

综述

放线菌蛋白质组学研究进展

张瑶¹, 徐平², 李文均³, 陶勇¹

1 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

2 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 蛋白质组学国家重点实验室 国家蛋白质科学中心 (北京) 北京蛋白质组研究中心 蛋白质药物国家工程研究中心, 北京 102206

3 云南大学云南省微生物研究所 西南微生物多样性教育部重点实验室, 云南 昆明 650091

张瑶, 徐平, 李文均, 等. 放线菌蛋白质组学研究进展. 生物工程学报, 2014, 30(7): 1044–1058.

Zhang Y, Xu P, Li WJ, et al. Advances in actinobacterial proteomics. Chin J Biotech, 2014, 30(7): 1044–1058.

摘要: 蛋白质是生理功能的执行者, 是生命现象的直接体现者, 蛋白质组学旨在阐明生物体全部或部分蛋白质在生命活动中的作用和功能。随着组学理论基础和技术方法的逐渐成熟, 蛋白质组学的研究被提高到了前所未有的高度。放线菌与人类的生产和生活关系极为紧密, 是产生抗生素和酶制剂的主要来源。近 130 多年的放线菌系统学研究和 2001 年模式菌株的全基因组测序, 为功能基因组研究奠定了基础。与先前的基因组学和转录组学相比, 放线菌蛋白质组学能更直接、更准确地解释生命现象, 得到了快速发展, 并受到研究者的高度关注。近年来放线菌蛋白质组学的研究主要包括复杂形态分化和发育过程、非凡的环境适应能力、与植物共生固氮、代谢机理及特殊功能、病原放线菌致病性和筛查天然产物等几个方向, 为进一步促进放线菌蛋白质组学发展奠定了基础。

关键词: 放线菌, 蛋白质组学, 双向电泳, 质谱, 机理

Received: December 23, 2013; **Accepted:** January 13, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31270054, 31070673, 31170780), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB910600).

Corresponding author: Ping Xu. Tel: +86-10-83147777-1314; Fax: +86-10-80705155; E-mail: xupingghy@gmail.com

Wenjun Li. Tel/Fax: +86-871-65033335; E-mail: wjli@ynu.edu.cn; liact@hotmail.com

国家自然科学基金 (Nos. 31270054, 31070673, 31170780), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB910600) 资助。

Advances in actinobacterial proteomics

Yao Zhang¹, Ping Xu², Wenjun Li³, and Yong Tao¹

¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China

² State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Engineering Research Center for Protein Drugs, National Center for Protein Sciences, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China

³ Key Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China, Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China

Abstract: Protein is the executor of physiological function, and direct embodiment of the life phenomena. Proteomics aims to systematically clarify all or parts of proteins' role and function in life movement. In post genome era, proteomics began to play more important role in life science field. Actinobacteria are closely linked to human production and life, which have produced many clinically important secondary metabolites, including antibiotics, antitumorals and enzymes. Actinobacterial systematics and its model organism *Streptomyces coelicolor* in 2001 genome sequence laid the foundation for further functional genomic studies. Actinobacterial proteomics was more directly and exactly to interpret the activity of life than genomics and transcriptomics, which grew much faster and received so much attention from scientists in the near years. Complex morphological differentiation, strong environment adaptiveness, nitrogen-fixing capacity, metabolic mechanism, pathogenicity and natural products' discovery were systematically reviewed in this study, which was expected to be the basis for promoting Actinobacterial proteomics study in the near future.

Keywords: actinobacteria, proteomics, 2-dimensional electrophoresis, mass spectrum, mechanism

放线菌 (Actinobacteria) 是一类重要的微生物资源, 目前已被广泛应用于工、农、医药、食品、环保等领域。放线菌作为独特的微生物类群, 不但编码多种生物活性物质和酶类, 而且具有复杂的形态分化和发育过程, 同时具有非凡的环境适应能力^[1], 广泛存在于土壤、海洋、冰川、热泉、盐湖、盐矿和动植物体等多种生境。自 2001 年 7 月完成放线菌模式菌株天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 的全基因组测序后^[2], 放线菌基因组学、转录组学、代谢组学、蛋白质组学等相继蓬勃兴起。

截止到 2013 年 11 月, 国内外研究者完成放线菌 144 个属、547 个物种全基因组测序。对放线菌链霉菌属 *Streptomyces*^[3-8]、弗兰克氏菌属 *Frankia*^[9-10]、糖多孢菌属 *Saccharopolyspora*^[11-13]、游

