

Bacterial Protein Secretion Systems Methods and Protocols

细菌蛋白分泌系统 研究方法与操作规程

[法] Laure Journet Eric Cascales 编著

郑福英 宫晓炜 陈启伟 刘永生 译

中国农业科学技术出版社

Bacterial Protein Secretion Systems Methods and Protocols

细菌蛋白分泌系统 研究方法与操作规程

[法] Laure Journet Eric Cascales 编著

郑福英 宫晓炜 陈启伟 刘永生 译

图书在版编目 (CIP) 数据

细菌蛋白分泌系统研究方法与操作规程 / (法) 劳雷·詹来特 (Laure Journet), (法) 埃里克·卡斯卡莱斯 (Eric Cascales) 编著; 郑福英等译. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2019. 10

书名原文: Bacterial Protein Secretion Systems: Methods and Protocols
ISBN 978-7-5116-4446-6

I. ①细… II. ①劳…②埃…③郑… III. ①细菌学 IV. ①Q939. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2019) 第 223777 号

First published in English under the title

Bacterial Protein Secretion Systems: Methods and Protocols

edited by Laure Journet and Eric Cascales

Copyright © Springer Science+Business Media LLC, 2017

This edition has been translated and published under licence from
Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature.

责任编辑 褚怡 崔改泵

责任校对 李向荣

出版者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电话 (010) 82109194 (编辑室) (010) 82109702 (发行部)

(010) 82109709 (读者服务部)

传真 (010) 82106650

网址 <http://www.castp.cn>

经销者 各地新华书店

印刷者 北京建宏印刷有限公司

开本 787mm×1 092mm 1/16

印张 29.5 彩页 52 面

字数 696 千字

版次 2019 年 10 月第 1 版 2019 年 10 月第 1 次印刷

定价 150.00 元

◀ 版权所有·翻印必究 ▶

中国农业科学院兰州兽医研究所 (LVRI)
家畜疫病病原生物学国家重点实验室 (SKL)
中国农业科学院科技创新工程
国家自然科学基金面上项目 (编号: 31572532)
国家自然科学基金青年项目 (编号: 31602051、31602087)
甘肃省科技计划资助项目 (编号: 17YF1WA170、1606RJYA281)
农业部中央级公益性科研院所基本科研业务费 (1610312016023、
1610312018005、1610312020001、1610312020021)
中国-匈牙利科技合作委员会第7届例会项目 (7-7)

资助出版

《细菌蛋白分泌系统研究方法与操作规程》

翻译人员

译者：郑福英 宫晓炜 陈启伟 刘永生

审校：郑福英 宫晓炜 陈启伟 刘永生

主译单位：中国农业科学院兰州兽医研究所

前 言

在自然界中，细菌与其他原核生物和真核生物细胞接触，从而细菌进化出与这些细胞交流和协作的机制。它们还发展了“好战”行为，以消除竞争对手和感染真核宿主细胞。这些攻击性行为是由具有特定活性的效应毒素介导的，其最终将导致靶细胞溶解或宿主代谢与运输途径改变。

细菌效应器正确地进入环境或直接进入靶细胞是由称为分泌系统的专门结构来保证的。到目前为止，细菌中已经有 9 种分泌系统被描述，而附加系统允许毒素或黏附素在细胞表面或皮毛结构末端暴露。这些多蛋白跨膜复合物在组成、组装机制和毒素的补充及转运方式上存在差异。然而，研究这些大分子复合物需要一些常用的技术，从结构部件和效应器的生物信息学鉴定到定义不同亚单位间相互作用的方法，以及研究报告者跟踪效应器在体内的易位。最后，最先进的技术在直接分析细菌细胞中或从纯化样品中分析这些大复合物方面取得了重大进展。

