



· 导读版 ·

Protein Biochemistry and Proteomics

(The Experimenter Series)

实验者系列:

蛋白质生物化学与蛋白质组学

Hubert Rehm



原版引进



科学出版社

www.sciencep.com

图字: 01-2006-7342 号

This is an annotated version of

Protein Biochemistry and Proteomics

(A translation of Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics by Hubert Rehm, ISBN 3-8274-1726-0 © 2006 Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg)

Copyright © 2006, Elsevier Inc.

ISBN-13: 978-0-12-088545-9

ISBN-10: 0-12-088545-X

All rights reserved.

No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopy, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher.

AUTHORIZED EDITION FOR SALE IN P. R. CHINA ONLY

本版本只限于在中华人民共和国境内销售

图书在版编目 (CIP) 数据

蛋白质生物化学与蛋白质组学: 英文/(德) 雷姆 (Rehm, H.) 编著. —影印本. —北京: 科学出版社, 2007
ISBN 978-7-03-018218-0

I. 蛋… II. 雷… III. ①蛋白质-生物化学-研究-英文②蛋白质-基因组-研究-英文 IV. Q51

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 148109 号

责任编辑: 孙红梅/责任印制: 钱玉芬/封面设计: 耕者设计工作室

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: 16 1/2

印数: 1—3 000 字数: 350 000

定价: 48.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈科印〉)

导 读

基因组学研究是生物科学近十几年来的研究热点。基因组密码的破译,拉开了生命科学研究的序幕。但是,要真正揭示生命活动的奥秘,研究基因组本身还远远不够。因为,基因组仅仅是遗传密码和遗传信息的载体,不能反映有机体在生命活动过程中基因表达的时空关系和网络调控,蛋白质才是基因功能的体现者和执行者。众所周知,活细胞中只有一个基因组,但可能有许多不同的蛋白质组,后者比前者复杂的多。现在已经证明,一个基因并不只产生一个相应的蛋白质,它可能会产生几个,甚至几十个蛋白质。机体所处的不同环境和本身的生理状态差异,会导致基因转录产物有不同的剪切和转译成不同的蛋白。尽管蛋白质组学在 20 世纪 90 年代中后期才出现,由于学科的前沿性和巨大的应用市场,现已被认为是后基因组学前沿研究的战略制高点。因此,研究基因组编码的全蛋白质功能及其相互作用关系的蛋白质化学和蛋白质组学是当前的热门学科。

如何专攻这一领域和有效的开展这方面的研究,德国生理化学和病理生物化学研究所(Institute for Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, Duesbergweg 6, D-55099 Mainz, Germany) Rehm 博士编写了《蛋白质生物化学与蛋白质组学》(Protein Biochemistry and Proteomics)一书,并由 Elsevier Ltd 公司于 2006 年出版了第五版(2002 年为第四版)。该书从权威人士的视点,为你讲述蛋白质生物化学和蛋白质组学研究的新方法,它既非教科书,亦非单纯的方法集锦,它只告诉读者去哪儿寻找这些方法,重点集中于策略性的建议,选择这种或那种方法的原因是什么,通过这种方法你能获得什么,有了这些技巧和诀窍,为你指明走出实验困境的道路,培养你适时选择正确实验的直觉;该书简洁明了地概括了常规方法(例如柱层析、凝胶电泳)的步骤,还列出了不同方法的优缺点;它详细介绍了配体结合实验、抗体生产和氨基酸序列分析方面的进展;还论述了一些特殊方法,例如膜蛋白的溶解和重组、糖蛋白分析,或寡聚体蛋白质亚基的确定。

全书包括常规技术、配体结合、膜蛋白的溶解、通过功能测定检测蛋白质、去除杂质和纯化、抗体、蛋白质组学、亚基、糖蛋白等九大章节,以及如何进行文献调研和科技论文写作等内容。

第一章 常规技术

1.1 缓冲液的配制

缓冲液的选择和配制是实验成功的第一步。不同的缓冲液有不同的 pH 范围,从 pH 4.8 的 Citrate 至 pH 10.4 的 CAPS 等多达 20 余种缓冲系统。

1.2 蛋白质定量

BCA 法:二辛可宁酸法(Bicinchoninic acid)法是近来广为应用的蛋白定量方法,在碱性环境下蛋白质与 Cu^{2+} 络合并将 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ 。BCA 与 Cu^+ 结合形成稳定的

