

目 录

撰稿人	xix
序言	xxv
1. 为什么需要纯化酶?	1

第一部分 建立纯化程序

2. 蛋白质纯化的策略和思路	9
1. 总体思路	10
2. 蛋白质来源	15
3. 提取	16
4. 批量纯化的步骤	17
5. 纯化的精制步骤	18
6. 结论	19
参考文献	19
3. 生物信息学在蛋白质纯化方案设计中的应用	21
1. 从氨基酸序列中可以了解到什么	22
2. 仍不能预测到的是什么	25
3. 结论	26
参考文献	27
4. 制作一张蛋白质纯化的汇总表	29
1. 引言	29
2. 脚注的重要性	32
3. SDS-聚丙烯酰胺凝胶分析对于主要蛋白质组分的价值	32
4. 常见的错误和问题	32

第二部分 处理蛋白质和酶的常规方法

5. 建立一个实验室	37
1. 支撑材料	38
2. 分析检测的必要条件	39
3. 蛋白质分级的必要条件	40
6. 缓冲液:原理和操作	43
1. 引言	43
2. 理论	44
3. 缓冲液的选择	45
4. 缓冲液的准备	48
5. 挥发性缓冲液	49

6. 宽范围的缓冲液	50
7. 缓冲液储备液的配制	50
参考文献	56
7. 酶活的测定	57
1. 引言	58
2. 催化活性的原理	58
3. 酶活性的测定	64
4. 反应分析混合物的配方设计	69
5. 讨论	71
致谢	71
参考文献	71
8. 蛋白质质量	73
1. 引言	74
2. 准备试剂的说明	75
3. 紫外光谱吸收方法	80
4. 染料染色蛋白质分析	83
5. 考马斯亮蓝蛋白质检测法(Bradford 法)(范围:1-50 μ g)	85
6. Lowry 检测法(Alkaline Copper 还原法)(范围:5-100 μ g)	86
7. 二喹啉甲酸检测法(BCA 法)(范围:0.2-50 μ g)	88
8. 胺衍生法(范围:0.05-25 μ g)	89
9. 基于去垢剂的荧光检测法(范围:0.02-2 μ g)	91
10. 总论	91
致谢	94
参考文献	94
9. 蛋白质浓缩和其他溶解物的去除	97
1. 层析	98
2. 电泳	103
3. 透析	104
4. 超滤	107
5. 冷冻干燥	113
6. 沉淀	116
7. 结晶	118
参考文献	118
10. 蛋白质稳定性的保持	121
1. 蛋白质失活的原因	121
2. 常规处理方法	122
3. 浓缩和溶解条件	122
4. 稳定性试验和储藏条件	123

5. 蛋白质水解和蛋白酶抑制剂	124
6. 蛋白质活性损失	125

第三部分 重组蛋白质的表达和纯化

11. 有效表达重组蛋白质方法的选择

1. 引言	132
2. 大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	133
3. 毕赤酵母(<i>Pichia pastoris</i>)	135
4. 杆状病毒/昆虫细胞	136
5. 哺乳动物细胞	138
6. 蛋白质特性	139
7. 重组蛋白质的应用	143
8. 结论	144
参考文献	144

12. 细菌系统内外源蛋白质的表达

1. 引言	150
2. 用 <i>E. coli</i> 表达外源蛋白质	150
3. 设计一个细菌表达方案	151
4. 方案条件的评估	152
5. 目标蛋白的分析	152
6. 克隆	153
7. 准备 T4 DNA 聚合酶-处理的 DNA 片段	155
8. <i>E. coli</i> 细胞质中的表达	156
9. <i>E. coli</i> 细胞质中目标蛋白的表达	157
10. <i>E. coli</i> 中外源蛋白质表达的分析	157
11. 在自身诱导培养基中小规模表达培养	160
12. 蛋白质的细胞质表达	160
13. <i>E. coli</i> 中细胞质目标蛋白的表达	161
14. 小规模渗透压休克的操作	162
15. 表达外源蛋白质的其他细菌体	164
16. 其他载体和诱导条件	165
17. 生产规模	166
致谢	166
参考文献	166