这本关于细菌分泌系统的著作涵盖全面研究分泌系统所用的大量技术协议：识别和定位不同的亚单位，定义亚单位内的相互作用，监测构象变化，对大型复合物进行纯化和成像，通过荧光显微镜确定组装路径和组装或分泌过程中的能量作用，识别分泌效应器，并使用报告器跟踪效应器的运输。这些技术大多不局限于分泌系统的研究，而且对细菌细胞包膜的多蛋白复合物感兴趣的研究人员对此也有特殊的兴趣。

这本书开头的一章描述了一个最近开发的软件程序，旨在识别编码细菌基因组内分泌系统的基因簇。然后，接下来 6 章描述了定义多蛋白系统不同亚单位亚细胞定位的方法：预测程序、分馏、细胞表面暴露和等密度梯度来划分内外膜。然后详细介绍了确定膜蛋白拓扑结构的三种技术（替代半胱氨酸可及性、蛋白酶可及性和报告融合技术）。接下来的 11 章，涵盖了用于研究蛋白质-蛋白质和蛋白质-肽聚糖相互作用的遗传学、细胞学和生物化学方法。用 2 章介绍了揭示能量和构象变化作用的方法，接下来的 6 章介绍了大复合物的提纯和成像技术。最后，介绍了识别效应器的方法以及用于验证效应器分泌和易位情况的报告融合技术。

法国马赛 劳尔·朱奈
法国马赛 埃里克·卡斯卡尔斯

(刘永生 译)

编者

Sophie S. Abby (苏菲·艾比): 法国巴黎巴斯德研究所微生物进化基因组学; 国家科学研究中心 (CNRS), UMR3525, 法国, 巴黎; 格勒诺布尔阿尔卑斯大学技术实验室医学工程和计算机科学、数学和应用技术方向, 格勒诺布尔 (TIMC-IMAG), F-38000 格勒诺布尔, 法国

Juliana Alcoforado Diniz (朱莉安娜·阿尔科福拉多·迪尼兹): 英国邓迪大学生命科学学院分子微生物学系

Julie Allombert (朱莉·阿隆伯特): CIRI, 国际传染病研究中心, 国家卫生研究院 (INSERM), U1111, 伯纳德里昂大学 1 号, 国家科学研究中心 (CNRS), UMR5308, 里昂大学, 维勒班纳, 法国

Krishnamohan Atmakuri (克里希纳莫汉·阿特马库里): 印度法里达巴德 NCR 生物科技集群转化健康科学与技术研究所

InaAttrée: 法国格勒诺布尔 CEA 格勒诺布尔生物科学研究所, 格勒诺布尔阿尔卑斯大学, 国家科学研究中心, 细菌发病机制和细胞反应方向

Sarah Bigot (莎拉·比戈特): 分子微生物学和结构生物化学, 国家科学研究中心 (CNRS) UMR 5086, 里昂大学 1 号, 法国里昂蛋白质生物学和化学研究所

Mikhail Bogdanov (米哈伊尔·博格丹诺夫): 美国得克萨斯州休斯顿麦戈文医学院休斯顿得克萨斯大学健康科学中心生物化学和分子生物学系

Emmanuelle Bouveret (埃马努埃勒·布韦雷特): 法国马赛大学微生物多样性研究所, UMR7255

Nienke Buddelmeijer (尼恩克·布德尔梅耶尔): 法国巴黎, 英塞姆集团巴斯德研究所, 细菌细胞壁单位的生物学和遗传学

Maria Guillermina Casabona (玛丽亚·吉列尔米娜·卡萨博纳): 法国格勒诺布尔 CEA 格勒诺布尔生物科学研究所, 格勒诺布尔阿尔卑斯大学, 国立研究中心细菌发病机制和细胞反应方向; 生命科学学院分子微生物学部 CES, 英国苏格兰邓迪大学

