

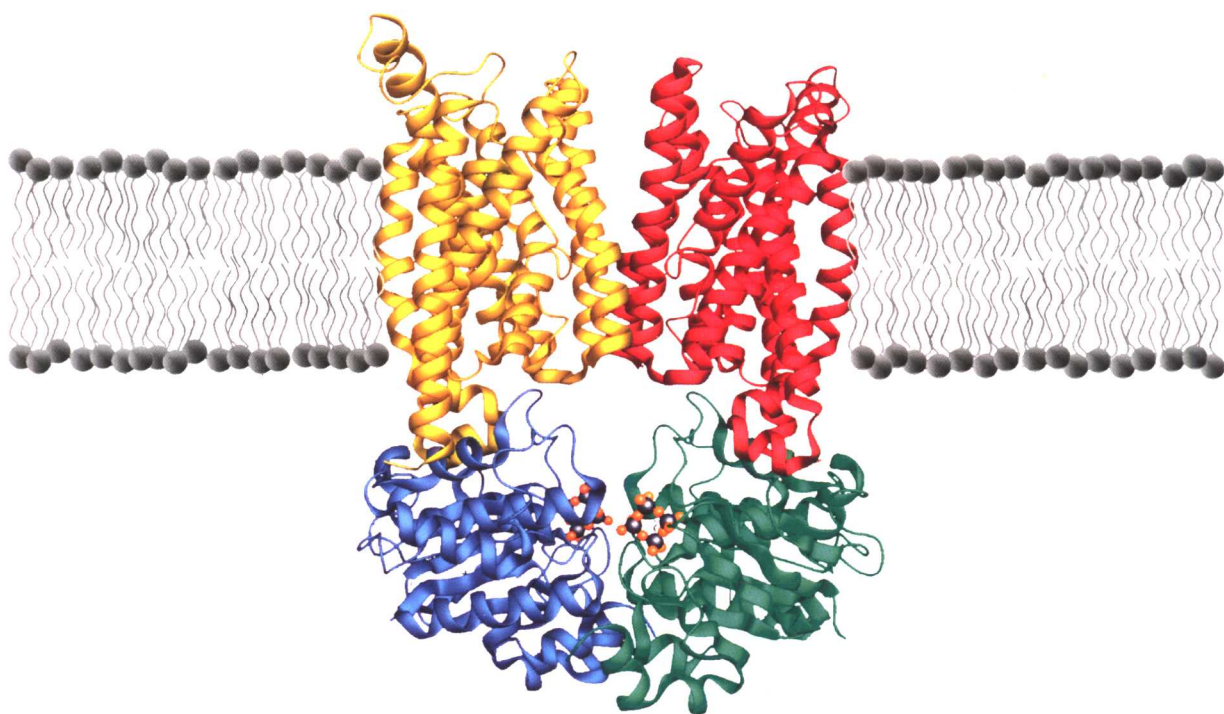
生物实验室系列

蛋白质与蛋白质组学实验指南

Proteins and Proteomics : A Laboratory Manual

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

何大澄 主译



Chemical Industry Press



化学工业出版社

生物实验室系列

蛋白质与蛋白质组学实验指南

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



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

蛋白质与蛋白质组学实验指南/[澳]辛普森(Simpson, R. J.)主编;
何大澄主译. —北京: 化学工业出版社, 2006. 6
(生物实验室系列)
书名原文: Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual
ISBN 7-5025-8923-6

I. 蛋… II. ①辛…②何… III. ①蛋白质-实验②蛋白质-基因组-
实验 IV. Q51-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 065010 号

Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual
ISBN 0-87969-554-4, by Richard J. Simpson
Copyright © 2003 by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New
York. All rights reserved.

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

本书中文简体字版由 Cold Spring Harbor Laboratory 出版公司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: 01-2003-4831

生物实验室系列

蛋白质与蛋白质组学实验指南

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

何大澄 主译

责任编辑: 郎红旗 周旭 傅四周

责任校对: 凌亚男

封面设计: 关 飞

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

化学工业出版社印刷厂印刷

三河市万龙印装有限公司装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 54¼ 字数 1231 千字

2006 年 10 月第 1 版 2006 年 10 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8923-6