13. 毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中的表达

1. 引言	170
2. 其他真菌表达系统	170
3. 培养基和细菌操作技术	171

4. 基因工程菌的构建	172
5. 基因的准备和载体的选择	174
6. 电穿孔转化	176
7. DNA 制备	176
8. 重组蛋白质生产菌株的检查	178
9. 进一步分析——Yeastern 印迹	182
10. 重组蛋白质翻译后修饰(蛋白酶作用和糖基化)	184
11. 表达暗盒多重拷贝的选择	185
参考文献	187
14. 杆状病毒——昆虫细胞表达系统	191
1. 引言	192
2. 杆状病毒生物学和分子生物学的简述	193
3. 杆状病毒表达载体	195
4. 杆状病毒表达载体技术——初期阶段	196
5. 杆状病毒表达载体技术——后期阶段	198
6. 杆状病毒转移质粒的修饰	198
7. 亲代杆状病毒基因组的修饰	200
8. 杆状病毒的另外一半——昆虫细胞系统	210
9. 杆状病毒表达载体的新一代昆虫细胞宿主	212
10. 杆状病毒基本操作规程	214
参考文献	218
15. 瞬间基因转移到哺乳动物细胞实现对重组蛋白质的生产	223
1. 引言	224
2. 常用于 TGE 方法中的 HEK293 和 CHO 细胞系	224
3. HEK293 和 CHO 细胞的表达载体	226
4. 悬浮液中 HEK293 和 CHO 细胞系的培养	228
5. 转染方法	228
6. 结论	234
致谢	234
参考文献	235
16. 蛋白质表达的标签	239
1. 引言	240
2. 设计融合标签蛋白时考虑的因素	241
3. 蛋白质亲和标签	245
4. 促溶蛋白标签	249
5. 蛋白标签的去除	251
6. 结论	253
致谢	254

参考文献	254
17. 可溶性包含体蛋白质的重折叠	259
1. 引言	260
2. 常见的重折叠因素	262
3. 常规步骤	262
4. 常规操作规程	263
5. 对操作流程的评价	264
6. 蛋白质重折叠的测试筛选	271
7. 其他的重折叠步骤	275
8. 重折叠数据库:重折叠	277
9. 增加可溶蛋白质比例的策略	277
10. 结论	279
参考文献	279

第四部分 提取物和亚细胞组分的分离

18. 生物提取物制备的研究进展——用于蛋白质纯化	285
1. 引言	286
2. 化学法和酶法破碎细胞	287
3. 机械法破碎细胞	290
4. 结束语	293
5. 细胞破碎的步骤、试剂和注意事项	293
参考文献	301
19. 亚细胞器官的分离和结构	305
1. 引言	306
2. 亚细胞蛋白质组的提取和初步分离	308
参考文献	327

第五部分 纯化步骤:批量法

20. 蛋白质沉淀技术	331
1. 引言	332
2. 硫酸铵沉淀	332
3. 聚乙烯亚胺沉淀	337
4. 其他方法	341
5. 沉淀法分离蛋白质的常规操作	341
参考文献	342
21. 用于去除核酸的 Affi-Gel 蓝胶和核苷酸结合蛋白质的初步富集	343
1. 代表性的操作规程	344
参考文献	345

第六部分 纯化步骤:层析法

22. 离子交换层析	349
1. 引言	349
2. 原理	351
3. 固定相	353
4. 结合条件	355
5. 洗脱条件	361
6. 离子交换柱的操作	363
7. 例子:复合蛋白质混合物的分离	366
8. 例子:整体柱的高分辨率分离	367
参考文献	370
23. 凝胶过滤	373
1. 原理	373
2. 操作	374
24. 羟磷灰石柱用于蛋白质层析	387
1. 引言	388
2. 机理	389
3. 化学特性	392
4. 纯化操作规程	396
5. 制备实验室用的柱子	397
6. 制备工业规模的柱子	399
7. 应用	401
参考文献	402
25. 疏水层析(HIC)在蛋白质纯化中的理论和应用	405
1. 理论	406
2. HIC 吸附剂的最新技术	408
3. 使用 HIC 吸附剂的步骤	409
参考文献	413

第七部分 纯化步骤:亲和法

26. 亲和层析柱:常规方法	417
1. 引言	418
2. 亲和基质的选择	419
3. 配基的选择	423
4. 化学吸附	429
5. 纯化方法	433
参考文献	435

27. 固定化金属亲和层析(IMAC):综述	439
1. IMAC 配基和固相离子的概述	440
2. IMAC 的应用	444
3. 结论	467
致谢	468
参考文献	468
28. 多羟基反应单克隆抗体的鉴定、生产和应用——用于免疫亲和层析	475
1. 引言	476
2. 多羟基反应单克隆抗体	477
3. 结论	492
公告	493
参考文献	493

第八部分 纯化步骤:电泳法

29. 单向凝胶电泳	497
1. 背景	498
2. 聚丙烯酰胺凝胶	500
3. 方法的原理	501
4. 步骤	502
5. 凝胶中蛋白质的检测	508
6. 标准蛋白质	510
7. 分子量的测定	511
8. 制备电泳	511
参考文献	513
30. 等电聚焦和双向凝胶电泳	515
1. 引言	516
2. 材料	527
3. 方法	528
参考文献	538
31. 蛋白质凝胶染色方法:引言和综述	541
1. 引言	542
2. 常规考虑	543
3. 仪器:检测和记录	545
4. 总蛋白质检测	545
5. 磷蛋白质的检测	556
6. 糖蛋白质的检测	557
参考文献	559