Eric Cascales (埃里克·卡斯卡莱斯): 法国马赛, 艾克马赛大学-国家科学研究中心 (CNRS), 地中海微生物研究所 (IMM) 欧洲宏观学系

Suma Chakravarthy (苏马·查克拉瓦蒂): 美国纽约州伊萨卡康奈尔大学综合植物科学学院植物病理学和植物微生物学学科

Xavier Charpentier (泽维尔·查彭蒂埃): CIRI, 国家卫生研究院, 国际传染病研究中心, U1111, 里昂伯纳德大学 1 号, 国家科学研究中心 (CNRS), UMR5308, 法国维勒班纳里昂大学

Nuno Charro (努诺·查罗): UCIBIO-REQUMTE, 葡萄牙卡帕里卡, 里斯博亚大学 (FCT Nova) 技术学院

Tiago R. D. Costa (蒂亚戈·科斯塔): 英国伦敦伯克贝克学院生物科学学院结构与分子生物学研究所

Sarah J. Coulthurst (莎拉·库尔特赫斯特): 英国邓迪大学生命科学学院分子微生物学系

Marilyne Davi (玛丽莲·达维): 法国巴黎, 巴斯德研究所, 大分子相互作用生物化学系, 结构生

细菌蛋白分泌系统研究方法与操作规程

物理学和化学系, CNRS, UMR 3528,

Andreas Diepold (安德烈亚斯·迪波德): 英国牛津大学生物化学系; 德国马尔堡卡尔文-弗里希-斯特尔马克斯-普朗克陆地微生物学研究所生态生理学系

Tobias Dietsche (托比亚斯·迪切): 德国蒂宾根大学微生物学与感染医学研究所 (IMIT) 细胞与分子微生物学科

Badreddine Douzi (巴德雷丁·杜齐): 法国马赛, 艾克斯-马赛大学——国家科学研究中心, 地中海微生物研究所 (IMM), 大分子系统工程实验室 (LISM, UMR 7255)

Denis Duché (丹尼斯·杜奇): 法国马赛, 艾克斯-马赛大学国家科学研究中心, 地中海微生物研究所 (IMM), 大分子系统工程实验室 (LISM, UMR 7255)

Rhys A. Dunstan (里斯·邓斯坦): 澳大利亚维多利亚州墨尔本莫纳什大学生物医学发现研究所微生物学和感染与免疫项目部

Eric Durand (埃里克·杜兰): 法国马赛, 艾克斯-马赛大学国家科学研究中心, 地中海微生物研究所 (IMM), 大分子系统工程实验室 (LISM, UMR7255)

Marc Erhardt (马克·埃尔哈特): 德国布伦瑞克赫尔姆霍兹感染研究中心

Mario F. Feldman (马里奥·费尔德曼): 美国密苏里州圣路易斯华盛顿大学医学院分子微生物学系

Nicolas Flaugnatti (尼古拉斯·弗拉尼亚蒂): 法国马赛, 艾克斯-马赛大学国家科学研究中心, 地中海微生物研究所 (IMM), 大分子系统工程实验室 (LISM, UMR7255)

Katrina T. Forest (卡特丽娜·T·福雷斯特): 美国威斯康星大学麦迪逊分校细菌学和生物物理系

Irina S. Franco (伊琳娜·佛朗哥): UCIBIO—REQUIMTE, 法国葡萄牙卡帕里卡, 里斯博亚大学 (FCT Nova) 理工学院

Emilie Gaudiard (埃米莉·高利亚德): 法国索邦巴黎城, 巴黎迪德罗大学, 巴斯德研究所, CNRS, UMR 3528, 大分子相互作用生物化学单元, 结构生物学和化学系

Alba Katiria Gonzalez Rivera (阿尔巴·卡蒂里亚; 冈萨雷斯·里维拉) · 美国威斯康辛大学麦迪逊分校细菌学和生物物理系

Didier Grunwald (迪迪埃·格伦瓦尔德): 法国格勒诺布尔大学格勒诺布尔阿尔卑斯分校国家科学研究中心细菌发病机制和细胞反应方向

Birgit Habenstein (比尔吉特·哈本斯坦): 膜与纳米物体化学与生物学研究所 (UMR5248 CBMN), 法国佩萨克波尔多大学化学与生物学研究所

