

目 录

前言

第四版前言

致谢

缩略语

1 常规技术	1
1.1 缓冲液的配制	1
1.2 蛋白质定量	1
1.2.1 BCA 法	2
1.2.2 Bradford 法	3
1.2.3 Lowry 法	3
1.2.4 Starcher 法	3
1.2.5 比色法测定蛋白质的浓度	4
1.3 凝胶电泳	4
1.3.1 SDS 凝胶	5
1.3.2 快捷法: 无堆积胶的 SDS 凝胶电泳	7
1.3.3 天然凝胶	8
1.4 凝胶染色	9
1.4.1 固定	9
1.4.2 染色	9
1.4.3 干胶	12
1.5 沉淀和浓缩	13
1.5.1 变性沉淀	13
1.5.2 天然沉淀	14
1.5.3 浓缩	14
1.6 印迹	15
1.6.1 蛋白质印迹显色	17
1.6.2 封闭	18
1.6.3 免疫显色	19
1.6.4 Ca^{2+} 结合	20
1.6.5 配体显色	21
1.7 凝胶和印迹的放射自显影	22

2 配体结合	25
2.1 放射性配体标记	26
2.1.1 肽和蛋白质的碘化	26
2.1.2 第二天——碘化过程的问题和对策	28
2.1.3 低分子量分子的碘化	29
2.1.4 碘化组分的纯化	29
2.1.5 碘化法的优点和缺点	30
2.1.6 氘标记	32
2.2 结合	32
2.2.1 膜的分离	32
2.2.2 结合实验	34
2.2.3 膜结合实验	37
2.2.4 膜结合实验的改进	38
2.2.5 可溶性蛋白的结合实验	39
2.2.6 无法结合	55
2.3 结合数据的分析	57
2.3.1 平衡态结合反应	57
2.3.2 动力学	69
2.4 配体交联	71
2.4.1 三组分交联 (3C 交联)	72
2.4.2 光亲和交联	77
2.4.3 交联实验的对照	79
2.5 结合蛋白的用途	79
3 膜蛋白的溶解	83
3.1 去垢剂	83
3.1.1 名词解释	83
3.1.2 去垢剂的使用	85
3.2 溶解	87
3.2.1 溶解的标准	92
3.2.2 溶解膜蛋白的物理参数	93
4 通过功能测定检测蛋白质	95
4.1 转运体	95
4.1.1 脂质体	96
4.1.2 蛋白脂质体	97
4.2 膜蛋白的重组还原	98
4.2.1 从溶液中重组	98
4.2.2 重组入预先形成的脂质体	100

4.3	通量实验	100
4.3.1	流入检验	102
4.3.2	流出检验	104
4.4	一些建设性的意见	105
5	去除杂质和纯化	109
5.1	纯粹娱乐——蛋白质纯化的过程	109
5.2	常规纯化方法	113
5.2.1	柱层析技术	113
5.2.2	基于分子量差异的纯化	114
5.2.3	基于电荷差异的纯化	117
5.2.4	疏水层析	124
5.2.5	蓝色凝胶	125
5.3	亲和层析	125
5.3.1	凝集素层析	125
5.3.2	配体层析	127
5.4	纯度检验	134
5.5	纯化蛋白的作用	134
6	抗体	137
6.1	多克隆抗体的获得	140
6.1.1	抗原	140
6.1.2	佐剂	141
6.1.3	注射抗原和取血清	142
6.1.4	抗体纯化	143
6.2	免疫沉淀	145
6.2.1	利用固定化蛋白 A 进行免疫沉淀	145
6.2.2	利用固定化抗体进行免疫沉淀	146
6.3	免疫亲和层析	148
6.4	不纯蛋白的抗体	148
6.5	免疫学检测技术	150
7	蛋白质组学	155
7.1	简介	155
7.2	取样	157
7.3	双向凝胶电泳	161
7.4	肽和蛋白质质谱	165
7.4.1	质谱仪	165
7.4.2	MALDI 质谱的样品制备	170

