



生命科学实验指南系列

Short Protocols  
in Protein Science

# 精编蛋白质科学 实验指南

〔美〕J.E. 科林根 等 著  
李慎涛 等 译



科学出版社

[www.sciencep.com](http://www.sciencep.com)

生命科学实验指南系列

# 精编蛋白质科学实验指南

〔美〕J E. 科林根 等 著

李慎涛 等 译

科学出版社

北 京

图字:01-2005-3956 号

## 内 容 简 介

本书是《最新蛋白质科学实验指南》(*Current Protocols in Protein Science*; CPPS)一书的精编版本,内容全部取材于该书和每季度更新的服务手册,其详细提供了多种实验方案,并包含实验材料、步骤和每种技术的参考文献等信息,可使有经验的研究人员将其作为独立的实验室指南来使用。

由于蛋白质具有多样性,其分析也必须包括很广范的结构和理化方法,因此每个研究人员都必须尽可能多地掌握最新方法和传统方法。本指南中既包括特定的详细方案,也包括使方法适应手头特定项目的策略,相信能够有助于读者进一步深入进行蛋白质科学和相关领域的研究。

原书名:Short Protocols in Protein Science.

Copyright © 2003 by John Wiley & Sons. Inc.

All rights reserved. Authorized translation from the English language edition by John Wiley & Sons. Inc.

### 图书在版编目(CIP)数据

精编蛋白质科学实验指南/(美)科林根(Coligan J. E.)等著;李慎涛等译. —北京:科学出版社,2007

(生命科学实验指南系列)

ISBN 978-7-03-018086-5

I. 精… II. ①科… ②李… III. 蛋白质-实验-指南 IV. Q51-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 113819 号

责任编辑:李 悦 彭克里 席 慧/责任校对:张 琪

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者

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>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2007年1月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2007年1月第一次印刷 印张:49

印数:1—3 000 字数:1 114 000

定价:120.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈科印〉)

# 本书译校者名单

主 译：

李慎涛 首都医科大学

张富春 新疆大学

其他译校者：（按姓氏拼音排序）

陈振文 首都医科大学

冯晓黎 新疆大学

兰海燕 新疆大学

李江伟 新疆大学

廖晓萍 华南农业大学

蔺晓薇 中日友好医院

马 纪 新疆大学

马静云 华南农业大学

祁雅慧 首都医科大学

温铭杰 首都医科大学

姚维成 青岛大学医学院

于丽华 首都医科大学儿童医院

张国君 首都医科大学宣武医院

章金刚 军事医学科学院野战输血研究所

朱俊萍 首都医科大学

# 译者的话

人类基因组测序的完成标志着“后基因组”时代的到来。同时，随着生物信息学、分子生物学、细胞生物学、遗传学、免疫学、结构生物学等相关学科的发展，蛋白质科学研究已进入了一个全新的时代。

在国家有关部门的支持下，我国结构基因组学和蛋白质组学的研究项目已相继启动。在结构基因组学研究领域，已取得了多项世界先进水平的研究成果。尤其在蛋白质组学研究领域，2002年我国率先提出了“人类肝脏蛋白质组计划”，到目前为止，该项目已取得一系列重要的科研成果。在蛋白质产业方面，也有多种诊断试剂、疫苗和药物进入市场。可以说，我国蛋白质科学的研究正在越来越受到国际同行的瞩目。

目前，对于从事蛋白质研究的科学工作者来说，迫切需要一本具有指导意义的实验参考书。本书的原著是一本极具影响力的蛋白质科学研究的实验指导书，科学出版社及时地将其引进，并组织了一批一线科研工作者完成了本书的翻译工作。

本书用大量篇幅介绍了蛋白质制备、检测和分析的传统方法，如蛋白质的提取、表达、纯化和定性分析等，并对最常用的技术，如层析和电泳，进行了详细介绍。蛋白质-蛋白质相互作用是蛋白质科学研究的一个热点，本书用两章的篇幅对其鉴定和定量分析的方法进行了介绍；蛋白质组学是蛋白质科学的另一个热点，本书对其方法学和具体操作亦有详细的介绍。此外，生物信息学在现代蛋白质科学研究中发挥着越来越重要的作用，本书对常用的生物信息学分析方法进行了概括，通过生物信息学分析，可以了解蛋白质的基本特性，对研究方案的设计和实验数据的分析处理都具有重要的指导意义。总之，本书包括了蛋白质科学研究所需的几乎所有的常用技术和最新方法，代表了蛋白质科学研究的当前水平，是一本很好的实验用书。相信本书的出版对我国的蛋白质科学研究会起到积极的推动作用。

在本书的翻译过程中，得到了科学出版社莫结胜编辑、李悦编辑和庞在堂编辑的大力帮助，他们为本书的顺利出版付出了辛勤的劳动，在此表示衷心的感谢！同时，欢迎广大读者对本书批评指正，不胜感激。