动放线菌属 *Actinoplanes*^[14]、分枝杆菌属 *Mycobacterium*^[15]、戈登氏菌属 *Gordonia*^[16] 和棒杆菌属 *Corynebacterium*^[17] 7 个属展开了转录组研究。放线菌基因组和转录组的研究有力地推动了放线菌蛋白质组学的发展。这对诠释放线菌的生活方式、活性物质调控机理和人体健康的关系, 研究病原放线菌在疾病发生中的作用, 开发新药等都具有重要意义。因此, 放线菌组学时代正在兴起, 本文旨在阐述放线菌蛋白质组学新进展。

1 蛋白质组学及技术简介

1.1 蛋白质组和蛋白质组学

1994 年澳大利亚 Wilkins 等在意大利的一次科学会议上首次提出了蛋白质组 (Proteome)

的概念, 并定义为“一个基因组所表达的全套蛋白质”^[18]。然而此定义并没有考虑到蛋白质组的组分种类多(至少百倍于基因数)、丰度跨度大、翻译后修饰形式广、时空特异性繁复、组分间的网络性等特点^[19]。蛋白质组是动态的, 且易受供体细胞、组织或生物体等所处环境的影响。蛋白质组学(Proteomics)作为研究蛋白质组的一个工具, 系统研究蛋白质的特征, 包括蛋白质的表达水平, 翻译后的修饰, 蛋白质与蛋白质相互作用等, 由此获得蛋白质水平上的关于生物体生长发育、细胞代谢、疾病发生等过程的整体而全面的认识。

蛋白质组学的研究内容比较广, 主要包括组成蛋白质组学、相互作用蛋白质组学和差异蛋白质组学^[20]。其中差异蛋白质组学是研究热点, 主要通过比较分析不同生理状态、突变株与野生株、外界环境胁迫或相近物种间蛋白质的表达图谱, 实现对体系内代谢调控的动态监测, 从而揭示机体自身调控关键因子和对内外环境变化产生反应的本质规律, 能够反映蛋白质的动态本质和功能。因此蛋白质组学已经成为分子生物学水平研究放线菌最有价值的技术手段之一。通过研究不同生长期和不同生理条件下蛋白质组的变化, 可以获得大量生物体自身调控和功能应答等多方面信息。

1.2 蛋白质组学技术

传统的蛋白质组学样品分离手段是二维凝胶电泳(2D-E)^[21-22], 这种方法能分析数千个蛋白质, 在蛋白质组学研究中曾发挥过重大作用。但是, 由于基于二维凝胶电泳的蛋白质分离和鉴定技术耗费人力, 并且在高分子量蛋白质、低分子量蛋白质、极碱性蛋白质和疏水性蛋白质检测方面较弱^[23-24]; 实验分离的重复性不高,

蛋白质的回收率不稳定; 难以将蛋白质表达量的变化进行定量^[25]等问题, 新分离方法和先进技术被不断地开发和改进, 如差异凝胶电泳技术(Difference gel electrophoresis, DIGE)^[26-27], 同位素标记亲和标签技术(Isotope coded affinity tags, ICAT)^[28], 多维液相色谱技术(Multidimensional liquid chromatography, MDLC)^[29-31], 稳定同位素氨基酸细胞培养标记技术(Stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC)^[32], 多反应监测(Multiple reaction monitor, MRM)^[33]、同位素标记相对和绝对定量(Isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)^[34]等这些新的方法和手段, 极大地丰富了蛋白质组的测定方法, 并发现先前未被发现的蛋白质及蛋白质功能。基于凝胶电泳体系的蛋白质鉴定策略是近年来放线菌蛋白质组学研究常用的技术策略, 主要包括2种技术: 一是基于二维凝胶电泳(2-DE)的传统蛋白质组学研究方法, 二是基于一维凝胶电泳分离-高效液相色谱分离和串联质谱技术(GeLC-MS/MS)的蛋白质组学研究策略。

2 放线菌蛋白质组学研究

放线菌是呈菌丝状生长, 主要以孢子繁殖, 是细菌中的一种特殊类型, 但在培养特征上与真菌相似。基于多样化的物种资源、活性产物和独特的遗传特性, 放线菌在系统发育生物学、天然产物化学、遗传学等领域都占据了不可替代的位置, 在分子生物学领域也得到越来越广泛的关注。随着现代分子生物学技术的日臻成熟, 对放线菌的研究已远远不止停留在物种鉴定、活性化合物分离等层次上, 研究者更关注放线菌基因如何调控蛋白质的表达, 并进而对