Iain D. Hay (艾因·海伊): 澳大利亚维多利亚州墨尔本莫纳什大学生物医学发现研究所微生物学和感染与免疫项目部

Birte Hollmann (伯特霍尔曼): 英国邓迪大学生命科学学院分子微生物学系

Laetitia Houot (莱蒂蒂娅·豪特): 法国马赛, 艾克斯-马赛大学国家科学研究中心 (CNRS), 地中海微生物研究所 (IMM), 大分子系统工程实验室 (LISM, UMR 7255)

S. Peter Howard (彼得·霍华德): 加拿大南卡罗来纳州萨斯喀通, 萨斯喀彻温大学医学院微生物学与免疫学系

Bethany Huot (贝塔尼·霍特): 美国密歇根州, 东兰辛市, 密歇根州立大学植物研究实验室

Raffaele Ieva (拉斐尔伊瓦): 法国图卢兹大学科学研究中心, 国际生物中心 (CBI), 分子微生物学和遗传学实验室

Athanasios Ignatiou (阿萨纳西奥斯·伊格纳蒂乌): 英国伦敦伯克贝克学院生物科学学院结构与分子生物学研究所

Laure Journet (劳雷·詹莱特): 法国马赛, 艾克斯-马赛大学-CNRS, 地中海微生物研究所, 大



分子系统工程实验室 (LISM, UMR7255)

Gouzel Karimova (古泽尔·卡里莫娃): 法国巴黎, 巴斯德研究所, CNRS, UMR 3528, 结构生物学和化学系, 大分子相互作用生物化学单元

Anna Konovalova (安娜·科诺瓦洛娃): 美国新泽西州普林斯顿大学分子生物学系, Lewis Thomas 实验室

Brian H. Kvitko (布莱恩·克维特科): 美国佐治亚州雅典大学植物病理学系

Daniel Ladant (丹尼尔·拉丹特): 法国巴黎, 巴斯德研究所, CNRS, UMR 3528, 大分子相互作用生物化学单元, 结构生物学和化学系

Erh-Min Lai (赖敏敏): 台湾台北中国科学院植物与微生物生物学研究所

Ray A. Larsen (雷·拉森): 美国俄亥俄州保龄球格林州立大学生物科学系

Gang Li (李刚): 加拿大萨斯喀彻温大学医学院微生物学和免疫学系

Jer-Sheng Lin (林杰生): 台湾台北中科院植物与微生物生物学研究所

Trevor Lithgow (特雷弗·利思高): 澳大利亚墨尔本, 维也纳国际中心, 生物医学发现研究所微生物学和感染和免疫学系

Roland Lloubes (罗兰·劳伯斯): 法国马赛, 艾克斯-马赛大学-CNRS, 地中海微生物研究所, 大分子系统工程实验室, LISM, UMR7255

Laureen Logger (劳伦): 法国马赛 CNRS 艾克斯-马赛大学, 地中海微生物研究所 (IMM), 大分子系统工程实验室, UMR7255

Antoine Loquet (安托万·洛克特): 法国佩萨克波尔多大学, 欧洲化学与生物研究所, 膜与纳米物体化学与生物学研究所 (UMR5248 cbmn), CNRS

Arthur Louche (阿瑟·卢什): 法国里昂大学 1 号, 里昂生物学院分子微生物学与结构生物化学方向, CNRS UMR 5086,

Pek Man Ly (佩克·曼·利): 美国密苏里州圣路易斯华盛顿大学医学院分子微生物学系

João M. Medeiros (若昂·梅德罗斯): 瑞士苏黎世大学分子生物学和生物物理学研究所生物学系

Julia V. Monjarás Feria (朱莉娅·蒙贾雷斯·费利亚): 德国宾根大学微生物与感染医学研究所 (IMIT) 细胞与分子微生物学科

Lúis Jaime Mota (路易斯·海梅·莫塔): UCIBIO—REQUIMTE, 法国葡萄牙卡帕里卡, 理工学院, 里斯博亚大学 (FCT NOVA)