定 价: 149.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

生物实验室系列图书

陆续出版的书目如下

- 发酵工程实验技术 (2004年3月)
- 生物化学实验技术 (2005年5月重印)
- 拟南芥实验手册 [影印] (2004年5月)
- 现代生物科学仪器分析入门 (2005年6月重印)
- 转基因动物技术手册 [译] (2004年9月)
- RNAi——基因沉默指南 [译] (2004年10月)
- PCR最新技术原理、方法及应用 (2006年10月重印)
- 生物安全柜应用指南 (2005年3月)
- 分子生物学实验参考手册 [译] (2005年6月)
- DNA分子标记技术在植物研究中的应用 (2005年6月)
- 流式细胞术原理与科研应用简明手册 [译] (2005年7月)
- 医学微生物学实验技术 (2006年1月)
- 小鼠胚胎操作实验手册 (第三版) [译] (2006年1月)
- 植物分子生物技术应用手册 (2006年2月)
- 分子生物学与蛋白质化学实验方法 [译] (2006年2月)
- PCR技术实验指南 (第二版) [译] (2006年3月)
- 植物细胞工程实验技术 (2006年4月)
- 生物安全实验室建设 (2006年4月)
- 人肿瘤细胞培养 [译] (2006年5月)
- 细胞生物学实验技术 (2006年6月)
- 组织工程方法 [译] (2006年6月)
- 免疫组织化学实验技术及应用 (2006年6月)
- 蛋白质与蛋白质组学实验指南 [译]
- 蛋白质纯化实验指南 [译]
- 基因表达分析手册 [译]
- 现代实验动物学技术

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 等人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，化工出版社组织出版了“生物实验室系列图书”。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，约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。

“生物实验室系列图书”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“生物实验室系列图书”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供宝贵意见和建议，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

现代生物技术与医药科技出版中心

译者的话

蛋白质组学的兴起真如洪波涌起，短短几年间它的影响与推动遍及了几乎所有的生命科学学科。蛋白质组学技术已经成为越来越多的实验室日常采用的支柱技术之一，还有更多的实验室正在迫切希望了解或开始尝试运用这一强有力的科学工具。对于这样一门对多数生物学工作者来说还较为生疏、技术含量极高的学科来说，一本好的技术手册无疑是提高实验室科研效率与质量的必备之物。另一方面，蛋白质组学技术本身也正处在一个快速生长期，几乎每个月都有新的技术出现。在这种情况下，提供一本好的技术指南的价值之大、难度之高都是不言而喻的。

一本好的实验技术指南之难得还在于它不应当只是一本操作程序的集结。它不是一个“交通查询台”，告诉你向东走二百米左拐即到达某地，而是一个胜任愉快的“导游”，告诉你这一片新景区内每个可选择的景点的历史渊源，它的发展与沿革，特色景致等，甚至会告诉你何处可能会有坑洼，何处正待修建。总之，它不但给了你多种选择，并告诉你如何选择。这本指南正是如此。从相关的基础知识与概念、实验设计，到仪器原理、技术的进展甚至起源，都有通俗而不失精辟的介绍；对每一技术的适用特长与局限性、不同样品的制备等，都有尽可能周到客观的建议和告诫；操作步骤清楚可循，要点突出，关键之处辅以体贴周到的解释或提醒。即使你还没有真正计划开展某一实验，相关的阅读体验也会对你的科研工作有所助益，并且是饶有兴味的。它还“一站式”地提供了经典参考文献、主要供应商和重要网站等，这些可能正是你“踏破铁鞋无觅处”的，现在却“得来全不费工夫”了。

一本好的实验指南，只能是出自既有纵览全局的学识又有亲历亲为的实践的专家——自己得于心、应于手，才能使人昭昭。冷泉港实验室（Cold Spring Harbor Laboratory）素有集技术大成之传统，本书的各位作者又都是各领域从理论到技术的领跑者，可以说每个实验的可行性、可靠性都经过了充分的实际验证。我们深信，本书将会像冷泉港实验室出版社出版的另一本从20世纪到今天仍在不断印刷和再版的技术手册“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”（《分子克隆实验指南》）一样，成为该领域最具权威性和经典性的实验手册之一。

我们历来并不认为，所有中国的科学工作者都必须学过多少年英文才能搞科研。特别是对一些比较基层的、联系实际的实验室和研究者来说，他们迫切希望能够比较容易地获得内容上反映国际先进水准而语言上明白流畅的中文版科学技术读物，尤其是集成读物。所以我们不揣孤陋，翻译此实验指南，以利国人。更期望我国研究者们在应用中探索和创新，为蛋白质组学实验技术领域做出我们自己的贡献。