蓝紫色复合物，在 562 nm 处有高的光吸收值并与蛋白质浓度成正比，据此可测定蛋白质浓度。BCA 蛋白测定方法灵敏度高，操作简单，试剂及其形成的颜色复合物稳定性俱佳，并且受干扰物质影响小。

Bradford 法：蛋白质与染料考马斯亮蓝 G-250 结合，使得染料最大吸收峰从 465 nm 变为 595 nm，溶液的颜色由棕色变为蓝色，595 nm 波长下吸光度值与蛋白含量成正比。灵敏度与 BCA 法相当。

Lowry 法：蛋白质与 Cu^{2+} 反应，产生蓝色的反应物，通过比色方可测得蛋白质含量。但反应需要的时间较长，容易受到非蛋白物质的影响，含 EDTA，Triton X-100，硫酸铵等物质的蛋白不适合此种方法。

Starcher 法：基于蛋白质与茚三酮共热呈现出蓝紫色，并在 570 nm 波长下测试其含量。

蛋白质 UV 法：蛋白质在 280 nm 波长下直接测试其含量。

1.3 凝胶电泳

SDS 凝胶：蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶电泳时，它的迁移率取决于它所带净电荷以及分子的大小和形状等因素。如果在丙烯酰胺凝胶系统中加入阴离子去污剂十二烷基磺酸钠 (SDS)，则蛋白质分子的电泳迁移率不再受蛋白质电荷和形状的影响，而取决于分子量大小，因此聚丙烯酰胺凝胶电泳可以用于测定蛋白质的分子量。

无堆积胶的 SDS 凝胶电泳快捷法：SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳大多在包括积层胶和分离胶两部分不连续系统中进行，样品通过高度多孔性的积层胶后，复合物在分离胶表面聚集成一条很薄的区带（或称积层），从而提高了 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的分辨率，使蛋白依各自的大小得到分离，不要积层胶将会快捷进行电泳。

天然凝胶：在不含 SDS 蛋白质变性剂时用非变性电泳分离天然蛋白质，尽管这种方法通常缺乏变性电泳的分辨率，但当蛋白须保留生物活性时非常有用。

1.4 凝胶染色：蛋白质电泳后，先将蛋白质快速固定在凝胶，漂洗掉 SDS 后，立刻进行 CBB 或银染或荧光 SYPRO 染色，将蛋白质点显现出来；其中银染的分辨率要比其他二者显现度高。为了进行蛋白质组比较和长期保存，可通过甘油和真空加热来干燥凝胶。

1.5 沉淀和浓缩：采用氯仿/酒精等变性沉淀，或低温、PEG 等天然沉淀后，通过冰冻干燥或离心浓缩蛋白质；还可采用透析来分离纯化浓缩蛋白质。

1.6 印迹：蛋白质经 SDS 电泳后先转移到 PVDF 膜上，可直接进行 CBB 或荧光 SYPRO 染色显现蛋白质印迹。同时也可进行选取特异蛋白质抗体进行免疫显色，或 Ca^{2+} 结合、配体显色进行定量或定性检测。

1.7 凝胶和印迹的放射自显影：用放射性同位素如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 等标记蛋白质特殊结构或功能基团等，使其放射自显影，确认其蛋白质的结构和功能、种类和性质等。

第二章 配体结合

放射性同位素可利用其衰变时放出的放射线进行测量，这种测量较灵敏且方便，常用的放射性同位素有 ^3H 和 ^{125}I 等。放射受体分析或受体的放射配体结合分析，是建立在放射性标记配体与受体之间的结合反应，它是目前对受体分子进行定量和定位分析研究

的灵敏、可靠的一项技术。在药物设计、作用机理、生物效应及疾病的病因探讨,诊断和治疗等方面的应用已有较大进展。

多肽与蛋白质多用碘标记,最常用的是 ^{125}I 。碘化反应的基本过程如下:通过氧化剂的作用,使碘化物($^{125}\text{I}^-$)氧化成的碘分子($^{125}\text{I}_2$)再与多肽、蛋白质分子中的酪氨酸残基发生碘化作用。影响蛋白质、多肽碘化效率的因素,主要决定于蛋白质、多肽分子中酪氨酸残基的数量及它们在分子结构中暴露的程度;此外,碘化物的用量、反应条件(pH、温度、反应时间等)及所用氧化剂的性质等也有影响。