李慎涛

2006年12月8日于首都医科大学

# 前言

蛋白质像人一样，很有个性，但又有很多共同点。结构特点很相似的蛋白质，其物理特性会截然不同，这种异质性会给有志于研究蛋白质结构和功能的科学家提出很大挑战，因为我们不能够根据蛋白质的序列和结构来预测其生物学和物理功能，例如，已知一种蛋白质的三级结构，我们不能够准确地预测如何对其进行结晶和纯化。因此，尽管随着生物信息学能力的日益增强，我们能够使这一过程更加合理，但蛋白质化学的许多方面还要靠经验的方法。随着分子生物学、遗传学、结构生物学和相关学科的发展，蛋白质科学也正在不断地复兴，对有关蛋白质方法的参考资料的需求也不断增长。使用重组的方法，现在能够过量表达正常形式和重新设计形式的蛋白质，并能够创造具有独特新特性的嵌合蛋白质。表达有亲和标签的蛋白质特别有助于蛋白质的纯化。高水平地表达那些在通常情况下低丰度的蛋白质以及对其氨基酸序列进行操作，这种能力为研究蛋白质的排列和其相关的生物学过程（体外和体内两种情况下）提供了空前的机会。蛋白质的生物化学、生物物理和高分辨率结构分析与相关基因的操作（在培养的细胞或整个哺乳动物中）组合在一起已在生物技术和分子医学的许多领域取得了惊人的进展。

由于蛋白质具有这样的多样性，其分析也必须包括很广范的结构和理化方法，每个研究人员的方法库中必须都包括新方法和老方法（传统方法），而且，适合于纯化和初步定性为目的生物学活性有关的蛋白质的方法，通常并不适合于分析相应的过量表达的重组蛋白。本指南中既包括特定的详细方案，也包括使方法适应手头特定项目的策略，是为那些几乎没有蛋白质分离和定性经验的科学工作者而设计的，可能是研究生和在其他生物学科受过训练的科学工作者。同时，本书中介绍的大量技术可以保证即使是经验丰富的专家也会找到新的有用的方法，而且会受益于本书中便捷的标准信息和方法的编排方式，通常情况下，这些标准信息和方法必须要从许多资料中精选。

《精编蛋白质科学实验指南》是《最新蛋白质科学实验指南》(*Current Protocols in Protein Science*; CPPS)一书中方法的精编本，取材于原书和每季度更新的服务手册，本书包括了《最新蛋白质科学实验指南》中所有基本方法的逐步叙述。《精编蛋白质科学实验指南》拟作为实验室手册使用，供那些熟悉《最新蛋白质科学实验指南》中详细解释的研究生和博士后使用，但是，也提供了足够的细节，以使有经验的研究人员将其作为独立的实验室指南来使用。对于其他的信息，我们建议读者参考《最新蛋白质科学实验指南》中详细的注释和注解。

尽管掌握了本书介绍的技术能够使读者进行蛋白质科学和相关领域的研究，但是，无论是本书还是 CPPS 都不适于替代研究生的蛋白质科学课程，也不适于作为本领域的综合教材。此外，我们强烈建议读者与更有经验的研究人员一起在实验室中得到第一手的经验。

## 怎样使用本手册

### 结构

本书的主题是以章的形式组织的，方案包含在每章的单元内，单元通常叙述一种方法，包括一种或多种方案，方案又包括材料、步骤和每种技术的参考文献，在本书的参考文献部分可以找到全部的参考文献。本书的顺序和组织一般按《最新蛋白质科学实验指南》的顺序和组织来处理，尽管在所有情况下单元号并不对应，但是两种版本的单元标题是完全相同的，这样，拥有两种版本的读者需要查找更多的注释细节时，会发现很容易也很方便地进行交叉参考。

在全书中许多操作步骤被反复使用，为了避免重复这些信息，在各单元之间广泛地使用了交叉参考，这有助于减轻过长、复杂方案的负担，不必叙述制备原料和分析结果所需的辅助操作过程的步骤。一些叙述常用技术（如凝胶电泳、离子交换层析）的单元也与叙述其应用的单元建立了交叉参考。如无论什么时候，当在一种方案中需要分离或鉴定一条蛋白质带时，便可以交叉参考第 10 章的适当单元（叙述凝胶电泳的各种操作过程）（即第 10.1 单元）。对于某些广泛使用的技术（如透析），读者可参考附录 3；对于在分子生物学和细胞生物学的常用方法，读者可参考《最新分子生物学实验指南》和《最新细胞生物学实验指南》。

在各种方法中所用试剂和溶液的配方列在附录 1 中。其他附录包括常用的度量制和数据（附录 2）、常用技术（附录 3）以及试剂和设备供货商的名称和地址（附录 4）。

### 方案

本书中的每个单元都包含多种方案，每种方案又由一系列的步骤组成。在每个单元中，首先介绍基本方案，这通常是推荐的或最通用的方法。备择方案则可在以下情况使用：要达到同样的目的，可以使用不同的设备和试剂；在方法中起始材料需要改变；或终产物的要求与基本方案中的不同。辅助方案叙述在基本方案或备择方案中所需要的额外步骤，这些步骤与核心方案是分离的，因为它们也可用于本书中的其他方法中，或因为它们需要在与基本方案步骤不同的时间范围进行操作。

### 试剂和溶液

在操作开始之前，每种方案所需的试剂都逐条地列在材料列表中。其中许多都是常用的贮液，一些是常用的缓冲液或培养基，而另一些是某种特定方法所需要的独特溶液，后一种溶液的配方列在附录 1 中。注意一些溶液的名称在多个单元中是相同的（如裂解缓冲液），而配方是不同的，必须按适当的配方来配制试剂。为了避免混淆，在附录 1 中，每种试剂名称后面的括号内列出了所用配方的单元。那些常用缓冲液和溶液（如 TE 缓冲液和 PBS）除外。

