

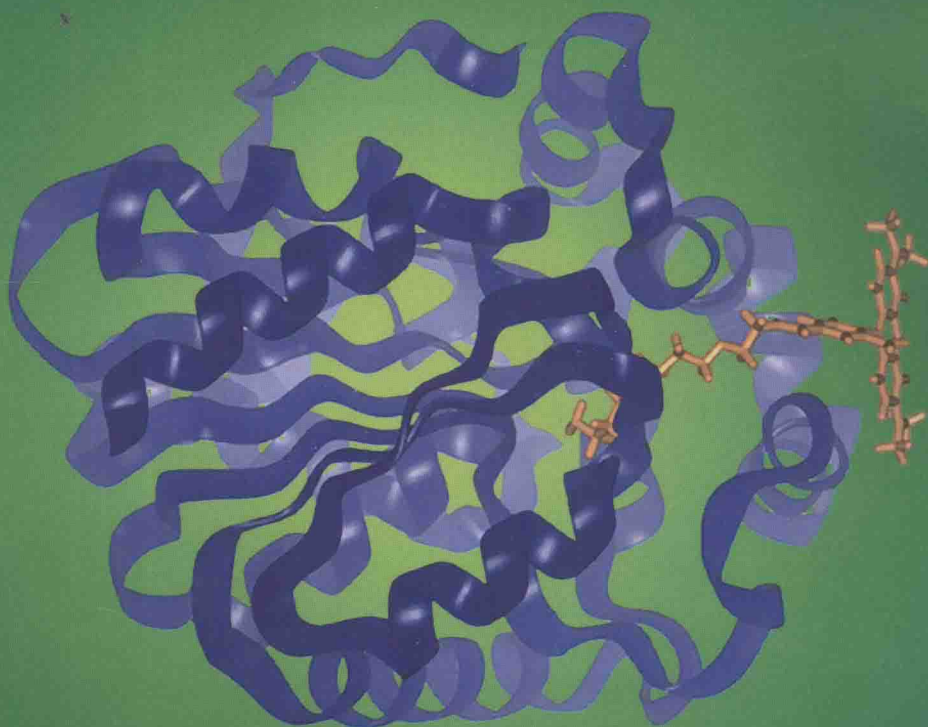


生命科学实验指南系列



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

生命科学实验指南系列·典藏版

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

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝石”和“红宝石”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

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

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016

ISBN 978-7-03-047486-5

I. ①生… II. ①雷… III. ①生命科学—实验—指南 IV. ①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦

责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

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>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2016 年 7 月第一次印刷 印张：1310 1/2

字数：31 074 000

定价：4500.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

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要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℃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皿皿。

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℃和-70℃温育和贮藏。

盖革氏计数器

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℃） 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 μ 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℃。

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℃。

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 CO₂ 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。

旋涡混合器

水浴 至少两台，可调温至 80℃。

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. Bonifacino
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	C. Nick Pace The Texas A&M University System Health Science Center College Station, Texas	Lise R. Riviere Pfizer, Inc. Groton, Connecticut
Anthony I. Magee National Institute for Medical Research London, United Kingdom	Roger H. Pain Jozef Stefan Institute Ljubljana, Slovenia	Stuart J. Rodda Chiron Technologies Pty. Ltd. Victoria, Australia
George I. Makhatadze Texas Tech University Lubbock, Texas	Ira Palmer National Institutes of Health Bethesda, Maryland	Michael A. Romanos Wellcome Research Laboratories Beckenham, United Kingdom
Mark C. Manning University of Colorado Health Science Center Denver, Colorado	Marina A.A. Parry Actelion Pharmaceuticals Allschwil, Switzerland	Keith Rose University Medical Center Geneva, Switzerland
Marc A. Marti-Renom The Rockefeller University New York, New York	Mark Payton Glaxo Institute for Molecular Biology Geneva, Switzerland	Andrej Sali The Rockefeller University New York, New York
Daumantas Matulis 3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc. Yardley, Pennsylvania	Manuel C. Peitsch Glaxo Wellcome Experimental Research Geneva, Switzerland	Guy S. Salvesen The Burnham Institute La Jolla, California
John McCoy Genetics Institute Cambridge, Massachusetts	Kevin J. Petty University of Texas Southwestern Medical Center Dallas, Texas	Gautam Sarath University of Nebraska Lincoln, Nebraska
William J. Metzler Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute Princeton, New Jersey	Allen T. Phillips Pennsylvania State University University Park, Pennsylvania	Ton N. M. Schumacher Massachusetts Institute of Technology Cambridge, Massachusetts
C. Russell Middaugh Merck Research Laboratories West Point, Pennsylvania	John S. Philo Alliance Protein Laboratories Thousand Oaks, California	Steven D. Schwartzbach University of Memphis Memphis, Tennessee
Sheenah M. Mische Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Ridgefield, Connecticut	Leland D. Powell University of California San Diego La Jolla, California	Torsten Schwede Glaxo Wellcome Experimental Research Geneva, Switzerland
Roger E. Moore Beckman Research Institute of the City of Hope Duarte, California	Y. Qiu University of California San Francisco, California	R. K. Scopes LaTrobe University Bundoora, Australia
Bernard Moss National Institute of Allergy & Infectious Diseases Bethesda, Maryland	Kathryn M. Radford Glaxo Institute for Molecular Biology Geneva, Switzerland	William H. Scouten Utah State University Logan, Utah
Jacek Mozdzanowski The Wistar Institute Philadelphia, Pennsylvania	Theodore W. Randolph University of Colorado Boulder, Colorado	Brian Seed Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School Boston, Massachusetts
Jiri Novotny Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute Princeton, New Jersey	David F. Reim The Wistar Institute Philadelphia, Pennsylvania	Bartholomew M. Sefton The Salk Institute La Jolla, California
	Pier Giorgio Righetti University of Milan Milan, Italy	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

第 1 章 蛋白质纯化和定性的策略	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
第 2 章 计算分析	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
第 3 章 检测和分析方法	41
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 ¹⁴ C 或 ³ 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 ¹⁴ C 或 ³ 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 ¹⁴ C 或 ³ 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 [³⁵ S] 甲硫氨酸对悬浮细胞进行脉冲标记	65
备择方案 1 用 [³⁵ S] 甲硫氨酸对贴壁细胞进行脉冲标记	66
备择方案 2 用 [³⁵ S] 甲硫氨酸对细胞进行脉冲追踪标记	67
备择方案 3 用 [³⁵ 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
第 4 章 提取、稳定和浓缩	69
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 ₄ 和 C ₅ 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
第 5 章 重组蛋白的生产	90
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