正是基于本书对基础知识、操作流程、相关信息兼收并蓄的特点，虽然它并未追求覆盖所有相关技术，它仍然会适用于广泛的读者范围；虽然蛋白质组学实验技术日新月异，它仍然会在相当长时间内具有可贵的实用价值。当然我们仍然期待着第二版

的早日问世。

还要说明的是近年才兴起的蛋白质组学对于译者也同样是一个新的领域，本书的翻译对于我们整个团队都是挑战。囿于知识和时间等条件所限，错漏之处在所难免。何况有些专业术语（简单如“pull down”技术）尚无统一或约定俗成的译法；有的虽推之敲之者三，仍没有中意的汉语来表达。译文不当之处，敬请专家和广大读者指正。

众多老师和同学参与了本书的翻译工作，按照章节的先后顺序分别是：第1章，田甜、刘佳凝、何大澄；第2章，熊一、郭福政、赵和平；第3章，胡琨、刘进、赵和平；第4章，雷瑛、刘丹慧、黄凌云；第5章，李思尘、邱淑兰、黄凌云；第6章，王利敏、贺芳、黄凌云；第7章，年慧、李艳、郭福政、肖雪媛；第8章，陈剑、张丽娟、刘丹慧、赵和平；第9章，樊粉霞、夏梁、肖雪媛；第10章，劳芳、耿峰、刘进、肖雪媛；第11章，雒应琴、董东、周红军、孙清岚、朱蕾、李振博、林雯、吴晓梅、付聪、林魁；附录，夏永静、王毅琳、韩玉淳、彭潇。

感谢化学工业出版社的编辑把这本有经典意义的技术手册推荐给我们组织翻译，他们在翻译过程中对我们的支持与敦促，以及在编辑校对等方面所做的大量努力和细致工作，使译本最终得以完成；感谢本组的曾长青、欧阳津、王佳宁、张钊、郝娟婷、林琳、张颖、戴嵩玮、马香、赵倩、熊歆、王珍珍、李会彩等老师及多位同学在繁忙的工作与学习之余抽出时间来投入此项工作；特别感谢林魁教授协助翻译本书的生物信息学部分，中国科学院化学研究所的王毅琳研究员、韩玉淳博士协助翻译了附录中有关热化学分析的内容。同时赵和平老师和陈剑老师还在译稿的整理、校对方面做了大量工作，在此一并致谢。

何大澄

2006年5月18日于北京师范大学

序

当试图投身于一个新的研究领域时，学生和实验研究人员将面临同样的挑战。他们都需要学习新的术语、概念和理论，界定该领域当前的研究课题，并掌握一系列的新方法、新技术。找到合适的学习资源也许与掌握课题本身一样困难，而对于快速发展的新领域尤其如此，例如蛋白质组学。通常，教科书、术语汇编和参考手册——如果确实有的话——往往是比较零散的，适用的信息需要从原始文献浩如烟海的文章中搜集。

在这本内容广泛的书中，Richard J. Simpson 和蛋白质组学领域的顶尖专家们一道尝试了这种可能：浓缩理论、背景信息、方案和信息来源于一体。他们成功了！这本指南实际上包含了人们希望从教科书和实验室手册中寻求的所有内容：综述 (overviews)、介绍性材料 (introductory materials) 和蛋白质组学的基础理论。书中不仅提供了蛋白质组学常用实验的详尽方案、实验材料及其来源的详细列表，而且全面提供了关键试剂来源的网络链接。

《蛋白质与蛋白质组学实验指南》无论对于勇于开拓蛋白质组学新领域的有经验的蛋白质化学家，还是进入蛋白质和蛋白质组学研究的新人，都是极有价值的信息工具。尽管快速发展是当代蛋白质组学研究的特征，但通过聚焦于当前所公认的蛋白质组学技术的实质，Simpson 教授确保了本书在未来数年内将保持其适用性和新颖性。