Henrik Nielsen (亨里克·尼尔森): 丹麦林格比技术大学

Elena V. Orlova (埃琳娜·奥尔洛娃): 英国伦敦伯克贝克学院生物科学学院结构与分子生物学研究所

Scot P. Ouellette (苏格兰 P. 欧莱特): 美国南达科他大学桑福德医学院基础生物医学科学部

Sarav. Pais (萨拉·佩斯): Ucibio—Requimte, 葡萄牙卡帕里卡, 里斯博亚新大学 (FCT NOVA) 技术学院

Melissa Petiti (梅利莎·佩蒂蒂): 法国马赛, 艾克斯-马赛大学-CNRS, 地中海微生物研究所, 大分子系统工程实验室 (LISM, UMR7255)

Martin Pilhofer (马丁·皮尔霍夫): 瑞士苏黎世大学分子生物学和生物物理学研究所生物学系

Mylène Robert-Genthon (米琳·罗伯特-根顿): 法国格勒诺布尔, 格勒诺布尔阿尔卑斯大学, 国家科学研究中心细菌发病机制和细胞反应方向

Eduardo P. C. Rocha (爱德华多·罗查): 法国巴黎巴斯德研究所微生物进化基因组学; CNRS, UMR3525,

Suzana P. Salcedo (苏珊娜·萨尔塞多): 法国里昂大学 1 号, 里昂生物学院分子微生物学和结构

细菌蛋白分泌系统研究方法与操作规程

生物化学方向, CNRS UMR 5086

Yoann G. Santin (约安·桑丁): 法国马赛, 艾克斯-马赛大学 CNRS, 地中海微生物研究所, 大分子系统工程实验室, (LISM, UMR7255)

Mehari Tesfazgi Mebrhatu (梅哈里·特法兹吉·梅布拉塔图): 德国蒂宾根大学微生物学和感染医学研究所 (IMIT) 细胞和分子微生物学科

Claudia E. Torres Vargas (克劳迪娅·托雷斯-瓦尔加斯): 德国蒂宾根大学微生物与感染医学研究所细胞与分子微生物学科

Julie P. M. Viala (朱莉·帕拉): 地中海微生物研究所 (IMM), 法国马赛, 艾克斯-马赛大学——国家科学研究中心, 地中海微生物研究所 (IMM), 大分子系统工程实验室, UMR7255

Anne Vianney (安妮·维安尼): CIRI, 法国维尔班纳里昂大学 1 号, CNRS, UMR5308, 国家卫生研究院, 国际传染病研究中心, U1111

Maxence S. Vincent (马克斯·文森特): 法国马赛, 艾克斯-马赛大学——国家科学研究中心, 地中海微生物研究所 (IMM), 大分子系统工程实验室, (LISM, UMR7255)

Samuel Wagner (塞缪尔·瓦格纳): 德国蒂宾根大学微生物与感染医学研究所 (IMIT) 细胞与分子微生物学科; 德国感染研究中心 (DZIF)

Brent S. Weber (布伦特·韦伯): 美国密苏里州圣路易斯华盛顿大学医学院分子微生物学系

Gregor L. Weiss (格雷戈尔·威斯): 瑞士苏黎世分子生物学和生物物理研究所生物学系

Susann Zilkenat (苏珊娜·齐尔克纳特): 德国蒂宾根大学微生物与感染医学研究所 (IMIT) 细胞与分子微生物学科

Abdelrahim Zoued (阿卜杜勒拉希姆·祖埃德): 法国马赛, 艾克斯-马赛大学, CNRS, 地中海微生物研究所, 传染病系和哈佛医学院, 大分子系统工程实验室, UMR7255

(郑福英 译)