**注意：**除非另有说明，在本书的所有方案中都应当使用 Milli-Q 纯水（或相当的），在配制所有试剂和溶液时，也要使用这种水。

## 设备

现代蛋白质实验室中的标准设备列在下页的表内，在本书中广泛地使用到这些设备。每种方案的材料列表中只包括“专业化的”项目，即那些在实验室中不容易得到或需要特殊制备的项目。

## 商品供货商

在整本书中，我们推荐了化学品、生物材料和设备的商品供货商。在某些情况下，一些著名品牌具有优秀的质量，或是市场中惟一合适的产品；在另外一些情况下，作者对这种方案的经历局限于这种品牌。在后一种情况下，我们给出了一些建议，以帮助蛋白质科学实验人员中的新手。同时我们鼓励有经验的研究人员使用他们自己喜欢的品牌进行实验，在附录 4 中提供了本书中提到的所有供货商的地址、电话号码、传真号码和网站。

## 参考文献

本书只列出了有限数量的最基本的参考文献，作为每个单元的背景，这些被列在每个单元的最后，全书的参考文献则列在本书末尾，此外参考文献部分也可以找到所引用的其他文献（如在数字和表格中）。对于那些想更深入地了解这些方法背景和应用方面的读者，可以参考《最新蛋白质科学实验指南》的相关单元。

## 安全性考虑

进行这些方案的任何人都会遇到以下危险的或潜在危险的材料：①放射性物质；②有毒的化学品和致癌剂或致畸剂；③致病的和传染性生物制剂；④某些重组 DNA 构建体。尽管在适当的单元内已包括一些警告，但是我们强调用户应当谨慎操作，养成良好的实验室操作习惯，所有的材料必须严格符合当地和国家的规定。

## 致谢

John Wiley & Sons 公司的《最新蛋白质科学实验指南》编委会成员为我们提供了将本书结集所需要的支持和帮助，帮助过我们的人有：Virginia Chanda、Amy Fluet、Scott Holmes、Nadine Kavanaugh、Susan Lieberman、Allen Ranz、Katie Stence、Gwen Taylor、Mary Keith Trawick 和 Elizabeth Harkins。我们要特别感谢许多同事（在我们自己的实验室中和全世界的科研和产业实验室中），他们为本书提供材料并分享了他们的方法和经验。最后，我们感谢 Hidde Ploegh 博士帮助我们策划和出版原始的版本《最新蛋白质科学实验指南》。

在本书每个方案的材料列表中也列出了特殊的设备,我们并未试图将每个实验过程所需要的所有设备一一列出,而只是提及那些在实验室可能并未常备或需要特殊制备的设备。在现代生物化学实验室中,应当备有以下各种标准设备。以下是本书中常常用到的设备,而这些设备并未包括在各个单独的材料列表中。

#### 高压设备

天平 分析天平和制备天平。

桌布 塑料布垫(包括“蓝色垫子”)。

离心机 许多实验过程都需要低速(6000 r/min)和高速(20 000 r/min)制冷式离心机和一台超速(20 000~80 000 r/min)离心机,至少需要一台可离心标准0.5 ml和1.5 ml微量离心管的微型离心机,一台台式吊桶式离心机(带可离心96孔微孔板的适配器)也很有用。

注意:在本手册中,离心速度全部表示为 $g$ 或r/min(带例子转子的型号),读者应参阅附录2中的图解,将速度转换成其自己的转子型号。

冷室  $4^{\circ}\text{C}$ 或冷盒。

计算机和打印机

容器 用于凝胶和膜洗涤的塑料和玻璃平皿。

暗室和显影罐 或X-Omat自动X射线胶片显影仪(柯达)。

干冰

过滤装置 用于在硝酸纤维素膜或其他膜上收集酸沉淀。

烧瓶 玻璃瓶(如锥形瓶、beveled shaker)。

组分收集器

冰箱 用于 $-20^{\circ}\text{C}$ 和 $-70^{\circ}\text{C}$ 温育和贮藏。

盖革氏读数器

干胶仪

凝胶电泳设备 至少有一套满足不同分子质量大小的水平电泳设备和一套小型水平电泳设备、一套满足不同分子质量大小的垂直电泳设备和一套小型垂直电泳设备,根据需要,配备一套用于二维蛋白质凝胶的专用电泳设备

加热块 进行酶学反应时,能够放试管和(或)微量离心管的恒温金属加热块十分方便。

可热封性塑料袋和装置

通风橱 化学通风橱和微生物学通风橱。

制冰机

恒温箱( $37^{\circ}\text{C}$ ) 用于培养细菌。我们推荐采用可以容纳“组织培养”转鼓的恒温箱,可用于在18 mm×150 mm的试管中培养5 ml培养物,New Brunswick Scientific公司生产一种方便、耐用的试管转鼓。

恒温箱/摇床 一种封闭式摇床(如New Brunswick公司的恒温摇床)可摇动4 L的烧瓶,这对培养1 L的大肠杆菌是必需的,对于少量的烧瓶培养物的培养,旋转式水浴摇床(New Brunswick R76)很有用。