Ruedi Aebersold

Professor, Institute for Systems Biology

前 言

目前，公众的注意力都集中于人类基因序列的第一张草图上，而生物学家的注意力已经迅速地转向基因是如何工作的，即其所编码的蛋白质的所有功能。这不仅要了解蛋白质的结构特性，还需要了解蛋白质在细胞内的时空变化特性，包括蛋白质之间复杂的相互作用。分析蛋白质化学，或是现在通常所称的蛋白质组学，是完成此项艰巨任务的主角。由于各种基因组计划所带来的信息激增，冷泉港实验室出版社（Cold Spring Harbor Laboratory Press）认为十分有必要给科研人员提供蛋白质组学研究的可靠实验方法。不久前，在我的同事——获得极大成功的实验指南“Molecular Cloning”（《分子克隆》）的作者 Joe Sambrook 的力促下，我应邀着手撰写关于蛋白质组学研究的实验分析方法和操作方案。由此，就孕育了《蛋白质与蛋白质组学实验指南》（“Protein and Proteomics: A Laboratory Manual”）一书。

《蛋白质与蛋白质组学实验指南》以从事蛋白质和多肽分离以及进行蛋白质组分析的研究人员为对象，读者范围涵盖从研究生到资深科研人员。但《蛋白质与蛋白质组学实验指南》并不是覆盖所有蛋白质组学研究方法的百科全书，而只包含了我和许多有声望的同行所在的实验室目前使用的蛋白质组学方法和技术。在每一章中，我尽可能地为相应方案提供足够的背景知识。尤其是对于蛋白质化学家不那么熟悉的领域，例如糖生物学和信息学，我则寻求这些实验领域的相关专家的帮助。在此，我特别感谢 Antony Bacic 和 Parag Mallick 及其同事对糖生物学和信息学内容给予的非常有价值的贡献。

如果没有外界的帮助和支持，本书是无法完成的。我首先要感谢我在 Melbourne 的 Parkville 地区的朋友和同事们。对于我不时提出的材料和技术综述方面的各种烦琐要求，他们都热情地予以响应。我非常感激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作出的无私贡献和不懈努力，使我（基本上）按计划完成了工作。还要感谢 Judy Cuddihy，其亲切、乐观的鼓励给了我信心；Kaaren Janssen 和 Maryliz Dickerson 对本书最初的构思给予了指导；Tamara Howard 对论据进行了细心的审核；Inez Sialiano 则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；特别是 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。此外，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。

最后，我要特别感谢 Mary Whitham 和 Pamela Jones 在文字方面所付出的努力。我也必须感谢 Simone Pakin，得益于她收集信息的高超技能和无私奉献以及在逆境中的豁达，我们才能够坚持下来。我也要对蛋白质组联合实验室（Joint ProteomicS

Laboratory, JPSL) 的工作人员，特别是 Robert Moritz, Hong Ji, David Frecklington, Lisa Connolly, James Eddes, Eugene Kapp 和 Gavin Reid, 表达我的谢意，他们所给予我的帮助是多方面的。我还要感谢 Ludwig Institute for Cancer Research 充满智慧和团结的氛围，特别是 Tony Burgess 所长的支持——没有他的始终如一的热情鼓励，本书是无法完成的。

在长长的致谢名单中，我必须加上我的合作者 Donna Dorow, 他以持续的耐心包容了我在写作过程中在任何时间（包括无数个周末和深夜）不断提出的没完没了的要求，接纳了我的关注范围和脾气。

理查德 J. 辛普森
(Richard J. Simpson)