目 录

第 1 章 利用 MacSyFinder 鉴定细菌基因组中的蛋白分泌系统	(1)
1 前言	(2)
2 材料	(4)
2.1 序列数据	(4)
2.2 TXSScan 中提供的预定义模型	(4)
2.3 软件	(5)
3 方法	(5)
3.1 系统可用信息的汇编	(5)
3.2 模型建立	(7)
3.3 运行 MacSyFinder	(8)
3.4 输出文件, 并用 MacSyView 显示结果	(9)
3.5 优化与验证	(9)
4 注释	(9)
参考文献	(12)
第 2 章 蛋白质分选预测	(15)
1 前言	(16)
2 三种预测方法	(16)
3 预测算法	(20)
4 预测方法的性能	(21)
5 识别信号肽	(23)
6 无信号肽分泌的预测	(25)
7 跨膜拓扑结构预测	(28)
8 多类别预测器	(30)
9 讨论	(32)
参考文献	(33)
第 3 章 细胞组分分离	(42)
1 前言	(43)
2 材料	(43)
2.1 细胞分级分离	(43)
2.2 蛋白质溶解	(43)

3 方法	(44)
3.1 细胞分级分离/原生质体形成	(44)
3.2 蛋白质溶解	(45)
4 注释	(45)
致谢	(46)
参考文献	(46)
第4章 用荧光显微镜确定脂蛋白定位	(48)
1 前言	(49)
2 材料	(50)
2.1 细菌制备	(50)
2.2 原生质体的制备	(50)
2.3 成像	(51)
3 方法	(51)
3.1 共聚焦显微镜所用细菌的制备	(51)
3.2 原生质体制备	(51)
3.3 成像和图像分析	(52)
4 注释	(52)
致谢	(53)
参考文献	(53)
第5章 利用格罗泊霉素和放射性棕榈酸酯鉴定脂蛋白	(56)
1 前言	(57)
2 材料	(57)
2.1 大肠杆菌培养物 ³ H-棕榈酸酯标记	(57)
2.2 格罗泊霉素对 Lsp 的抑制作用	(57)
2.3 脂蛋白的免疫沉淀	(58)
2.4 Tris-Tricine 凝胶电泳	(58)
3 方法	(59)
3.1 大肠杆菌培养物 ³ H-棕榈酸酯标记	(59)
3.2 格罗泊霉素对 Lsp 的抑制作用	(59)
3.3 脂蛋白的免疫沉淀	(59)
3.4 Tris-Tricine 凝胶电泳	(59)
4 注释	(60)
参考文献	(60)
第6章 用等密度梯度法确定膜蛋白的定位	(62)
1 前言	(63)
2 材料	(63)
2.1 膜纯化	(63)
2.2 蔗糖密度分级分离	(64)

2.3 膜分离后的密度分级分离	(64)
3 方法	(65)
3.1 膜纯化	(65)
3.2 蔗糖密度分级分离	(65)
3.3 膜分离后的密度分级分离	(66)
4 注释	(66)
参考文献	(66)
第7章 细胞表面暴露	(68)
1 前言	(69)
2 材料	(71)
2.1 基于伯胺修饰的细胞表面标记	(71)
2.2 基于巯基修饰的细胞表面标记	(71)
2.3 细胞表面蛋白水解	(72)
2.4 全细胞斑点印迹分析	(72)
3 方法	(72)
3.1 基于伯胺修饰的细胞表面标记	(72)
3.2 基于巯基修饰的细胞表面标记	(73)
3.3 细胞表面蛋白水解	(73)
3.4 全细胞斑点印迹分析	(73)
4 注释	(74)
参考文献	(74)
第8章 通过蛋白水解作用研究内膜蛋白的拓扑结构	(76)
1 前言	(77)
2 材料	(77)
2.1 细胞生长和原生质体制备	(77)
2.2 蛋白酶可及性测定	(78)
2.3 通过 SDS-PAGE 和免疫检测进行样品分析	(78)
3 方法	(78)
3.1 细胞生长和原生质体制备	(78)
3.2 蛋白酶可及性测定	(79)
3.3 通过 SDS-PAGE 和免疫检测进行样品分析	(79)
4 注释	(79)
致谢	(80)
参考文献	(80)
第9章 通过取代半胱氨酸可及性方法 (SCAMTM) 定位膜蛋白拓扑结构	(82)
1 前言	(83)
1.1 膜蛋白拓扑结构和拓扑结构发生	(83)
1.2 选择方法	(83)