灯箱 用于观看凝胶和放射自显影。

液氮

冻干机

磁力搅拌器 (带加热器很有用)和搅拌棒。

微量离心机 Eppendorf型,最高转速为12 000~14 000 r/min。

微量离心管 1.5 ml和0.5 ml。

微波炉 用于熔化琼脂和琼脂糖。

研钵和研杵

裁纸刀 大号,可用来裁切46 cm×57 cm的Whatman滤纸。

纸巾

Parafilm膜

巴斯德吸管和吸球

pH计

pH试纸

移液器 使用一次性吸头,移液量为1~1000  $\mu\text{l}$ 。最好全职研究人员每位各一套,一套专门用于放射性实验。

塑料包装膜 (如Saran包装膜)。

Polaroid照相机和紫外透射仪 用于染色凝胶的照相。

细胞刮 橡胶的或塑料的。

电源 对于凝胶电泳,300 V电源就足够了;而对于某些应用,需要2000~3000 V的电源。

试管架 旋转试管和微量离心管。

放射线保护屏 (Lucite或Plexiglas)。

放射性废物容器 用于液体和固体废物。

冰箱  $4^{\circ}\text{C}$ 。

防护眼镜

解剖刀和刀片

闪烁读数仪

剪刀

封口机

摇床 定轨摇床和平台摇床,室温或 $37^{\circ}\text{C}$ 。

分光光度计 紫外和可见光。

真空旋转蒸发器 (Savant)。

组织培养设备  $\text{CO}_2$ 培养箱、相差显微镜、液氮贮存罐和层流罩。

紫外光源 长波和短波,固定式或手持式。

漩涡混合器

水浴 至少两台,可调温至 $80^{\circ}\text{C}$ 。

纯水仪 如Milli-Q系统(Millipore)或相当的。

李慎涛 译 蔺晓薇 校

# 参 编 者

Terri Addona  
Millennium Pharmaceuticals  
Cambridge, Massachusetts

Ronald S. Annan  
SmithKline & Beecham  
Pharmaceuticals  
King of Prussia, Pennsylvania

Ioana Annis  
Union Carbide Corporation  
Bound Brook, New Jersey

Tsutomu Arakawa  
Alliance Protein Laboratories, Inc.  
Thousand Oaks, California

Rosamonde E. Banks  
St. James's University Hospital  
Leeds, United Kingdom

George Barany  
University of Minnesota  
Minneapolis, Minnesota

Alan J. Barrett  
Babraham Institute  
Babraham, United Kingdom

Susannah J. Bauman  
The University of North Carolina  
at Chapel Hill  
Chapel Hill, North Carolina

Dorothy Beckett  
University of Maryland  
College Park, Maryland

Gillian E. Begg  
The Wistar Institute  
Philadelphia, Pennsylvania

Alain Bernard  
Glaxo Institute for Molecular  
Biology  
Geneva, Switzerland

Juan S. Bonifacio  
National Institute of Child Health  
and Human Development  
Bethesda, Maryland

Reinhard I. Boysen  
Monash University  
Victoria, Australia

Ineke Braakman  
University of Amsterdam Academic  
Medical Centre  
Amsterdam, The Netherlands

Roger Brent  
The Molecular Sciences Institute  
Berkeley, California

Crawford Brown  
British Bio-Technology  
Cowley, United Kingdom

A. L. Burlingame  
University of California  
San Francisco, California

Gerard Cagney  
University of Washington  
Seattle, Washington  
and Banting and Best Institute of  
Medical Research  
University of Toronto  
Toronto, Canada

John F. Carpenter  
University of Colorado Health  
Sciences Center  
Denver, Colorado

Steven A. Carr  
SmithKline & Beecham  
Pharmaceuticals  
King of Prussia, Pennsylvania

Miles W. Carroll  
Oxford BioMedica  
Oxford, United Kingdom

Nigel Carter  
The Salk Institute  
La Jolla, California

Lin Chen  
AxCell Biosciences Corporation  
Newtown, Pennsylvania

Su Chen  
Chiron Corporation  
Emeryville, California

Wei-Er Chen  
Mount Sinai School of Medicine  
New York, New York

Frank C. Church  
The University of North Carolina  
at Chapel Hill  
Chapel Hill, North Carolina

Jeffrey J. Clare  
Wellcome Research Laboratories  
Beckenham, United Kingdom

Karl Clauser  
Millennium Pharmaceuticals  
Cambridge, Massachusetts

Neil Cook  
Amersham Biosciences  
Cardiff, United Kingdom

Norman Cooper  
National Institute of Allergy &  
Infectious Diseases  
Bethesda, Maryland

Olivier Coux  
CRBM-CNRS  
Montpellier, France

Mark W. Crankshaw  
Washington University School of  
Medicine  
St. Louis, Missouri

Rachel A. Craven  
St. James's University Hospital  
Leeds, United Kingdom

Dan L. Crimmins  
Washington University School of  
Medicine  
St. Louis, Missouri

Esteban C. Dell'Angelica  
National Institute of Child Health  
and Human Development  
Bethesda, Maryland

Jean-Bernard Denault  
The Burnham Institute  
La Jolla, California

Nancy D. Denslow  
University of Florida  
Gainesville, Florida

Sharon Y. R. Dent  
M. D. Anderson Cancer Center  
Houston, Texas

Tamara L. Doering  
Cornell University Medical College  
New York, New York

Michael L. Doyle  
SmithKline & Beecham  
Pharmaceuticals  
King of Prussia, Pennsylvania

Ben M. Dunn  
University of Florida  
Gainesville, Florida

Patricia L. Earl  
National Institute of Allergy &  
Infectious Diseases  
Bethesda, Maryland