致 谢

作者谨向下列同行致以谢意，感谢他们颇有价值的帮助：

Ruedi Aebersold	Steven P. Gygi	David Oxley
Alastair Aitken	Rebecca Harcourt	Sang-Hyun Park
Ron D. Appel	Lara G. Hays	Scott Patterson
Manuel Baca	Milton T. W. Hearn	Junmin Peng
Antony Bacic	Thomas P. Hennessy	Ronald T. Raines
Tomas Bergman	Ben R. Herbert	Melinda L. Ramsby
Tom Berkelman	Cameron J. Hill	Juri Rappsilber
Willy Bienvenut	Denis F. Hochstrasser	Gavin E. Reid
Reinhard I. Boysen	Wendy L. Holstein	Andrey Revyakin
Edward J. Bures	Femia G. Hopwood	Pier G. Righetti
Annalisa Castagna	Geoff Howlett	Gerard Rummery
Ella Cederlund	Marion I. Huber	Michael T. Ryan
Andrea Cinnamon	Toshiaki Isobe	Jean-Charles Sanchez
Lisa Connolly	Ole N. Jensen	David M. Schieltz
Patrick W. Cooley	Hong Ji	Albert Sickmann
Garry L. Corthals	Hans Jörnvall	Pamela A. Silver
Graeme Currie	Eugene A. Kapp	Andrew J. Sloane
Jenny M. Cutalo	Hooi Hong Keah	Paul E. Smith
Marc Damelin	Rosalind Kim	Christopher S. Spahr
Catherine Déon	Nancy Laird	Hanno Steen
Leesa J. Deterding	Martin R. Larsen	Allan Stensballe
Sam Donohoe	Matthew Laver	Wayne R. Stochaj
Janice L. Duff	Larry J. Licklider	Nobuhiro Takahashi
Matthew Durack	Gavin MacBeath	Masato Taoka
Richard H. Ebright	Gregory S. Makowski	Kenneth B. Tomer
James S. Eddes	Parag Mallick	Klaus K. Unger
David A. Fancy	Matthias Mann	Adrian Velazquez-Campoy
David Frecklington	Edward M. Marcotte	Anne Verhagen
Ernesto Freire	John McCarthy	David B. Wallace
Parag S. Ghandi	Scott A. McLuckey	Michael P. Washburn
Robert Goode	Helmut E. Meyer	Valerie C. Wasinger
David R. Goodlett	Robert L. Moritz	Keith L. Williams
Andrew A. Gooley	Philippe Mottay	Yoshio Yamauchi
Robin Gras	Markus Müller	Eugene C. Yi
Timothy J. Griffin	Nikolai Naryshkin	Jian-Guo Zhang
Jasmine Grinyer	Richard A. J. O'Hair	Lynn R. Zieske
Melanie P. Gygi	Yoshiya Oda	

《蛋白质与蛋白质组学实验指南》关联网站

《蛋白质与蛋白质组学实验指南》关联网站 (www.proteinsandproteomics.org) 旨在为这一迅速发展的研究领域随时提供补充信息, 包括:

- 与 Medline 相链接的参考文献;
- 与从事本领域工作的其他科学家数据库的链接;
- 从本书中选出的一些图片, 用于疑难解答;
- 为 HPLC 和 2D 电泳过程中可能遇到的困难提供帮助信息;
- 关于蛋白质来源的糖类分析的一章内容 (Oxley 等, 见下列摘要)

糖蛋白的糖类分析

David Oxley¹, Graeme Currie², and Antony Bacic²

¹ The Babraham Institute, Babraham, Cambridge CB2 4AT, United Kingdom;

² Plant Cell Biology Research Centre, School of Botany; University of Melbourne, Victoria 3010, Australia

摘 要

由于糖类 (carbohydrate, 旧称碳水化合物——译者注) 结构的复杂性和多变性, 对与蛋白质相关的聚糖 (glycan) 的分析和鉴定是一项令人生畏的挑战。本章试图在蛋白质的糖类检测和分析方面为“非专家”研究者提供指导。“最好的”研究方法主要取决于材料的特性和想要获得什么信息。许多技术适用于大多数生物化学/分子生物学实验室, 也有一些技术只适用于一些拥有高度复杂仪器的专业实验室。本部分的内容意在最低限度地回答最常见的问题: 蛋白质是否被糖基化? 对于许多研究者来说, 获得这一层次的信息就已经足够了。而对于那些专业研究者提出的更具逻辑性的问题——“这些糖类具有什么样的结构?”——本部分将提供充足的背景知识, 使其能够更有信心地开展工作的。

除了对糖类的研究历史作了简短的介绍并列出了其术语外, 本章还对糖蛋白-衍生多糖的分析所涉及的基本步骤加以解释。本部分的每一节都有对方法的简要说明, 包括每一节的目的、每一种方法的局限, 以及针对实际问题的优秀参考文献。其中包括四个广泛应用的实验方案, 这些方案详细地描述了如何从糖蛋白上去除多糖 (glycan), 以及用于气相色谱-质谱联用分析的单糖的制备方法。

• 应用多腔室流动电泳在双向凝胶电泳之前对样品进行等电分离 (Herber 等; 见下列摘要)。

高分辨率双向电泳样品的制备: 利用多腔室流动电泳进行等电分离

Ben R. Herbert¹, Pier Giorgio Righetti², John McCarthy¹, Jasmine Grinyer¹, Annalisa Castagna², Matthew Laver¹, Matthew Durack¹, Gerard Rummery¹, Rebecca

Harcourt¹, and Keith L. Williams¹

¹ Proteome Systems, North Ryde, Sydney, NSW, 1670, Australia;