生命活动进行调控,揭示自然界生命的奥秘。随着组学的逐渐成熟,分子水平的实验技术不断发展,放线菌蛋白质组学研究的各个方面均有较大突破,新的研究内容和方法不断出现。目前放线菌蛋白质组学研究主要集中于链霉菌属 *Streptomyces*、弗兰克氏菌属 *Frankia*、分枝杆菌属 *Mycobacterium*、拟无枝酸菌属 *Amycolatopsis*、高温单孢菌属 *Thermomonospora*、节杆菌属 *Arthrobacter*、马杜拉放线菌属 *Actinomadura*、高温双歧菌属 *Thermobifida*、棒杆菌属 *Corynebacterium*、丙酸杆菌属 *Propionibacterium* 和红球菌属 *Rhodococcus* 11 个属。

2.1 复杂形态分化和发育过程

放线菌具有复杂的形态分化和发育过程,初期是丝状营养菌丝体的生长,接下来是气生菌丝的形成,最后分化形成孢子链。Jayapal 等^[35]采用 iTRAQ 标记技术,并结合转录组数据对 *S. coelicolor* 的生长发育过程进行研究,对不同时间点的蛋白质 (7、11、14、16、22、26、34 和 38 h) 进行标记,此方法共鉴定了 1 100 个蛋白质,占理论总蛋白质的 14%,其中 330 个蛋白质在不同时间点样品中被共同检测到。进一步分析发现已鉴定蛋白质中 80%的蛋白质与核苷酸生物合成相关,76%的蛋白质与核糖体亚基相关,43%的蛋白质与次要氨基酸的合成相关,40%的蛋白质参与中心代谢,39%的蛋白质与能量代谢相关。细菌在生长过程中一般都要经历间歇性饥饿和适应,在实验过程中表现出两阶段生长期。*S. coelicolor* 在生长过程中不仅要适应初级代谢,同时还要激活自身形态变化和抗生素的生物合成。Novotna 等^[36]结合蛋白质组技术和代谢数据,对 *S. coelicolor* 液体培养过

程中两阶段生长的整体动态变化进行了研究,发现热激蛋白质并非仅仅在高温胁迫时产生,在特定的代谢途径中也被合成,经鉴定发现 204 个蛋白质与代谢和环境胁迫蛋白质相关。蛋白质聚类结果表明参与中心代谢的酶几乎都参与糖酵解、三羧酸循环以及蛋白质水解过程。

Manteca 等^[37]采用 iTRAQ 和 LC-MS/MS 技术对 *S. coelicolor* 液体培养和固体培养的初始区域菌丝 (MI) 和多核菌丝 (MII) 的蛋白质进行了比较,蛋白质鉴定发现固液体培养的 MI 和 MII 中 83%的蛋白质具有较高的相似性,参与次生代谢 (放线菌素和 II 型聚酮化合物生物合成,β-内酰胺酶,差向异构酶) 的蛋白质在 MII 中上调,初级代谢 (核糖体、三羧酸循环和产能) 的相关蛋白质在 MI 中被广泛地检测到, MII 固体和液体培养时显著差异蛋白质与菌丝后期区域化和孢子的形成相关。Manteca 等^[38]采用 iTRAQ 标记和 LC-MS/MS 技术对 *S. coelicolor* 固体培养不同发育阶段 (12、24、72 h) 的胞质蛋白质、膜内在蛋白质和膜外在蛋白质进行了研究,共鉴定了 626 个蛋白质,占理论总蛋白质的 8%,已鉴定蛋白质中 36%的蛋白质与初级代谢相关,并且主要分布于胞质蛋白质和膜内在蛋白质中;多数胁迫、转运和分泌相关蛋白质主要分布于膜蛋白质中;相对于初级营养菌丝时期,多数次级代谢相关蛋白质更集中于后期繁殖菌丝体形成期,如 ActVA (SCO5077)、ActVA4 (SCO5079) 和羟酰辅酶 A 脱氢酶 (SCO5072) 与放线紫素的合成,转酮酶 (SCO6663) 参与安莎霉素的合成;而核糖体蛋白质 (SCO4653、SCO4711 和 SCO3124),糖酵解和三羧酸循环酶 (SCO5423、SCO2951、SCO4809 和 SCO4855),氨基酸代谢相关酶 (SCO2504、SCO1773 和

SCO3304) 等初级代谢相关蛋白质主要分布于初级营养菌丝发育时期中。结合比较生物信息学阐明初级代谢到次级代谢的转换介于初始区域菌丝和多核菌丝之间。Jayapal等^[39]采用 SILIC 和 iTRAQ 两种技术对 *S. coelicolor* 的生长发育进行研究, 发现双标记方法更能全面地鉴定到未发现蛋白质和未知功能蛋白质。