放射性配基是受体放射分析法中关键所在,它可以是氚标记或碘标记的。在实验中,由于生物材料的量有限,受体浓度降低,因而要求配基的放射性活度和特异性均很高,在这方面碘标记物远远优于氚标记物。

配体本身通常具有其特别的生物活性,并且能和受体结合,呈现特异性的生物活性分子。常见于细胞间的讯息传导,而传导的方式是通常配体与受体结合后造成细胞间质与原先不同而改变。放射性配体结合分析法的基本原理,理论上讲,受体-配体之间的动力学,颇类似于酶-底物的相互作用。受体与配体分子之间的结合是特异性的、可逆性的,其反应动力学特征通常用正向或逆向反应速度常数 k_f 或 k_r 及亲和力 k_a 表示。 k_f 与 k_r 可分别反映受体与配体结合与解离的速率, $k_a=k_f/k_r$,表示两者的结合能力。当受体或配体分子至少一种处于游离状态时,受体与配体之间的结合是三维的。目前,已有许多方法研究三维受体配体反应动力学。当受体配体均位于细胞表面时,受体与配体之间的结合则局限于两细胞之间的二维空间。很长时间以来,由于缺乏研究二维动力学的方法,故直到90年代流动腔和微吸管技术的相继引入,关于受体配体结合动力学的研究才由三维转入到二维水平。二维动力学研究的指导思想是通过黏附概率与接触时间的相关性求得动力学参数。

本章里述论了放射性配体标记技术和常出现的问题,包括肽和蛋白质的碘化、碘化过程的问题和对策、低分子量分子的碘化、碘化组分的纯化、碘化法的优点和缺点、氚标记;有关配体结合实验操作问题,如膜的分离、结合实验、膜结合实验、膜结合实验的改进、可溶性蛋白的结合实验、无法结合;同时讨论了配体结合数据的分析,包括平衡态结合反应、动力学;配体交联,包括三组分交联(3C交联)、光亲和交联、交联实验的对照;以及结合蛋白的用途等。

第三章 膜蛋白的溶解

由于膜蛋白的膜内区域具有广泛的疏水表面,从而能够适应生物膜上的非极性环境,也正是这一特点使得膜蛋白从膜上解离下来后在极性的水溶液中难以稳定存在,会发生沉淀甚至变性,它的溶解需要去垢剂的帮助。

去垢剂为双极性分子,由一疏水性尾部和一亲水性头部组成,可在水中溶解。除胆酸盐外,去垢剂分子通常是由线性或带有分枝的碳氢化合物尾部和结构各不相同的亲水性头部组成。去垢剂的一个重要特性就是可以形成分子团结构。当膜蛋白与去垢剂分子接触时,膜蛋白的疏水区或穿膜区被去垢剂分子覆盖,成簇的去垢剂分子将亲水性头部向外,使其能与水溶性缓冲液相溶。另外,去垢剂形成的微胶粒分子量对于透析、凝胶过滤层析、非变性电泳都是非常重要的。为了使蛋白质更好的溶解和保持蛋白质的活

性，需选择合适的去垢剂。如溶解膜蛋白可选择 TritonX-100；SDS 等离子型去垢剂由于可使蛋白质以单体形式被分离，常用于蛋白质分子量的测定；CHAPS 常用于离子交换层析和等电聚焦电泳，含有 CHAPS 的蛋白质溶液可以冰冻保存。选择合适的去垢剂和缓冲液，可以实现膜蛋白的完全溶解，不同的去垢剂其溶解膜蛋白的程度和强弱有别。

本章重点讲述了与膜蛋白的溶解相关的去垢剂名词解释、去垢剂的使用，膜蛋白溶解的标准和溶解膜蛋白的物理参数。

第四章 通过功能测定检测蛋白质

蛋白质转运体在细胞中发挥着重要作用，并存在各种各样的转运体。脂质体又称为磷脂膜，在水中形成的一种由脂质双分子层组成的，内部为水相的闭合囊泡。按其结构分为小单室脂质体（SUVs）、大单室脂质体（LUVs）和多室脂质体（MLVs）三种。脂质体作为一种药物载体应用十分广泛，迄今已成为一种典型的模型，且在生物物理学、治疗物理学、化学、胶体学等各种学科领域中广泛应用。