Lynn A. Echan  
The Wistar Institute  
Philadelphia, Pennsylvania

Diane G. Edmondson  
M. D. Anderson Cancer Center  
Houston, Texas

Elaine A. Elion  
Harvard Medical School  
Boston, Massachusetts

Paul T. Englund  
Johns Hopkins Medical School  
Baltimore, Maryland

Joseph Fernandez  
The Rockefeller University  
New York, New York

Russell L. Finley, Jr.  
Wayne State University School of  
Medicine  
Detroit, Michigan

Verna Frasca  
Amersham Pharmacia Biotech  
Piscataway, New Jersey

Hudson H. Freeze  
The Burnham Institute  
La Jolla, California

Sean Gallagher  
UVP, Inc.  
Upland, California

Kieran F. Geoghegan  
Pfizer, Inc.  
Groton, Connecticut

Michael Glickman  
The Technion  
Haifa, Israel

Erica A. Golemis  
Fox Chase Cancer Center  
Philadelphia, Pennsylvania

Gregory A. Grant  
Washington University School of  
Medicine  
St. Louis, Missouri

David Gray  
Chiron Corporation  
Emeryville, California

Gerald R. Grimsley  
The Texas A&M University System  
Health Science Center  
College Station, Texas

Nicolas Guex  
Glaxo Wellcome Experimental  
Research  
Geneva, Switzerland

Jeno Gyuris  
Mitotix, Inc.  
Cambridge, Massachusetts

Lars Hagel  
Pharmacia Biotech AB  
Uppsala, Sweden

Sandra Harper  
The Wistar Institute  
Philadelphia, Pennsylvania

Gerald W. Hart  
The Johns Hopkins University  
Medical School  
Baltimore, Maryland

James L. Hartley  
Science Applications International  
Corporation (SAIC)/National  
Cancer  
Institute Frederick, Maryland

Milton T. W. Hearn  
Monash University  
Victoria, Australia

Daniel N. Hebert  
Yale University School of Medicine  
New Haven, Connecticut

William J. Henzel  
Genentech, Inc.  
So. San Francisco, California

Mark Hochstrasser  
Yale University  
New Haven, Connecticut

Alison Hopkins  
Amersham Biosciences  
Cardiff, United Kingdom

L. Huang  
University of California  
San Francisco, California

Kevin Hughes  
Amersham Biosciences  
Cardiff, United Kingdom

Tony Hunter  
The Salk Institute for Biological  
Studies  
La Jolla, California

Caroline S. Jackson  
National Institute for Medical  
Research  
London, United Kingdom

C. R. Jiménez  
University of California  
San Francisco, California

Robert M. Kennedy  
Pharmacia Biotech, Inc.  
Piscataway, New Jersey

Mikhail G. Kolonin  
Wayne State University School of  
Medicine  
Detroit, Michigan

Stanley R. Krystek, Jr.  
Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical  
Research Institute  
Princeton, New Jersey

Jeffrey D. Laney  
Yale University  
New Haven, Connecticut

Thomas M. Laue  
University of New Hampshire  
Durham, New Hampshire

Edward R. LaVallie  
Genetics Institute, Inc.  
Cambridge, Massachusetts

Terry D. Lee  
Beckman Research Institute of  
the City of Hope  
Duarte, California

Shu-Mei Liang  
North American Vaccine Corp.  
Beltsville, Maryland

Kathryn S. Lilley  
University of Cambridge  
Cambridge, United Kingdom

Rex Lovrien  
University of Minnesota  
St. Paul, Minnesota

Elizabeth J. Luna  
Worcester Foundation for  
Biomedical Research  
Shrewsbury, Massachusetts

Johnny Ma  
Chiron Corporation  
Emeryville, California

Henryk Mach  
Merck Research Laboratories  
West Point, Pennsylvania

Thomas L. Madden  
National Center for Biotechnology  
Information  
Bethesda, Maryland

Anthony I. Magee  
National Institute for Medical  
Research  
London, United Kingdom

George I. Makhatadze  
Texas Tech University  
Lubbock, Texas

Mark C. Manning  
University of Colorado Health  
Science Center  
Denver, Colorado

Marc A. Marti-Renom  
The Rockefeller University  
New York, New York

Daumantas Matulis  
3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc.  
Yardley, Pennsylvania

John McCoy  
Genetics Institute  
Cambridge, Massachusetts

William J. Metzler  
Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical  
Research Institute  
Princeton, New Jersey

C. Russell Middaugh  
Merck Research Laboratories  
West Point, Pennsylvania

Sheenah M. Mische  
Boehringer Ingelheim  
Pharmaceuticals  
Ridgefield, Connecticut

Roger E. Moore  
Beckman Research Institute of  
the City of Hope  
Duarte, California

Bernard Moss  
National Institute of Allergy &  
Infectious Diseases  
Bethesda, Maryland

Jacek Mozdzanowski  
The Wistar Institute  
Philadelphia, Pennsylvania

Jiri Novotny  
Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical  
Research Institute  
Princeton, New Jersey

