书稿结构以及冗繁的文体修饰方面做出的无私贡献和不懈努力，使此书能按时出版。要感谢 Inez Sialiano 协调编写计划的完成；Dorothy Brown 协助编辑工作；Susan Schaefer 设计了雅致的版面；Denise Weiss 提供了非常精美的整体设计；Michael Zierler 作为资深策划编辑，为促使本书的完成给予了始终如一的支持。我还要感谢我的出版编辑 Jan Argentine 的热情支持，以及冷泉港实验室出版社负责人 John Inglis 对整个编写计划的支持。我也要感谢许多我在 Parkville strip 的同事（特别是 Tom Garret、Ray Norton、Geoff Howlett、Heung-Chin Cheng、Lindsay Sparrow 和 Herbert Treectlein），他们认真地阅读了本书的各个章节。此外，我要特别感谢《分子克隆手册》的资深作者 Joe Sambrook 教授，他在两本蛋白质组学实验室手册编写过程中所给予的具有实际经验的编辑指导、关心和鼓励是无价的。感谢 Mary Whitham 对该书早期的文案方面给予的帮助；我也必须感谢我的私人助手 Simone Pakin，得益于她收集信息的高超技能、无私奉献以及在逆境中的豁达，我们才能坚持下来。最后，我还要感谢我的夫人 Donna Dorow，感谢她在整个成书过程中始终如一的支持。

理查德 J. 辛普森
(Richard J. Simpson)

《蛋白质组学中的蛋白质纯化手册》关联网站

《蛋白质组学中的蛋白质纯化手册》与其姊妹篇《蛋白质与蛋白质组学实验指南》共享一个网站 (www.proteinsandproteomics.org)。除了《蛋白质与蛋白质组学实验指南》的在线信息外，该网站将包括：

- 与 Medline 相连接的参考文献；
- 延伸的一系列参考文献表；
- 与 www.biosupplynet.com 连接，可提供本书中所提到的生产商；
- 与其他有用的数据库和网站连接。

在本书出版以后，该网站还补充了一些新的信息。可按如下步骤进入网站：

- (1) 打开网站主页。
- (2) 按照主页上简单的注册程序操作（本网站对所有人员开放，完成注册程序即可进入，无需特殊的准入号码）。

(3) 以你的电子邮箱地址和密码作为以后访问网站的登录信息。

该网站的 FAQ（常见问题解答——译者注）部分有关于注册程序的解释。注册过程中如需要其他帮助，或需要告之关于网站地址的变更，以及关于网站的任何查询，请发送电子邮件给 support@proteinsandproteomics.org，也可以在上午 8:00 至下午 5:00（美国东部时间）之间致电 1-800-843-4388（美国本土和加拿大的读者）或 1-516-422-4100（其他地区的读者）询问。

目 录

第 I 部分：供蛋白质组学分析的蛋白样品制备

第 1 章 分离科学在蛋白质组学中的作用	3
1.1 制备纯化蛋白：蛋白质微阵和结构蛋白质组学的瓶颈	5
1.2 以质谱为基础的蛋白质鉴定	6
1.3 蛋白质组学所面临的一个关键技术的挑战：减少样品的复杂性	7
1.4 本书的概述	13
参考文献	14
选读文献	15
网络资源	15
第 2 章 蛋白质的纯化策略	16
2.1 挑战	17
2.2 蛋白质的量和纯度要求	17
2.3 重组蛋白通常能简化纯化过程	20
2.4 可根据蛋白质的内在特性来分离蛋白质	22
2.5 设计蛋白质纯化方案	26
2.6 应用：膜相关抗原 A33 的纯化	31
参考文献	35
选读文献	36

第 II 部分：蛋白质组学中制备蛋白样品的色谱方法

第 3 章 蛋白质和肽纯化的色谱方法导论	39
3.1 基本概念	40
3.2 色谱性能	48
实验方案	60
方案 1 轻拍-填装法干式填装刚性固体柱	60
色谱术语表	62
参考文献	69
选读文献	69
网络资源	69
第 4 章 全蛋白的多维色谱	70