利用脂质体作为研究模型，将分离纯化的膜蛋白重新组装到脂质体上，用来研究各种膜蛋白的性质和功能，及其与脂质的相互关系。将膜蛋白重组到脂质体上的方法也有很多种，包括直接超声法、冻融超声法、去污剂稀释去除重组、融合重组等。因此，应根据不同的研究目的选择最有效的重组方法，有时还应根据需要对某些重组方法加以改进，如选择合适的去污剂种类和浓度；根据需要选择磷脂种类、各磷脂的比例；在磷脂中加入一定比例的胆固醇，以降低膜脂的流动性，并降低膜的通透性；选用适当比率的磷脂/蛋白质/去污剂，以达到最佳重组效果；在重组缓冲液中加入一定浓度的 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} ，以提高重组膜蛋白的生物活性。目前最常用的重组方法是去污剂稀释去除法，已经用来重组了很多膜蛋白（或膜酶）脂质体。

在本章里主要讲述的内容有转运体包括脂质体和蛋白脂质体，膜蛋白的重组还原即从溶液中重组和重组入预先形成的脂质体，通量实验如流入检验和流出检验，以及有关通过功能测定检测蛋白质一些建设性的意见。

第五章 去除杂质和纯化

分离提纯某一种蛋白质时，首先要破碎组织或细胞，根据欲制备的蛋白质的性质选择适当的缓冲液溶剂，如适宜的 pH、离子强度、表面活性剂（SDS、TritonX-100 等）、蛋白质抑制剂（PMSF、EDTA 等）等把蛋白质提取出来，尽可能保持原来的天然状态，防止蛋白质的变性。再根据蛋白质溶解度不同，通过蛋白质的盐析、等电点沉淀法、低温有机溶剂沉淀法等纯化；也可根据蛋白质分子大小的差别选用透析与超滤、凝胶过滤法，根据蛋白质带电性质选用电泳法、离子交换层析法，根据配体特异性的亲和色谱法等进一步纯化。用等电点法、盐析法所得到的蛋白质一般含有其他蛋白质杂质，须进一步分离提纯才能得到有一定纯度的样品。常用的纯化方法有：凝胶过滤层析、离子交换纤维素层析、亲和层析等等。有时还需要这几种方法联合使用才能得到较高纯度的蛋白质样品。

本章节里重点介绍了蛋白质纯化的过程及其常规纯化方法如蛋白质柱层析技术、基

于分子量差异的纯化、基于电荷差异的纯化、疏水层析、蓝色凝胶等；还对凝集素层析、配体层析等亲和层析方法进行了分析比较，同时介绍了蛋白质纯度检验和纯化蛋白的作用等。

第六章 抗体

抗体是机体在抗原物质刺激下所产生的、可与相应抗原发生特异性结合反应的免疫球蛋白 (Ig)，具有结合抗原、结合补体、中和毒素、介导细胞毒、促进吞噬等功能和抗感染、抗肿瘤、免疫调节和监视等作用。抗体的分类按作用对象，可将其分为抗毒素、抗菌、抗病毒抗体和亲细胞抗体；按理化性质和生物学功能，可将其分为 IgG、IgA、IgM、IgE、IgD 五类；按与抗原结合后是否出现可见反应可将其分为在介质参与下出现可见结合反应的完全抗体，以及不出现可见反应，但能阻抑抗原与其相应的完全抗体结合的不完全抗体；按抗体的来源，可将其分为天然抗体和免疫抗体。

本章重点讲述了多克隆抗体的获得，包括抗原、佐剂、注射抗原和取血清、抗体纯化等；免疫沉淀包括利用固定化蛋白 A 进行免疫沉淀和利用固定化抗体进行免疫沉淀，免疫亲和层析、不纯蛋白的抗体、免疫学检测技术等。

第七章 蛋白质组学

蛋白质是最重要的也是研究得最早的生物大分子，由于其复杂性和不像核酸那样可体外复制等原因，其研究滞后于基因。在基因组学研究成果之上，结合蛋白质科学研究的突破，高通量地开展蛋白质的表达、结构与功能等成为可能。自 1994 年澳大利亚学者 Wilkins 等提出蛋白质组的概念以来，蛋白质组学应运而生，并被很快地应用于生命科学和医学的各个领域，成为新世纪功能基因组学研究的热点。