C. Nick Pace  
The Texas A&M University System  
Health Science Center  
College Station, Texas

Roger H. Pain  
Jozef Stefan Institute  
Ljubljana, Slovenia

Ira Palmer  
National Institutes of Health  
Bethesda, Maryland

Marina A.A. Parry  
Actelion Pharmaceuticals  
Allschwil, Switzerland

Mark Payton  
Glaxo Institute for Molecular  
Biology  
Geneva, Switzerland

Manuel C. Peitsch  
Glaxo Wellcome Experimental  
Research  
Geneva, Switzerland

Kevin J. Petty  
University of Texas Southwestern  
Medical Center  
Dallas, Texas

Allen T. Phillips  
Pennsylvania State University  
University Park, Pennsylvania

John S. Philo  
Alliance Protein Laboratories  
Thousand Oaks, California

Leland D. Powell  
University of California San Diego  
La Jolla, California

Y. Qiu  
University of California  
San Francisco, California

Kathryn M. Radford  
Glaxo Institute for Molecular  
Biology  
Geneva, Switzerland

Theodore W. Randolph  
University of Colorado  
Boulder, Colorado

David F. Reim  
The Wistar Institute  
Philadelphia, Pennsylvania

Pier Giorgio Righetti  
University of Milan  
Milan, Italy

Lise R. Riviere  
Pfizer, Inc.  
Groton, Connecticut

Stuart J. Rodda  
Chiron Technologies Pty. Ltd.  
Victoria, Australia

Michael A. Romanos  
Wellcome Research Laboratories  
Beckenham, United Kingdom

Keith Rose  
University Medical Center  
Geneva, Switzerland

Andrej Sali  
The Rockefeller University  
New York, New York

Guy S. Salvesen  
The Burnham Institute  
La Jolla, California

Gautam Sarath  
University of Nebraska  
Lincoln, Nebraska

Ton N. M. Schumacher  
Massachusetts Institute of  
Technology  
Cambridge, Massachusetts

Steven D. Schwartzbach  
University of Memphis  
Memphis, Tennessee

Torsten Schwede  
Glaxo Wellcome Experimental  
Research  
Geneva, Switzerland

R. K. Scopes  
LaTrobe University  
Bundoora, Australia

William H. Scouten  
Utah State University  
Logan, Utah

Brian Seed  
Massachusetts General Hospital  
and Harvard Medical School  
Boston, Massachusetts

Bartholomew M. Sefton  
The Salk Institute  
La Jolla, California

Ilya Serebriiskii  
Fox Chase Cancer Center  
Philadelphia, Pennsylvania

Shirish Shenolikar  
Duke University Medical Center  
Durham, North Carolina

Rajindar S. Sohal  
Southern Methodist University  
Dallas, Texas

David W. Speicher  
The Wistar Institute  
Philadelphia, Pennsylvania

Jane C. Spetzler  
Vanderbilt University School of  
Medicine  
Nashville, Tennessee

Timothy A. Springer  
Center for Blood Research  
Harvard Medical School  
Boston, Massachusetts

Earle Stellwagen  
University of Iowa  
Iowa City, Iowa

Julie M. Stone  
Massachusetts General Hospital  
Boston, Massachusetts

Kathryn L. Stone  
Yale University  
New Haven, Connecticut

John T. Stults  
Genentech, Inc.  
So. San Francisco, California

Shyam Subramanian  
Merck Research Laboratories  
West Point, Pennsylvania

James P. Tam  
Vanderbilt University School of  
Medicine  
Nashville, Tennessee

Paul Tempst  
Memorial Sloan-Kettering Cancer  
Center  
New York, New York

Theodore J. Tsomides  
Massachusetts Institute of  
Technology  
Cambridge, Massachusetts

Peter Uetz  
University of Washington  
Seattle, Washington  
and Research Center Karlsruhe  
Karlsruhe, Germany

Jeanine A. Ursitti  
The Wistar Institute  
Philadelphia, Pennsylvania

Peter van der Geer  
University of California San Diego  
La Jolla, California

Daniel Voytas  
Iowa State University  
Ames, Iowa

Kevin K.W. Wang  
Pfizer Global Research and  
Development  
Ann Arbor, Michigan

Jie Wen  
Amgen, Inc.  
Thousand Oaks, California

Herbert C. Whinna  
The University of North Carolina  
at Chapel Hill  
Chapel Hill, North Carolina

Sherwin Wilk  
Mount Sinai School of Medicine  
New York, New York

Alan Williams  
Pharmacia Biotech, Inc.  
Piscataway, New Jersey

Kenneth R. Williams  
Yale University  
New Haven, Connecticut

Paul T. Wingfield  
National Institutes of Health  
Bethesda, Maryland

Tyra G. Wolfsberg  
National Center for Biotechnology  
Information  
Bethesda, Maryland

Linda S. Wyatt  
National Institute of Allergy &  
Infectious Diseases  
Bethesda, Maryland

Dong Xu  
Oak Ridge National Laboratory  
Oak Ridge, Tennessee

Ying Xu  
Oak Ridge National Laboratory  
Oak Ridge, Tennessee

Liang-Jun Yan  
Southern Methodist University  
Dallas, Texas

Bozidar Yerkovich  
The Rockefeller University  
New York, New York

Mary K. Young  
Beckman Research Institute of  
the City of Hope  
Duarte, California

Louis Zumstein  
Introgen Therapeutics, Inc.  
Houston, Texas

## 推荐的背景读物

Branden, C. and Tooze, J. 1991. Introduction to Protein Structure. Garland Publishing, New York.