4.1 MDLC 用于蛋白质分级分离的目的	71
4.2 策略	72
4.3 主要文献概述	74
4.4 MDLC 的理论参数	75
4.5 色谱模式：正交性与相容性	77
4.6 与其他技术的性能比较	80
4.7 MDLC 的常见问题	82
4.8 发展潜力	84
4.9 样品处理方案：SEC/反相色谱法分离大肠杆菌蛋白	84
4.10 研究实例：MDLC 分析酵母蛋白提取物	88
4.11 结论	90
参考文献	91
第 5 章 可溶性重组蛋白的高通量筛选	93
5.1 引言	94
实验方案	97
方案 1 设计平行克隆表达载体	97
方案 2 平行克隆所用载体的制备	98
方案 3 黏末端 PCR 产物的制备和消化载体的连接	100
方案 4 把 DNA 转化到细菌中	103
方案 5 诱导和筛选可溶性融合蛋白	106
参考文献	110
第 6 章 离子交换色谱	111
6.1 IEC 利用了分子间的静电力	112
6.2 几种 IEC 的模式	115
6.3 IEC 中缓冲液的选择很重要	115
6.4 离子交换介质和色谱分离装置	118
实验方案	121
方案 1 离子交换柱的选择	121
方案 2 离子交换柱的制备	125
方案 3 用 IEC 分离蛋白质	127
IEC 柱的清洗	130
IEC 的优化和常见问题	131
参考文献	134
网络资源	134
离子交换介质的供应商	134
第 7 章 尺寸排阻色谱	135
7.1 小分子更易进入凝胶介质间的空隙	136
7.2 分配系数 K_d 和有效分配系数 K_{av} 描述了溶质在特定凝胶中的洗脱情况	137
7.3 SEC 分离相似形状分子的能力取决于凝胶的选择范围	139

7.4 分子的形状对其洗脱时间的影响	139
7.5 影响洗脱蛋白分辨率的因素	140
7.6 SEC 在纯化方案中的作用	141
7.7 SEC 中缓冲液、溶液和试剂的配制	141
7.8 SEC 中蛋白样品和肽样品的预处理	142
7.9 SEC 液相色谱装置	142
7.10 利用 SEC 分离纯化的例子	147
实验方案	151
方案 1 尺寸排阻色谱柱的填装	151
方案 2 尺寸排阻色谱的制备	154
附加方案：分析性尺寸排阻色谱	157
方案 3 用尺寸排阻色谱进行蛋白质的脱盐和缓冲液的更换	158
柱的清洗和保养操作	159
关于 SEC 的常见问题	161
参考文献	162
第 8 章 反相高效液相色谱在蛋白质分离和纯化中的应用	163
8.1 RP-HPLC 的特点与机制	164
8.2 分离机制	165
8.3 RP-HPLC 基于“疏水脚”的细微差异分离多肽	166
8.4 RP-HPLC 柱的特点与操作	166
8.5 流动相	171
8.6 温度	174
8.7 表面活性剂对反相分离的影响	174
8.8 在质谱鉴定前用 RP-HPLC 分级分离多肽	174
8.9 RP-HPLC 常见问题指南	176
实验方案	177
方案 1 RP-HPLC 分离蛋白质的标准色谱条件	177
方案 2 RP-HPLC 分离多肽的标准色谱条件	183
参考文献	188
选读文献	188
网络资源	188
第 9 章 疏水相互作用色谱	189
9.1 HIC 与 RP-HPLC 的区别	190
9.2 HIC 的基本原理	191
9.3 实验的影响因素	192
实验方案	196
方案 1 用 HIC 分离蛋白质	196
参考文献	198
第 10 章 亲和色谱与免疫亲和色谱	199