本章简介了蛋白质组学产生的科学背景、意义，重点论述了开展蛋白质或蛋白质组的分离鉴定和功能分析的新技术和新方法，包括蛋白质样品的提取；通过双向凝胶电泳分离蛋白质和得到二维蛋白质组表达谱；用 MALDI 和 ESI 质谱进行蛋白质鉴定和多肽分析，包括质谱仪、MALDI 质谱的样品制备、MALDI 和 ESI 质谱的用途；利用蛋白质芯片快速对混合蛋白质样品进行检测，如应用 SELDI 技术的蛋白质芯片、蛋白质芯片的可行性、适配体等；通过 Edman 降解法和 MS 技术进行氨基酸序列测定，包括蛋白质样品准备、封闭的 N-末端、蛋白质裂解成肽段、Edman 降解、羧基端序列分析、肽段的阶梯序列分析，以及开展蛋白质组学研究的一些策略性的观点等。

第八章 亚基

蛋白质的生物学功能在很大程度上取决于其空间结构，蛋白质结构构象多样性导致了不同的生物学功能。蛋白质的基本组成单元为氨基酸，它们之间通过肽键进行连接，组成蛋白质的一级结构。多肽链按照一定方式规则地旋转或折叠，形成蛋白质的二级结构。肽链再进一步折叠而构成复杂的三级空间结构。由两条或两条以上多肽链构成的蛋白质分子，结构就更为复杂，其结构的最小共价单位称为亚基。亚基与亚基之间通过范德华力、氢键、离子键和疏水作用还有亚基间的二硫键等次级键结合成为有序排列的特定的空间构象，称为四级结构，如乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor) 由五个亚基

(亚基 $\alpha 2\beta\gamma\delta$) 组成四级结构的蛋白质功能复合体。蛋白质的四级结构涉及亚基种类和数目以及各亚基或原聚体在整个分子中的空间排布, 包括亚基间的接触位点 (结构互补) 和作用力 (主要是非共价相互作用)。

本章重点论述了通过 X-射线结构解析、杂交实验、交联实验、氨基酸分析或抗体法等确定亚基数量与比例的特点和各自的优缺点; 还讨论了是什么力量使亚基间能结合问题。

第九章 糖蛋白

糖蛋白是一种或一种以上的杂多糖藉共价联结作为辅基的蛋白质, 如大多数血浆蛋白、乳蛋白和卵蛋白、黏蛋白, 免疫系统和结缔组织成分, 有些激素、抗体, 以及许多药物等。糖蛋白在肌体内具有多种生物学功能, 与细胞识别黏着、运动迁移、免疫应答、物质运输、信息传导、细胞分裂、细胞分化、衰老及病变、癌变都有密切的关系。糖肽连接键的类型主要有以丝氨酸、苏氨酸和羟赖氨酸的羟基为连接点的-O-糖苷键型; 以天冬酰胺的酰胺基, N-末端氨基酸的 α -氨基以及赖氨酸或精氨酸的 W-氨基为连接点的-N-糖苷键型; 以天冬氨酸或谷氨酸的游离羧基为连接点, 形成酯糖苷键型; 以羟脯氨酸的羟基为连接点的糖肽键; 以半胱氨酸为连接点的糖肽键。

本章讲述了蛋白质糖基化的方式、位点和作用, 通过凝胶电泳检测糖蛋白的方法, 采用非选择性糖蛋白显色和选择性 (凝集素) 显色的印迹法检测糖蛋白; 同时介绍了通过糖基化抑制剂、内切糖苷酶、化学法等技术脱糖基化的方法, 有关糖链包括单糖组分、结构与序列等内容。

沈世华 研究员
中国科学院植物研究所
2006 年 10 月

前 言

我不妨告诉你，我写这部书虽然费心，却不像现在写这篇前言这样吃力。

(塞万提斯，1605)¹

在实验中，你是否严格遵循标准流程却一无所获？你是否想改进你的工作？你想更多了解某一研究领域的各种方法吗？或许“实验者”丛书将对你有所帮助。

我对“实验者”的定位，既非教科书，亦非单纯的方法集锦。教科书中讲述的是人们已有的知识，如同展示科学这座房屋。方法指南一类的书（“菜谱”）讲述的是建造这座房屋所需的石料和工具。而“实验者”的目的在于为建造过程提供指导，调查目前房屋的流行式样，预算工程的工作量和造价。其中应当说明，哪些方法是可行的，这些方法适用的和不适用的范围，应当采取怎样的研究策略，遇到问题该如何解决，以及可能涉及哪些工作。不要把“实验者”摆在你的实验台上；它应当放在你的床头，当你的某个实验已经失败了多次，或者你需要新的思路时，让它帮助你从“哲学”的角度审思。“实验者”就应当成为这样一部策略性的书。我并没有完全达到这一目标，某些章节看起来仍像方法集锦。然而，“实验者”并没有穷究方法的细节，而是全面介绍对实际工作方法进行了描述的参考文献。而这本书中详细介绍的技术，却是在其他任何书中都难以找到的。