² University of Verona, Department of Agricultural and Industrial Biotechnologies, Strada La Grazie No. 15, 37134 Verona, Italy

摘要

在利用宽 pH 梯度双向凝胶电泳进行蛋白质分离时,经常会碰到的困难是疏水性蛋白、极端 pH 蛋白的分辨率较低,以及难以检测到低丰度蛋白。通过使用窄 pH (1~3 pH 单位)或极窄 pH (<1pH 单位)的固相化 pH 梯度 (immobilized pH gradient, IPG),能够提高蛋白质的分辨率和双向 (2D) 凝胶的检测灵敏度。但是,使用窄 pH 梯度分离全细胞裂解液时,大部分蛋白样品并不在 pH 梯度的分离范围内聚焦。这些“额外”的蛋白质将严重干扰样品分离,因为其 pI 在 IPG 的 pH 范围之外。这种现象会随着上样量的增加而愈加严重。虽然可以通过减少上样量来降低这种影响,但不幸的是这对于蛋白质组学研究来说有着非常大的限制。

解决这一困难的方法之一是应用多腔室流动电泳仪 (multicompartment electrolyzer, MCE),该仪器可在 2D 电泳分析之前对蛋白质样品进行等电分离 (isoelectric fraction)。用这种方法分离的组分的 pH 范围可与后续二维电泳第一向所采用的 pH 区间一致。如此分离的蛋白质混合物不含等电点在 IPG 的 pH 范围之外的蛋白组分,可以用较大的上样量进行 2D 胶分析,从而增加了灵敏度和低丰度蛋白的检测能力。利用 MCE 进行的等电分离与接下来的 2D 电泳完全兼容,因为其依赖于聚焦技术所获得的高度浓缩样品不含盐分和缓冲物质。目前, MCE 仪器已经实现商业化生产,缓冲处理的兼性膜也能与通常所用的 IPG 的 pH 终点相匹配。

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. 打开网站的主页。
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 (在注册过程中选择) 作为浏览网站的登录信息。

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,或者需要告之我们关于网址的变更,以及关于 proteinsand-proteomics.org 网站的任何查询,请给 support@proteinsandproteomics.org 发送电子邮件,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 516-422-4100 (其他地区的读者) 询问。

目 录

第 1 章 蛋白质组学导论	1
1.1 蛋白质组学定义	3
1.2 为何除基因组学外还要有蛋白质组学?	5
1.3 蛋白质的鉴定和分析	10
1.4 差异显示蛋白质组学 (比较蛋白质组学)	17
1.5 翻译后修饰	19
1.6 蛋白质微阵列	23
1.7 捕获分子和靶分子	24
参考文献	26
网络资源	33
第 2 章 单向聚丙烯酰胺凝胶电泳	35
2.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳的基本原理	38
2.2 SDS 用于变性的聚丙烯酰胺凝胶	42
2.3 乙酸-尿素 PAGE 根据蛋白质的大小和电荷分离蛋白质	45
2.4 三羟甲基甘氨酸 SDS-PAGE 分离小分子多肽	45
2.5 非变性 PAGE (自然凝胶电泳) 分离天然蛋白和蛋白复合体	45
实验方案	
方案 1 蛋白质的 SDS-PAGE	47
替代方案: 用 Bio-Rad 385 Gradient Former 灌制线性梯度凝胶	52
方案 2~7 的导言: 蛋白质显色步骤	56
方案 2 传统的考马斯亮蓝染色	58
方案 3 快速考马斯亮蓝染色	60
方案 4 InstaStain Blue 凝胶纸染色	62
方案 5 SYPRO Ruby 荧光染色	64
方案 6 SYPRO Orange 荧光染色	66
方案 7 与质谱兼容的银染	68
方案 8 表观分子量的判定	70
方案 9 CTAB-PAGE	72
方案 10 酸-尿素连续 PAGE	74
方案 11 肽类的电泳 (Tricine-SDS-PAGE)	76
方案 12 蛋白质的非变性 PAGE	78
参考文献	80
网络资源	82