*Easy-to-read overview of basic structural principles of proteins with extensive illustrations.*

Creighton, T.E. 1993. Proteins: Structures and Molecular Properties. W.H. Freeman and Company.

*Clear and concise descriptions of biophysical and structural protein chemistry.*

Jagow, G. and Schagger, H. 1994. A Practical Guide to Membrane Protein Purification. Academic Press, San Diego.

*Deals with specific problems encountered when purifying membrane-associated proteins.*

Kyte, J. 1994. Structure in Protein Chemistry. Garland Publishing, New York.

*Comprehensive overview of structural principles of proteins with emphasis on physical chemistry approaches.*

Scopes, R.K. 1994. Protein Purification: Principles and Practice. Springer-Verlag, New York.

*In-depth description of most conventional protein purification methods.*

Zubay, G.L., Parson, W.W., and Vance, D.E. 1995. Principles of Biochemistry. William C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa.

*A current biochemistry textbook whose protein-related chapters provide a comprehensive background for readers with no formal training in biochemistry.*

John E. Coligan, Ben M. Dunn,  
David W. Speicher, and Paul T. Wingfield

# 目 录

译者的话

前言

参编者

推荐的背景读物

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| <b>第 1 章 蛋白质纯化和定性的策略</b> .....      | 1  |
| 1.1 单元 蛋白质纯化和定性概述 .....             | 1  |
| 目标和研究对象 .....                       | 1  |
| 蛋白质纯化的原料 .....                      | 2  |
| 蛋白质的检测和分析 .....                     | 3  |
| 蛋白质分离和纯化方法 .....                    | 3  |
| 蛋白质产物的定性 .....                      | 4  |
| 蛋白质纯化实验室 .....                      | 5  |
| 1.2 单元 蛋白质纯化流程图 .....               | 6  |
| 可溶性重组蛋白 .....                       | 6  |
| 不可溶性重组蛋白 .....                      | 7  |
| 可溶性非重组蛋白 .....                      | 8  |
| 膜相关的和不可溶性重组蛋白 .....                 | 10 |
| <b>第 2 章 计算分析</b> .....             | 12 |
| 2.1 单元 用于蛋白质序列分析的疏水分布图 .....        | 12 |
| 方法学 .....                           | 13 |
| 应用 .....                            | 14 |
| 结论 .....                            | 16 |
| 2.2 单元 蛋白质二级结构预测 .....              | 17 |
| 二级结构预测的方法 .....                     | 17 |
| 二级结构预测方法的应用 .....                   | 20 |
| 2.3 单元 使用 BLAST 程序家族进行序列相似性搜索 ..... | 22 |
| 进入 BLAST 程序和文档 .....                | 22 |
| BLAST 介绍 .....                      | 22 |
| BLAST 程序 .....                      | 24 |
| 2.4 单元 因特网上的蛋白质数据库 .....            | 27 |
| 蛋白质结构数据库 .....                      | 28 |
| 蛋白质家族数据库 .....                      | 29 |
| 2.5 单元 蛋白质三级结构预测 .....              | 30 |
| 同源性建模 .....                         | 31 |
| 序列分布图法 .....                        | 32 |

|                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 线程法 .....                                                              | 33        |
| 从头结构预测 .....                                                           | 33        |
| 2.6 单元 蛋白质三级结构建模 .....                                                 | 34        |
| 词汇 .....                                                               | 34        |
| 进入 SwissModel 程序和文档 .....                                              | 34        |
| ExPDB 数据库 .....                                                        | 35        |
| 创建首次法建模查询的格式 .....                                                     | 35        |
| 观看 SwissModel 结果 .....                                                 | 36        |
| 2.7 单元 比较蛋白质结构预测 .....                                                 | 36        |
| 比较建模的步骤 .....                                                          | 36        |
| <b>第 3 章 检测和分析方法 .....</b>                                             | <b>41</b> |
| 3.1 单元 分光光度法确定蛋白质浓度 .....                                              | 42        |
| 基本方案 1 计算一个蛋白质的摩尔吸收系数 .....                                            | 42        |
| 基本方案 2 折叠蛋白质摩尔吸收系数的测定 .....                                            | 42        |
| 基本方案 3 使用摩尔吸收系数通过吸收光谱测定蛋白质的浓度 .....                                    | 43        |
| 基本方案 4 通过 205 nm 处的吸收光谱测定蛋白质的浓度 .....                                  | 43        |
| 基本方案 5 粗蛋白质提取液总蛋白质浓度的测定 .....                                          | 44        |
| 3.2 单元 定量氨基酸分析 .....                                                   | 45        |
| 样品制备 .....                                                             | 45        |
| 平均组成的计算 .....                                                          | 45        |
| 3.3 单元 肽和蛋白质的体外放射标记 .....                                              | 47        |
| 基本方案 1 使用碘珠对酪氨酸或组氨酸残基进行碘化 .....                                        | 47        |
| 备择方案 1 用氯胺 T 或 Iodogen 在酪氨酸或组氨酸残基碘化 .....                              | 49        |
| 备择方案 2 使用乳酸过氧化物酶在酪氨酸或组氨酸残基碘化 .....                                     | 49        |
| 辅助方案 1 等摩尔碘化以获得产物的高收率 .....                                            | 50        |
| 辅助方案 2 用 HPLC 从碘化产物中分离未标记的肽 .....                                      | 50        |
| 基本方案 2 用 Bolton-Hunter 试剂在赖氨酸残基或 N 端碘化 .....                           | 51        |
| 基本方案 3 通过酸酐乙酰化在赖氨酸残基或 N 端进行 <sup>14</sup> C 或 <sup>3</sup> H 标记 .....  | 52        |
| 备择方案 3 通过还原性烷基化在赖氨酸残基或 N 端进行 <sup>14</sup> C 或 <sup>3</sup> H 标记 ..... | 53        |
| 备择方案 4 用碘乙酸或碘乙酰胺在赖氨酸残基进行 <sup>14</sup> C 或 <sup>3</sup> H 标记 .....     | 54        |
| 基本方案 4 在肽合成过程中引入标记的氨基酸残基 .....                                         | 54        |
| 备择方案 5 在肽合成过程中在 N 端进行选择标记 .....                                        | 55        |
| 3.4 单元 总蛋白质的分析 .....                                                   | 56        |
| 基本方案 1 总蛋白质定量的双缩脲分析 .....                                              | 57        |
| 基本方案 2 总蛋白质定量的 Hartree-Lowry 分析 .....                                  | 57        |
| 基本方案 3 总蛋白质定量的二喹啉甲酸 (BCA) 分析 .....                                     | 58        |
| 基本方案 4 总蛋白质定量的酸消化——茚三酮法 .....                                          | 58        |
| 辅助方案 1 热封玻璃管 .....                                                     | 59        |
| 基本方案 5 测量总蛋白质的考马斯染料结合分析 (Bradford 分析) .....                            | 60        |
| 辅助方案 2 蛋白质样品的凝胶透析 .....                                                | 60        |