参阅其他文献来讨论方法可行性的细节，优点是简洁，并且促使学者去阅读和理解文献，还有助于培养研究人员适时选择正确的实验的能力。除此之外，你也可以在他人的启示下获得灵感。“菜谱”非常实用，但当你不知道什么时候该采用某种方法（比如凝胶过滤）时，它的作用就很有限了。而且，当你试图发明几道“新菜”（也就是新方法）时，“菜谱”几乎帮不上什么忙。

诚然，许多作者在自己的出版物中（此处特指研究论文）所叙述的方法并不完整，或难以理解。一些人这样做是为了阻挡同行的竞争，还有一些是因为懒惰，或者由于论文页数的限制而缺乏足够的篇幅。我在大量论文当中搜寻最好的，时间最近，可读性最强，方法最可能重复。我相信我已经找到了许多实用的方法说明。我了解其中的许多方法，或者曾在自己的实验室中尝试过。假如你知道新的方法或有关某一方法更好的论文，我将非常乐意与你交流。

无论如何，不要把论文奉若圣典。即使是 Lowry 蛋白质定量法，也不曾对所有蛋白质都进行过检验和优化。对此蛋白质而言最佳的操作流程，或许对彼蛋白质并非如此。对方法的选择应当慎重，多提一些疑问（为什么用磷酸缓冲液？为什么事先加入某种酶保温？）。的确，首次采用一种方法时，最好严格遵照标准流程。但之后根据实际而

¹ 此处及其后所有引文均出自米盖尔·台·塞万提斯·萨拉维德拉的著作《奇情异想的著名拉·曼却绅士唐吉珂德》。（意译：此处及其后所有引文均出自西班牙作家塞万提斯的小说《唐吉珂德》。）

修改的方法或许更加实用。同时，你应当留意一切有关实验或方法的优越性、速度或灵敏度方面的结论。另一方面，应当重视有关不利因素的警告。学者写论文的目的不是为了帮助自己的同行，而是为了得到认可，扩充自己的论著名录。“实验者”的风格显然是非学术性的。

最后，有关科学研究的书总是大量谈及科学的魅力，求知的渴望以及热情，却很少提及没完没了的移液，失败的实验，以及资金的匮乏。多年工作得到的结论常常只是“这条路是行不通的”。只有当幸运、勤奋、灵活性、好导师和智慧同时具备时，才能从实验台上取得成功。因此，你的工作正如游侠骑士的冒险：每天驾着步履踉跄的“驽骐难得”（Rosinante，唐吉珂德的老马——译者注）冲向一座由难缠的首领统治的城堡。你竭尽全力，但结果却令人迷惑。伙食糟糕透顶，挫折成了家常便饭。然而，这次尝试坚定了你的信念。你从绝望的深渊走出来，看到一条条灰色的崎岖的路伸向似乎无尽头的地平线。不要泄气！别人也同样没有成功，却仍在拼命工作。当你刚开始一项工作时，你无法预想它的结局，这是很正常的。坚持到底！

Hubert Rehm

（赵颖 译 沈世华 校）

第四版前言

“实验者”又出新版了！原因是什么？它紧紧扣住了读者的心弦：“实验者”并没有学究气十足地罗列操作方法，它只告诉读者去哪儿寻找这些方法。它的重点集中于策略性的建议：选择这种或那种方法的原因是什么？通过这种方法你能获得什么？它可以帮你解决哪些问题？“实验者”不是操作指南，但可以指引你应对挑战；它不是埃默里（Emeril，著名美国厨师——译者注），而是巴顿（Patton，美国将军）。看来研究人员需要这样的一本书：它的销售速度比蛋白质生物化学的发展还要快。

但是，这并不是说蛋白质生物化学在过去的一年中没有进展。方法学家不懈努力而取得的成果令人惊讶。谁曾想过 Lämmli 体系仍然可以改进？谁曾料到有人能够发明一种新的蛋白质定量方法，而且显然比已有的六种方法更具优势？还有，你能相信吗？直到 2000 年研究人员才找到从实验小鼠体内取血的简便而且无痛的方法，而小鼠作为实验材料已经有几百年历史了。在 C-末端微序列测定和寡聚糖生物化学等方面，也取得了类似的进展。还有不要忘记重要方面——我增加了有关 His-标签蛋白质纯化的一节。