32. 凝胶中蛋白质的洗脱	565
1. 引言	565
2. 通过扩散来洗脱凝胶中的蛋白质	566
3. 反相 HPLC 取代 SDS 凝胶	570
4. 电泳洗脱	570
5. 结论	571
参考文献	571
33. 着重于化学发光检测对蛋白质印记进行优化	573
1. 蛋白质印迹	574
2. 蛋白质印迹的种类	575
3. 检测方法	579
4. 化学发光信号	583
5. 常见问题及其原因	588
6. 使用化学发光底物的印迹和操作规程的优化	593
参考文献	598
第九部分 膜蛋白和糖蛋白的纯化程序	
34. 去污剂:综述	603
1. 引言	604
2. 去污剂结构	604
3. 溶液中去污剂的性质	605
4. 利用去污剂的物理化学参数进行膜蛋白质的纯化	612
5. 去污剂的去除及交换	613
6. 选择合适的去污剂	613
7. 结论	615
致谢	616
参考文献	616
35. 膜蛋白质的纯化	619
1. 引言	619
2. 膜的制备	620
3. 天然膜蛋白的溶解	622
4. 膜蛋白质的纯化	625
5. 去污剂的去除及交换	628
6. 重组整合膜蛋白质的表达和纯化	628
参考文献	629
36. 重组 G 蛋白质偶联受体的纯化	631
1. 引言	632
2. 蛋白质增溶的一般注意事项	633

3. 蛋白质纯化的一般注意事项	634
4. 重组神经降压素受体 NTS1 的增溶及纯化	637
5. 纯化蛋白质 NTS1 的分析	641
6. 结论	642
致谢	642
参考文献	642
37. 整合膜蛋白在单室脂质体中的无细胞翻译	647
1. 引言	648
2. 无细胞翻译的概述	650
3. 表达载体	651
4. 基因克隆	652
5. PCR 产物的清除	655
6. Flexi 载体和 PCR 产物的消化反应	656
7. 连接反应	657
8. 转化反应	658
9. 质粒 DNA 的纯化	659
10. mRNA 的制备	660
11. 脂质体的制备	661
12. 小麦胚芽翻译的反应	662
13. 密度梯度超速离心法进行纯化	665
14. 脂蛋白体的特点	667
15. 规模化纯化的注意事项	669
16. 同位素标记进行结构研究	669
17. 结论	670
致谢	670
参考文献	670

第十部分 纯化蛋白质的特性

38. 蛋白质纯度测定	677
1. 蛋白质的组成和活性分析	680
2. 电泳法	681
3. 色谱法	685
4. 沉降速度测定法	687
5. 质谱法	687
6. 光散射法	688
参考文献	689
39. 蛋白质亚基的存在及其大小和分子量的测定	691
1. 引言	692

2. 化学方法	695
3. 传输方法	698
4. 散射方法	716
5. 蛋白质亚基的存在	719
参考文献	721
40. 翻译后修饰蛋白质的定性与定量	725
1. 引言	726
2. 用于鉴定 PTMs 的富集技术	731
3. 硝化蛋白的修饰	740
4. 甲基化和乙酰化	741
5. 质谱分析	744
6. CID、ECD 和 ETD 的对比	747
7. PTMs 的定量分析	750
8. 展望	756
致谢	758
参考文献	758

第十一部分 其他技术

41. 表达和纯化相应的方法	767
1. 引言	767
2. 基于终端使用的策略	768
3. 构建表达结构的平行克隆策略	771
4. 用于鉴别合适结构的小规模表达筛选	774
5. 分析检测蛋白质以进行筛选	778
6. 大规模平行表达	780
7. 结论	783
致谢	783
参考文献	784
42. 氧敏感蛋白的分离技术:以[4F_E-4S]-FNR 为例	787
1. 引言	788
2. 4F _E -FNR 的厌氧分离	790
3. 含 FNR 的[4F _E -4S] ²⁺ 族蛋白质的特征	799
4. 总结	803
参考文献	803

第十二部分 结束语

43. 纯化程序的再思考	809
1. 引言	809

44. 蛋白质生物化学中重要的却鲜为人知(或易被忽视)的几点	813
1. 引言	814
2. SDS 凝胶电泳的样品制备	814
3. 缓冲液	816
4. 色谱	817
5. 过滤过程中的蛋白质吸收	818
6. 塑料制品中的化学物浸出	819
7. 尿素中的氰酸盐	819
参考文献	820
撰稿人索引	821
索引	835

(陆健 金昭 管政兵 译)