7.4.3	MALDI 和 ESI 质谱的用途	172
7.5	蛋白质芯片	174
7.5.1	应用 SELDI 技术的蛋白质芯片	174
7.5.2	幸运饼干——蛋白质芯片的可行性	176
7.5.3	适配体	177
7.6	微序列分析	179
7.6.1	蛋白质样品准备	179
7.6.2	封闭的 N-末端	180
7.6.3	蛋白质裂解成肽段	181
7.6.4	Edman 降解	183
7.6.5	羧基端序列分析	183
7.6.6	肽段的阶梯序列分析	184
7.7	策略性的观点	189
8	亚基	191
8.1	亚基的数量与比例	191
8.1.1	关于确定亚基比例的难点	191
8.1.2	X-射线结构解析确定亚基数量与比例	192
8.1.3	杂交实验确定亚基数量与比例	192
8.1.4	交联实验确定亚基数量与比例	194
8.1.5	氨基酸分析或抗体法确定亚基数量与比例	199
8.2	什么力量使我们在一起? ——亚基间的结合	200
9	糖蛋白	205
9.1	蛋白质糖基化的方式、位点和作用	205
9.2	凝胶电泳检测糖蛋白	206
9.3	印迹法检测糖蛋白	206
9.3.1	非选择性糖蛋白显色	206
9.3.2	选择性(凝集素)显色	208
9.4	脱糖基化	208
9.4.1	糖基化抑制剂	208
9.4.2	内切糖苷酶	210
9.4.3	化学法脱糖基化	214
9.5	糖链	216
9.5.1	单糖组分	216
9.5.2	结构与序列	216
10	凝聚宝藏: 论文的写作	225
10.1	关于论文	225

10.2 关于论文写作.....	225
11 沙漠探险：文献的调研.....	227
最后的话.....	228
附录 A 专业资源.....	229
A.1 供应商.....	229
A.2 产品供应商.....	229
索引.....	231

(赵颖 译 沈世华 校)

Contents

Preface	ix
Preface to the Fourth Edition	xi
Acknowledgments	xiii
Abbreviations	xv
1 Daily Bread	1
1.1 Making Buffers	1
1.2 Protein Determination	1
1.2.1 BCA Assay	2
1.2.2 Bradford Assay	3
1.2.3 Lowry Assay	3
1.2.4 Starcher Assay	3
1.2.5 Protein Concentration	4
1.3 Gels	4
1.3.1 SDS Gels	5
1.3.2 For the Impatient: SDS Electrophoresis Without Stacker	7
1.3.3 Native Gels	8
1.4 Staining Gels	9
1.4.1 Fixing	9
1.4.2 Staining	9
1.4.3 Drying	12
1.5 Precipitation and Concentration	13
1.5.1 Denaturing Precipitation	13
1.5.2 Native Precipitation	14
1.5.3 Concentration	14
1.6 Blotting	15
1.6.1 Protein Staining on Blots	17
1.6.2 Blocking	18
1.6.3 Immunostaining	19
1.6.4 Ca^{2+} Binding	20
1.6.5 Ligand Staining	21
1.7 Autoradiography of Gels and Blots	22
2 Ligand Binding	25
2.1 Radioactive Ligand Marking	26
2.1.1 Iodination of Peptides and Proteins	26
2.1.2 The Day After	28
2.1.3 Iodination of Molecules with Low MW	29
2.1.4 Isolation of Iodized Species	29
2.1.5 Advantages and Disadvantages of Iodination	30
2.1.6 Tritiation	32
2.2 Binding	32
2.2.1 Isolation of Membranes	32
2.2.2 Binding Assay	34
2.2.3 Binding Assays with Membranes	37
2.2.4 Development of Membrane Binding Assays	38
2.2.5 Binding Assays with Soluble Proteins	39
2.2.6 No Binding	55
2.3 Analysis of Binding Data	57
2.3.1 The Binding Reaction in Equilibrium	57
2.3.2 Kinetics	69