但是为什么仅仅满足于阅知别人的结果呢？你自己是否也有一些诀窍和成功的策略呢？把它们发至 hr@laborjournal.de，你将可以在第五版中发现自己的名字。当然，你将享受到阅读自己的成就的乐趣！

Hubert Rehm

2002 年春天

（赵颖 译 沈世华 校）

致 谢

在此，我衷心感谢 Harald Backus, Siegfried Bar, Inge Bliestle, Cord-Michael Becker, Jurgen Dedio, Heiko Herwald, Willi Jahn, Dieter Langosch, Stefan Mertens, Werner Muller-Esterl, Jaques Paysan, Andre Schrattenholz, Sabine Schrimpf, Christian Schroder, Andreas Trindl, Rando Wiech, Angelika Zengerle, 以及 Jasminka Zimmermann 的意见、提示、校正和支持。

同样，假如没有 Spektrum Akademischer Verlag 出版社的项目策划者 Ulrich Moltmann 的鼓励和难以置信的耐心，“实验者”恐怕永远不会面世。而编辑 Inga Eichen, Jutta Hofmann 以及 Bettina Saglio 对文字的精心修改将给读者造成这样的错觉（希望如此，但我不敢保证）：我还粗通一些语法和标点的使用。

“没有比这再糟的一本书了，不过倒还有一些可取之处，”骑士说。

（赵颖 译 沈世华 校）

Preface

For I can tell thee, though composing it cost me some labour, I found none greater than the making of this Preface thou art now reading.

(Cervantes, 1605)¹

You don't make any progress with your methodical repertoire? You want to give your work a new direction? You want to learn more about the methodical variety of a given field? Maybe the EXPERIMENTER can help you.

In writing the EXPERIMENTER, I wanted to write neither a textbook nor a pure method collection. Textbooks tell about everything that has already been investigated: they show the house of science. Method books (cookbooks) describe the individual stones and tools. However, the EXPERIMENTER aims to provide guidance in the construction, to convey what type of houses are currently in fashion, and to explore how much work the construction takes and how much is paid for it. It should indicate what methods are available, what they are or are not suited for, which research strategies can be pursued, how tasks are tackled, and how much work is likely to be involved. You don't put the EXPERIMENTER on the lab bench; you take it to bed with you to "philosophize" when the experiment has failed for the twelfth time or when you need new ideas. A strategy book, that's what the EXPERIMENTER should be. I have not achieved this completely, as in some sections it still resembles a method collection. Yet, the EXPERIMENTER does not overly delve into the details of the methods but recommends literature describing the methods in a comprehensive manner for practical work. This book provides only those techniques not found elsewhere.

The tactic of discussing the possibilities of methods while referring to other publications for their details has the advantage of brevity. It also encourages the reading and understanding of the literature and helps to develop a feeling for the right experiment at the right time. In addition, the inspirations of others inspire your own ideas. "Cookbooks" have their utility. However, it does not suffice to be able to perform, for example, gel filtration if you do not know when it makes sense to use it. And when you are inventing new recipes (i.e., methods), cookbooks are of little help anyway.

Admittedly, many authors document methods incompletely or incomprehensibly in their publications (from here referred to as papers). Some do this to keep the competition in their field at bay. Others do so because they are lazy or because of a lack of space due to page limitations for articles. I searched the paper jungle for the best, most current, most readable, and most reproducible methods, and I believe I have found useful instructions. I know many of these recipes or have tried them in my own kitchen. If you know new methods or better papers for a method, I would be grateful for a communication.

In any case, you should not approach papers as if they hold the holy revelation. Even the Lowry Protein Assay has not been examined and optimized in every direction, and a protocol that is optimal for protein 1 may not be so for protein 2. Treat methods circumspectly. Question them (why phosphate buffers, why incubate before with X-ase?). Upon first application it is actually advisable to follow a protocol exactly, but later a playful interaction with the recipe is more useful. Also, you should be wary of all assertions regarding advantages, speed, or sensitivity of the tests or methods. On the other hand, warnings about disadvantages should be taken seriously. Researchers write papers not to assist their colleagues but to receive their recognition and to extend their publication list. The tone of the EXPERIMENTER is pointedly unacademic.

1. These and all other quotes found in the book come from Miguel de Cervantes Saavedra's *The Life and Deeds of the Keen Nobleman Don Quixote of la Mancha*.