10.1 亲和色谱的实际应用	201
10.2 凝集素亲和色谱	202
10.3 配基亲和色谱	205
10.4 免疫亲和色谱	206
10.5 DNA 亲和色谱	207
10.6 共价色谱	210
10.7 采用巯基-二硫键互换反应的共价色谱	211
实验方案	215
方案 1 凝集素-琼脂糖凝胶亲和色谱	215
方案 2 蛋白质配基亲和色谱	218
方案 3 制备抗体亲和树脂过程中抗体的定位	221
方案 4 DNA 亲和柱的制备	223
方案 5 DNA 亲和色谱	227
方案 6 从仅被混有不可逆失活的亚磺酸氧化产物中以可逆失活混合的二硫化物形式 纯化木瓜蛋白酶	232
方案 7 以琼脂糖-谷胱甘肽-2-吡啶二硫化物凝胶作为填料的共价色谱	235
方案 8 使用活化的 Thiopropyl-Sepharose 6B 凝胶的共价色谱	241
参考文献	249
网络资源	250
第 11 章 蛋白质组学研究中的染料配基亲和色谱	251
11.1 方法的设计和优化	254
11.2 染料配基吸附剂的再生和储存	258
实验方案	259
方案 1 染料在多羟基介质中的固定化	259
附加方案: 固定化配基浓度的测定	262
方案 2 通过结合目的蛋白的能力来筛选固定化染料	263
方案 3 吸附条件的优化	265
方案 4 洗脱条件的优化	266
方案 5 分批式试管法计算吸附剂的有效容量	268
方案 6 用染料配基亲和色谱纯化蛋白	269
11.3 研究实例: 使用 Cibacron Blue 3GA-Sepharose 亲和吸附剂纯化重组甲酸脱氢酶	271
参考文献	272
第 12 章 固定化金属离子亲和色谱	273
12.1 IMAC 的基本原理	274
12.2 IMAC 的基本操作	276
12.3 IMAC 最常用于纯化带多聚组氨酸标签的蛋白质	277
12.4 目的蛋白性质未知时可使用 IMAC	278
12.5 磷蛋白和磷酸肽的分离	278
实验方案	280
方案 1 IMAC 预装柱的准备	280

方案 2 填充 IMAC 柱	281
方案 3 制备含组氨酸标签蛋白的大肠杆菌澄清提取物	283
方案 4~6 的导言: 在非变性条件下纯化组氨酸标签蛋白	285
方案 4 利用未经参数优化的 IMAC 纯化组氨酸标签蛋白	286
方案 5 优化咪唑浓度来提高蛋白质分离效率	288
方案 6 利用咪唑梯度用 IMAC 纯化组氨酸标签蛋白	291
方案 7~8 的导言: 在变性条件下用 IMAC 纯化组氨酸标签蛋白	294
方案 7 变性蛋白样品的制备	295
方案 8 在变性条件下用 IMAC 纯化组氨酸标签蛋白	297
IMAC 柱的清洗	300
IMAC 柱的保存	300
IMAC 疑难问题的解决	300
12.6 IMAC 研究实例	303
参考文献	305
第 13 章 用羟磷灰石进行蛋白质色谱	307
13.1 基本概念	308
13.2 应用	312
实验方案	315
方案 1 用羟磷灰石结晶粉进行色谱	315
方案 2 用陶瓷羟磷灰石进行高效液相色谱	318
参考文献	322
第 14 章 色谱聚焦	323
14.1 引言	324
实验方案	327
方案 1 制备凝胶和柱子	327
方案 2 制备样品: 变换缓冲液和脱盐	332
方案 3 利用色谱聚焦法纯化蛋白	335
方案 4 从样品组分中去除 Polybuffer 和 Pharmalyte	338
方案 5 柱子的清洗、再生和保存	340
14.2 色谱聚焦研究实例	343
参考文献	346
第Ⅲ部分: 蛋白质组学中制备蛋白样品的电泳方法	
第 15 章 电泳分离蛋白质策略导论	349
15.1 通过制备电泳富集低丰度蛋白	353
15.2 第Ⅲ部分概述	355
参考文献	357
第 16 章 双向凝胶电泳分离蛋白质	359
16.1 样品的制备	360