2.4	Cross-linking of Ligands	71
2.4.1	Three-component Cross-linking (3C Cross-linking)	72
2.4.2	Photoaffinity Cross-linking	77
2.4.3	Controls for Cross-linking Experiments	79
2.5	Purposes	79
3	Solubilization of Membrane Proteins	83
3.1	Detergents	83
3.1.1	Clean Concepts	83
3.1.2	Handling Detergents	85
3.2	Solubilization	87
3.2.1	Solubilization Criteria	92
3.2.2	Physical Parameters of Solubilized Membrane Proteins	93
4	Protein Detection via Functional Measurements	95
4.1	Translocators	95
4.1.1	Liposomes	96
4.1.2	Proteoliposomes	97
4.2	Reconstitution	98
4.2.1	Reconstitution from a Solution	98
4.2.2	Reconstitution in Preformed Liposomes	100
4.3	Flux Assay	100
4.3.1	Influx Assay	102
4.3.2	Efflux Assay	104
4.4	Constructive Thoughts	105
5	Cleaning and Purifying	109
5.1	Pure Fun	109
5.2	Conventional Purification Methods	113
5.2.1	The Column Technique	113
5.2.2	Purification Based on Size Differences	114
5.2.3	Purification Based on Charge Differences	117
5.2.4	Hydrophobic Chromatography	124
5.2.5	The Blue Gel	125
5.3	Affinity Chromatography	125
5.3.1	Lectin Chromatography	125
5.3.2	Ligand Chromatography	127
5.4	The Purity Test	134
5.5	Profiting	134
6	Antibodies	137
6.1	Production of Polyclonal Antibodies	140
6.1.1	Antigen	140
6.1.2	Adjuvant	141
6.1.3	Injection and Serum Harvesting	142
6.1.4	Purification of Antibodies	143
6.2	Immunoprecipitation	145
6.2.1	Immunoprecipitation with Immobilized Protein A	145
6.2.2	Immunoprecipitation with Immobilized Antibody	146
6.3	Immunoaffinity Chromatography	148
6.4	Antibodies Against Unpurified Proteins	148
6.5	Immunological Detection Techniques	150
7	Proteomics	155
7.1	Introduction	155
7.2	Sample Taking	157

7.3	2D Gel Electrophoresis	161
7.4	Mass Spectroscopy of Peptides and Proteins	165
7.4.1	Mass Spectrometers	165
7.4.2	Sample Preparation for MALDI	170
7.4.3	The Possibilities of MALDI and ESI	172
7.5	Protein Chips	174
7.5.1	Protein Chips with SELDI	174
7.5.2	Fortune Cookies	176
7.5.3	Aptamers	177
7.6	Microsequencing	179
7.6.1	Preparing the Protein	179
7.6.2	Blocked N-Termini	180
7.6.3	Cleaving the Protein into Peptides	181
7.6.4	The Edman Degradation	183
7.6.5	Carboxyterminal Sequencing	183
7.6.6	Ladder Sequencing of Peptides	184
7.7	Strategy	189
8	Subunits	191
8.1	Number and Stoichiometry of Subunits	191
8.1.1	About the Difficulties with Stoichiometry Determinations	191
8.1.2	N&S with X-ray Structural Analysis	192
8.1.3	N&S with Hybridization Experiments	192
8.1.4	N&S with Cross-linking Experiments	194
8.1.5	N&S with Amino Acid Analyses or Antibodies	199
8.2	What Holds Our World Together?	200
9	Glycoproteins	205
9.1	How, Where, and for What Purpose Are Proteins Glycosylated?	205
9.2	Detecting Glycoproteins in Gels	206
9.3	Detection of Glycoproteins on Blots	206
9.3.1	Nonselective Glycoprotein Stain	206
9.3.2	Selective (Lectin) Stain	208
9.4	Deglycosylation	208
9.4.1	Glycosylation Inhibitor	208
9.4.2	Endoglycosidases	210
9.4.3	Chemical Deglycosylation	214
9.5	The Sugar Chains	216
9.5.1	Monosaccharide Composition	216
9.5.2	Structure and Sequence	216
10	Treasure Island: Writing Papers	225
10.1	Of the Paper	225
10.2	Of Writing a Paper	225
11	Desert Planet: Researching the Literature	227
	Last Things	228
Appendix A	Professional Resources	229
A.1	Suppliers	229
A.2	Suppliers by Product	229
Index		231