Finally, books on scientific research talk a lot about fascination, thirst of knowledge, and enthusiasm. You find little on endless pipetting, failed experiments, and lack of funding. Many years' work often leads only to the discovery that there is nothing to discover in the direction taken. Only luck, diligence, ingenuity, good mentoring, and intelligence—in this order—bring success at the lab bench. Thus, your adventures will resemble those of the knight errant: every day and Sunday you take your tottery Rosinante to a castle where the king is difficult, the efforts great, the results bewildering, the food bad, and setbacks the rule. However, this time of trial strengthens your soul. From the abyss of desperation you rise to the level of indifference, where gray rough streets lead to seemingly endless horizons. Don't let yourself be discouraged! The others also slave away unsuccessfully. It is normal at first that no result is in sight. Hang in there!

Hubert Rehm

Preface to the Fourth Edition

Again a new edition of the EXPERIMENTER! The reason? It struck a chord with the readers: the EXPERIMENTER does not pedantically list method instructions, it only tells where these are to be found. It concentrates on strategical pieces of advice: For what can you use this or that method? What can you gain from it? Which problems can it help you solve? The EXPERIMENTER is no cookbook, but guides you “through battle”; it is no Emeril, but a Patton. Researchers seem to need this: the book sells faster than protein biochemistry is developing.

That does not mean, however, that protein biochemistry was standing still last year. It is astonishing what the method crafters have found out in their diligence. Who would have thought that the Lämmli system could still be improved on? Who would have guessed that somebody could develop a new method of protein determination with obvious advantages compared to the existing half-dozen protocols? And would you have believed that it would take researchers until the year 2000 to figure out how to draw blood from lab mice in a convenient and painless way—after centuries of contact with these rodents? Things were also happening in the biochemistry of oligosaccharides as well as in c-terminal microsequencing and—not to overlook the big guys—I added a chapter on the purification of His-tagged proteins.

But why do you just want to read about others? Don't you have your own tricks and success strategies? Send them to *hr@laborjournal.de* and you'll find your name in the fifth edition. Of course, you'd really enjoy reading about yourself!

Hubert Rehm
Spring 2002

Acknowledgments

For their ideas, tips, corrections, and support I'd like to give my warmest thanks to Harald Backus, Siegfried Bar, Inge Bliestle, Cord-Michael Becker, Jurgen Dedio, Heiko Herwald, Willi Jahnen, Dieter Langosch, Stefan Mertens, Werner Muller-Esterl, Jaques Paysan, Andre Schrattenholz, Sabine Schrimpf, Christian Schroder, Andreas Trindl, Rando Wiech, Angelika Zengerle, and Jasminka Zimmermann.

Also, the EXPERIMENTER would have quietly passed away in the course of writing if it had not been for the courage and tough patience of the program planner of the Spektrum Akademischer Verlag, Ulrich Moltmann. And the care with which the editors Inga Eicken, Jutta Hofmann, and Bettina Saglio edited the text will (hopefully) create the (unwarranted) illusion that I understand something of grammar and punctuation.

"There is no book so bad but it has something good in it," said the bachelor.

Abbreviations

BSA	bovine serum albumin
CF	chromatofocusing
CFA	complete Freund's adjuvant
DMSO	dimethylsulfoxide
DSK	differential scanning calorimeter
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetra acetic acid
ESI	electrospray ionization
FA	Freund's adjuvant
FPLC	fast-performance liquid chromatography
SEC	size exclusion chromatography
HA	hydroxyapatite
HPLC	high-performance liquid chromatography
IEC	ion exchange chromatography
IEF	isoelectric focusing
IP	immunoprecipitations
ITC	isothermal titration calorimeter
3C network	three-component network
kD	kiloDalton
LUV	large unilamellar vesicle
MALDI	matrix-assisted laser-desorption ionization
MALDI-TOF	matrix-assisted laser-desorption ionization time of flight
MLV	multilamellar vesicle
MW	molecular weight
PAL	photoaffinity ligand
PBS	phosphate-buffered saline solution
PEG	polyethylene glycol
PEI	polyethylenimine
PIC	phenylisocyanate
PICT	phenylisothiocyanate
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	polyvinyliden difluoride
RT	room temperature
SDS	sodium dodecylsulfate
SUV	small unilamellar vesicle
TFA	trifluoroacetic acid
TFEITC	trifluoroethylisothiocyanate
WGA	wheat germ agglutinin