16.2 预分离和亚分离操作	362
16.3 用 IPG 进行双向凝胶电泳	363
16.4 IPG-IEF 的一般指导原则	363
16.5 蛋白质的显示	368
16.6 差示凝胶电泳	369
16.7 2D 胶疑难问题的处理	370
实验方案	371
方案 1 细胞和组织样品的提取和增溶	371
方案 2 小麦种子 (<i>T. aestivum</i>) 蛋白质的顺序提取	375
方案 3 用 Sephadex-IEF 进行小鼠肝脏蛋白的预分离	377
方案 4 IPG 胶条用 IPGphor 单元来进行 IEF	381
方案 5 IPG 胶条的平衡	385
方案 6 在垂直电泳单元中进行的多个 SDS-PAGE	387
方案 7 荧光差示凝胶电泳	390
参考文献	394
网络资源	395
第 17 章 在 MCE 中通过等电位分段法进行高分辨率双向凝胶电泳来制备样品	396
17.1 窄范围 IPG 可提高蛋白质分辨率	397
17.2 MCE 将样品分成窄的等电位分段	398
实验方案	401
方案 1 MCE 分段法	401
17.3 MCE 血浆蛋白分段的结果	404
17.4 人血浆的窄范围碱性分段	405
17.5 玉米 (<i>ZEA MAYS</i>) 晶胚的分段	406
参考文献	407
第 18 章 一种电泳纯化蛋白质的方法: Gradiflow BF400 仪	408
18.1 Gradiflow BF400 仪的介绍	410
18.2 Gradiflow BF400 仪的分离原理	411
18.3 用 Gradiflow BF400 仪进行分离的技术方案的发展	411
18.4 实施根据电荷进行的分离	413
18.5 实施根据大小进行的分离	414
18.6 实例分析: 在蛋白质组学分析中按大小对蛋白样品进行分级分离	414
实验方案	416
方案 1 从血浆或血清中制备多克隆抗体	416
方案 2 从组织培养上清液中浓缩蛋白	419
方案 3 从血浆中去除清蛋白	421
Gradiflow BF400 仪的特征	424
参考文献	425
第 19 章 用自由流动电泳技术纯化蛋白质	426

19.1 引言	427
实验方案	429
方案1 天然 IEF-FFE 分级分离粗蛋白混合物	429
方案2 变性 IEF-FFE 分级分离粗蛋白混合物	437
参考文献	439

第IV部分：用于结构蛋白质组学的纯化蛋白的分析

第20章 已纯化蛋白质鉴定方法导论	443
20.1 结构基因组学：是否可以从结构推知功能？	444
20.2 蛋白质微阵的进展	445
20.3 已纯化蛋白的功能完整性	445
20.4 第IV部分概述	448
参考文献	450
网络资源	451
第21章 用质谱测定蛋白质的特性	452
21.1 一级结构的测定	453
21.2 二级结构的测定：二硫键	464
21.3 三级结构和四级结构的测定：蛋白质构象、蛋白质折叠和蛋白质-蛋白质 相互作用	467
参考文献	474
第22章 分析超速离心：蛋白质大小、构象和相互作用	478
22.1 分析超速离心的原理	479
22.2 理论	480
22.3 文献示例	483
22.4 实验上的问题	487
22.5 结论	490
参考文献	491
网络资源	492
第23章 蛋白质构象稳定性的测定	493
23.1 用光谱学技术追踪去折叠	494
23.2 通过氢交换来测定蛋白质的构象稳定性	503
23.3 比较由 NMR 和其他方法测得的 ΔG_0	505
23.4 结束语	507
实验方案	508
方案1 尿素储液的制备	508
方案2 测定尿素或盐酸胍去折叠曲线	510
方案3 测定热去折叠曲线	512
方案4 用 NMR 法测定蛋白质构象的稳定性	514