1.3	证明 SCAM™传统优势的合理性	(84)
1.4	SCAM™的应用	(85)
1.5	使用 SCAM™进行拓扑绘图的概述和一般原理	(85)
2	材料	(90)
2.1	表达单半胱氨酸衍生物的质粒构建	(90)
2.2	大肠杆菌菌株的培养	(90)
2.3	SCAM™	(90)
2.4	膜蛋白溶解	(91)
2.5	免疫沉淀反应 (IP)	(91)
2.6	SDS-PAGE 和免疫印迹分析	(91)
3	方法	(91)
3.1	马来酰亚胺衍生物标记	(91)
3.2	样品溶解	(92)
3.3	目的蛋白衍生物的分离	(92)
3.4	SDS-PAGE、蛋白印迹分析和生物素蛋白-HRP 染色	(93)
3.5	数据分析和解释	(93)
4	注释	(94)
	参考文献	(96)
第 10 章	利用 pho-lac 融合报告基因测定膜蛋白的拓扑结构	(99)
1	前言	(100)
2	材料	(101)
2.1	细菌生长培养基、菌株和质粒构建	(101)
2.2	β -半乳糖苷酶测定	(102)
2.3	磷酸酶测定	(102)
3	方法	(102)
3.1	目的膜蛋白中 pho-lac 融合位点的选择	(103)
3.2	C 末端融合方法	(103)
3.3	嵌套缺失方法	(103)
3.4	夹层融合法	(104)
3.5	双底物平板上的克隆分析	(104)
3.6	用于酶分析的细菌培养物的生长	(104)
3.7	β -半乳糖苷酶活性测定	(104)
3.8	磷酸酶活性测定	(105)
4	注释	(105)
	致谢	(107)
	参考文献	(107)
第 11 章	胞内和胞外蛋白质-肽聚糖的相互作用	(110)
1	前言	(111)

2 材料	(111)
2.1 胞内交联	(111)
2.2 肽聚糖纯化	(112)
2.3 胞壁酸法测定肽聚糖	(112)
2.4 共沉淀试验	(112)
3 方法	(112)
3.1 胞内交联	(112)
3.2 从革兰氏阴性细菌中纯化肽聚糖	(113)
3.3 肽聚糖的胞壁酸测定	(114)
3.4 肽聚糖和目的蛋白的共沉淀	(114)
4 注释	(115)
参考文献	(115)
第 12 章 肽聚糖水解酶活性的测定	(117)
1 前言	(118)
2 材料	(118)
2.1 肽聚糖纯化	(118)
2.2 肽聚糖降解的比浊度分析	(119)
2.3 用雷马素亮蓝标记肽聚糖	(119)
2.4 用 RBB 标记的肽聚糖降解测定	(119)
3 方法	(120)
3.1 肽聚糖纯化	(120)
3.2 肽聚糖降解的比浊度分析	(120)
3.3 用 Remazol 亮蓝标记肽聚糖	(121)
3.4 用 RBB 标记的肽聚糖降解测定	(121)
4 注释	(121)
致谢	(122)
参考文献	(122)
第 13 章 蛋白-蛋白相互作用；细菌双杂交	(125)
1 前言	(126)
1.1 基于细菌腺苷酸环化酶的双杂交系统原理	(126)
1.2 一般方法	(126)
2 材料	(127)
2.1 设备	(127)
2.2 细菌培养基	(127)
2.3 分析 β -半乳糖苷酶的溶液	(128)
2.4 BATCH 报告菌株、质粒和抗体	(128)
3 方法	(128)
3.1 一般方法	(128)