|                                                            |           |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| 辅助方案 3 蛋白质样品的三氯醋酸沉淀 .....                                  | 61        |
| 3.5 单元 溶液中和细胞表面上蛋白质的生物素化 .....                             | 62        |
| 基本方案 1 将生物素共价连接到赖氨酸上 .....                                 | 62        |
| 基本方案 2 将生物素共价连接到巯基上 .....                                  | 63        |
| 辅助方案 1 二硫键的还原 .....                                        | 64        |
| 辅助方案 2 生物素化蛋白质的检测 .....                                    | 64        |
| 3.6 单元 用氨基酸进行代谢标记 .....                                    | 65        |
| 基本方案 用 [ <sup>35</sup> S] 甲硫氨酸对悬浮细胞进行脉冲标记 .....            | 65        |
| 备择方案 1 用 [ <sup>35</sup> S] 甲硫氨酸对贴壁细胞进行脉冲标记 .....          | 66        |
| 备择方案 2 用 [ <sup>35</sup> S] 甲硫氨酸对细胞进行脉冲追踪标记 .....          | 67        |
| 备择方案 3 用 [ <sup>35</sup> S] 甲硫氨酸对细胞进行长期标记 .....            | 67        |
| 辅助方案 用 TCA 沉淀确定标记掺入 .....                                  | 67        |
| <b>第 4 章 提取、稳定和浓缩 .....</b>                                | <b>69</b> |
| 4.1 单元 用透析和超滤法脱盐、浓缩和更换缓冲液 .....                            | 69        |
| 基本方案 1 用再生纤维素透析袋进行脱盐、浓缩和更换缓冲液 .....                        | 69        |
| 基本方案 2 用不对称圆盘膜超滤进行浓缩或透析 .....                              | 71        |
| 备择方案 1 用切向流超滤进行渗滤或浓缩 .....                                 | 73        |
| 备择方案 2 用离心式超滤器进行微量浓缩和脱盐 .....                              | 74        |
| 4.2 单元 蛋白质的选择性沉淀 .....                                     | 75        |
| 策略设计 .....                                                 | 75        |
| 基本方案 1 用盐析选择性沉淀 .....                                      | 76        |
| 备择方案 1 用分步盐析选择性沉淀 .....                                    | 78        |
| 基本方案 2 用等离子沉淀选择性沉淀: 柱法 .....                               | 78        |
| 备择方案 2 用等离子沉淀选择性沉淀: 透析法 .....                              | 80        |
| 基本方案 3 使用 C <sub>4</sub> 和 C <sub>6</sub> 有机共溶剂选择性沉淀 ..... | 80        |
| 基本方案 4 使用蛋白质排阻和拥挤剂及渗透物选择性沉淀 .....                          | 81        |
| 基本方案 5 使用合成的和半合成的聚合电解质选择性沉淀 .....                          | 82        |
| 基本方案 6 使用金属和多酚杂多阴离子选择性沉淀 .....                             | 83        |
| 4.3 单元 蛋白质的长期保存 .....                                      | 84        |
| 蛋白质聚集 .....                                                | 84        |
| 化学降解 .....                                                 | 85        |
| 在不冻的水溶液中保存 .....                                           | 85        |
| 以盐析沉淀物的形式保存 .....                                          | 86        |
| 以冻结溶液的形式保存 .....                                           | 86        |
| 以冻干固体的形式保存 .....                                           | 87        |
| 选择适当的保存方法 .....                                            | 89        |
| 蛋白酶的抑制 .....                                               | 89        |
| <b>第 5 章 重组蛋白的生产 .....</b>                                 | <b>90</b> |
| 5.1 单元 在大肠杆菌中生产重组蛋白 .....                                  | 91        |
| 5.2 单元 大肠杆菌表达系统的选择 .....                                   | 92        |