第 3 章 细胞和亚细胞提取物的制备	83
3.1 通过机械或化学方法破碎组织及细胞	85
3.2 通过变性和复性从包含体中回收重组蛋白	88
3.3 富含目的蛋白的亚细胞提取物的制备	90
实验方案	
方案 1 哺乳动物组织的匀浆	93
附加方案：从组织匀浆液中去黏蛋白	97
方案 2 用于免疫沉淀的培养细胞的裂解	98
方案 3 用于免疫印迹的动物培养细胞、酵母和细菌的裂解	100
方案 4 氮舱减压法裂解培养细胞	102
方案 5 细菌中重组蛋白的小量提取	106
方案 6 细菌中重组蛋白的大量提取	108
方案 7 从包含体中溶解大肠杆菌重组蛋白	110
方案 8 酵母提取物的制备	112
方案 9 真核细胞结构组分的差异去垢剂分离法	114
附加方案：去垢剂提取物中 RNA 的分离	123
附加方案：用镁沉淀微管蛋白和微管结合蛋白	124
参考文献	126
选读文献	130
网络资源	130
第 4 章 固相化 pH 梯度双向凝胶电泳	131
4.1 双向凝胶电泳样品的制备	134
4.2 第一向：固相 pH 梯度等电聚焦电泳	138
4.3 第二向：根据分子量分离蛋白质	139
4.4 双向凝胶的染色	141
4.5 双向凝胶中蛋白质的转移	144
4.6 双向凝胶图像的获取和分析	145
实验方案	
方案 1 双向凝胶电泳鼠肝蛋白质提取物的制备	149
方案 2 双向凝胶电泳真核生物细胞裂解物的制备	151
附加方案：用放射性同位素标记真核生物细胞蛋白质	152
方案 3 双向凝胶电泳大肠杆菌裂解液的制备	154
方案 4 双向凝胶电泳脑脊液蛋白样品的制备	156
方案 5 第一向：蛋白质的等电聚焦电泳	158
方案 6 垂直 SDS 平板凝胶的制备：均一凝胶的灌制	162
方案 7 垂直 SDS 平板凝胶制备：同时灌制多梯度凝胶	165
方案 8 IPG 胶条的平衡	169
方案 9 第二向：蛋白质的 SDS-PAGE	171
方案 10 胶体考马斯亮蓝染色	174
方案 11 银氨染色	176

方案 12 与质谱兼容的银染法	180
方案 13 用 SYPRO Ruby 进行荧光染色	183
方案 14 用 GelCode 磷蛋白染色试剂盒对磷蛋白进行染色	185
方案 15 双向凝胶的槽式转移	187
方案 16 双向凝胶的半干印迹	190
方案 17~20 的导言: 膜上蛋白质的染色	192
方案 17 用丽春红 S 染色膜上的蛋白质	193
方案 18 用考马斯亮蓝 R250 染色膜上的蛋白质	194
方案 19 用印度墨水染色膜上的蛋白质	195
方案 20 用胶体金染色膜上的蛋白质	196
网络上有关双向电泳的信息资源	197
参考文献	200
第 5 章 反相高效液相色谱	203
5.1 RP-HPLC 基于疏水相互作用分离分子	204
5.2 RP-HPLC 标准色谱条件	205
5.3 微柱反相色谱——适合蛋白质组学的研究方法	213
实验方案	
方案 1 蛋白质 RP-HPLC 的标准色谱条件	219
方案 2 填充 RP-HPLC 毛细管微柱	224
方案 3 不易分离的大分子量多肽的纯化	231
方案 4 用 RP-HPLC 对固相合成的多肽进行纯化	238
方案 5 用 RP-HPLC 技术对多肽和蛋白质混合物进行脱盐	244
方案 6 计算机辅助方法优化梯度条件的 RP-HPLC 蛋白质分离	248
参考文献	258
选读文献	263
网络资源	263
第 6 章 蛋白质氨基端及羧基端序列分析	265
6.1 Edman 降解法对多肽进行氨基端测序	267
6.2 限制序列分析速度的几个环节	275
6.3 应用 HPLC 和 PAGE 制备微量测序样品	279
6.4 不能进行测序的蛋白质需去封闭	282
6.5 磷酸化位点的微量测序分析有助于绘制信号途径	283
6.6 固相测序仪是回收磷酸化氨基酸的最好方法	283
6.7 其他氨基端反应法	284
6.8 羧基端测序方法存在的问题	284
6.9 自动化羧基端测序	285
6.10 高灵敏度高效率的羧基端分析	285
6.11 氨基端和羧基端序列组合分析	289
实验方案	
方案 1 两相柱测序仪的样品上样	291
方案 2 将蛋白质从凝胶电转移至 PVDF 膜	293