3.2	编码杂合蛋白的 BACTH 质粒的构建	(129)
3.3	指示性平板分析相互作用的筛选方法	(130)
3.4	互作伴侣的 BACTH 筛选: 基础培养基上的选择程序	(130)
3.5	β -半乳糖苷酶法定量分析杂交蛋白的功能互补性	(131)
3.6	蛋白质印迹法鉴定杂合蛋白	(131)
4	注释	(132)
	致谢	(135)
	参考文献	(135)
第 14 章	蛋白-蛋白相互作用: 酵母双杂交系统	(138)
1	前言	(139)
2	材料	(140)
2.1	酵母菌株和载体	(140)
2.2	酵母培养和酵母转化	(140)
2.3	选择性培养基	(141)
2.4	用于蛋白质提取和蛋白印迹分析的酵母培养物的制备	(141)
2.5	酵母蛋白提取物的制备	(141)
3	方法	(141)
3.1	pGBKT7 和 pGADT7 载体中的基因构建	(141)
3.2	用于酵母转化的酵母培养物的制备	(142)
3.3	PEG/LiAc 介导的酵母转化 (诱饵和猎物质粒的小规模转化)	(142)
3.4	选择转化体	(142)
3.5	蛋白-蛋白相互作用试验	(143)
3.6	用于蛋白质提取的酵母培养物的制备	(143)
3.7	酵母蛋白提取物的制备及蛋白质印迹分析	(143)
4	注释	(143)
	致谢	(145)
	参考文献	(145)
第 15 章	蛋白-蛋白相互作用: 细胞双杂交技术	(147)
1	前言	(148)
2	材料	(149)
2.1	双分子荧光互补	(149)
2.2	细胞双杂交技术	(149)
3	方法	(150)
3.1	双分子荧光互补	(150)
3.2	细胞双杂交技术	(150)
4	注释	(151)
	致谢	(153)
	参考文献	(153)

第 16 章 融合报告基因监测细菌膜跨膜螺旋相互作用的方法	(155)
1 前言	(156)
1.1 检测 TMH 同型相互作用	(156)
1.2 检测 TMH 异型相互作用	(157)
2 材料	(157)
2.1 监测 TMH 同型相互作用: TOXCAT 分析	(157)
2.2 监测 TMH 异型相互作用: GALLEX 分析	(158)
3 方法	(159)
3.1 监测 TMH 同型相互作用: TOXCAT 分析	(159)
3.2 监测 TMH 异型相互作用: GALLEX 分析	(160)
4 注释	(161)
致谢	(162)
参考文献	(162)
第 17 章 蛋白-蛋白相互作用: 免疫共沉淀	(165)
1 前言	(166)
2 材料	(167)
2.1 菌体细胞的交联	(167)
2.2 菌体细胞提取物的制备	(167)
2.3 蛋白质样品预清除	(167)
2.4 抗体与蛋白 A-琼脂糖珠的偶联	(167)
2.5 蛋白质复合物的纯化和分离	(167)
2.6 TrueBlot 用于 Co-IP 复合物的蛋白质检测	(167)
3 方法	(168)
3.1 样品交联	(168)
3.2 菌体细胞提取物的制备	(168)
3.3 蛋白质样品预清除和蛋白 A/G 珠抗体的偶联	(169)
3.4 蛋白质复合物的纯化和分离	(169)
3.5 TrueBlot 用于 Co-IP 复合物的蛋白质检测	(169)
4 注释	(169)
致谢	(171)
参考文献	(171)
第 18 章 蛋白-蛋白相互作用: 细菌的串联亲和纯化	(172)
1 前言	(173)
2 材料	(174)
2.1 构建 TAP-标签的融合蛋白, 并通过免疫印迹验证杂交蛋白	(174)
2.2 胞质蛋白质提取物	(174)
2.3 串联亲和纯化	(175)
2.4 三氯乙酸沉淀	(175)