2.2 环境适应相关的蛋白质组学

放线菌来源广泛, 生境复杂多样, 具有很强的环境适应性, 因此生存于极端环境中的放线菌引起了研究者的关注。Schmidta 等^[40]采用 2-DE 技术对酸性矿排水区 (Acid mine drainage AMD) 分离菌株耐受重金属镍胁迫的机理进行了研究, 发现在镍刺激下, 鉴定到编码合成放线菌素合成的 4 个蛋白质, 3 个核糖体蛋白质 (S8、S9 和 L29), 1 个假定蛋白质 Lsr2 和 1 个 tetR 家族转录调控因子 spot C6。Kim 等^[41]对 *S. coelicolor* 不同 pH 胁迫所引起不同 σ 因子的表达和胁迫相关蛋白质进行了研究, 发现不同 pH 胁迫后对次级代谢发挥重要作用的 σ 因子如 *sigH* (热激)、*sigR* (氧胁迫)、*sigB* (渗透压胁迫) 和 *hrdD* 均上调, 相当一部分热激蛋白质包括 DnaK 家族和 GroEL2 分子伴侣均上调, 而 *hspR* 下调, 氧胁迫相关蛋白质如硫氧化还原蛋白质、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、过氧化物酶以及和渗透压休克相关蛋白质如囊泡合酶均整体上调。 σ 因子在细菌应对外界环境胁迫和病菌感染时发挥关键作用^[42]。Wang等^[43]采用基于 2-DE 的蛋白质组学技术对 *S. coelicolor* 野生株和 SigN 缺失突变株 M145Z 进行了比较, 研究发现 SigN 缺失株 M145Z 有 24 个蛋白质发生明显地上下调, 上调的蛋白质参与能量代谢、应激反

应、ATP 结合、ppGpp 的严格应激反应和转录抗终止等, 下调蛋白质与有关抗生素的合成和分化相关。

Kinoshita 等^[44]在日本分离到一株新的谷氨酸盐产生菌谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*, 工业规模上每年带来 2 万 t 谷氨酸添加剂和 150 万 t 赖氨酸饲料添加剂^[45]。该菌在发酵过程中会遭受所处环境的各种压力, 如氧、渗透、pH 等胁迫, 而渗透压胁迫更为显著, 也是研究热点。20 年来, 研究者从分子水平研究了 *C. glutamicum* 高渗盐胁迫机理, 对转运和生物合成途径有所了解, 并发现一些可溶性溶质发挥一定作用^[46-47]。Franze 等采用定量蛋白质组学和转录组学技术, 发现 *C. glutamicum*^[48] 可产生可溶性溶质, 如脯氨酸和甜菜碱来应对环境胁迫, 防止水分过度流失。Fischer 等^[49]对采用特异性完整膜肽富集技术 (Specific integral membrane peptide level enrichment, SIMPLE) 对主要膜蛋白质和膜蛋白质附着蛋白质进行了研究。Washburn 等^[50]采用多维液相蛋白鉴定技术 (Multidimensional protein identification technology, MudPIT) 对胞质蛋白质、膜相关蛋白质和膜蛋白质进行了研究, 共鉴定了 1 058 个蛋白质, 占理论蛋白质的 35%。与对照组相比, 明显地发现了 111 个调控蛋白。这些蛋白, 如用于合成脯氨酸的 ProP 和四氢甲基嘧啶羧酸酶在胁迫刺激下蛋白质水平明显地上调了 20 倍, 合成甜菜碱和甘氨酸的 BetP 蛋白质分别上调了 2.7 和 3.0 倍。意外的是渗透相关蛋白质 LcoP 和 EctP 没有发生变化, 而多数脂代谢和细胞壁合成蛋白质上调, 硫代谢相关蛋白质下调; 高半胱氨酸甲基转移酶 MetE、O-

乙酰丝氨酸(硫醇)-裂解酶 CysK、胱硫醚合成酶 MetB、O-乙酰-巯基酶 MetY 和铁氧还蛋白质-亚硫酸盐还原酶 CysI 在蛋白质水平上调。因此生物体转录后调控作用在今后的研究中更加值得关注。

2.3 与植物共生固氮相关的蛋白质组学

Frankia 与非豆科植物共生形成根瘤并能固定大气中的氮。据报道, *Frankia* 可与至少 200 多种植物共生。Mastronunzio^[51]基于基因组学和蛋白质组学对 *Frankia* CcI3 的孢外蛋白质进行了深入分析, 共检测到 1 000 多个共生蛋白质。其中固氮蛋白质最丰富, 还有结节特异性分泌蛋白质、转运蛋白质、细胞表面蛋白质和信号转导蛋白质。这为揭示 *Frankia* 与植物的共生关系提供一定线索。Mastronunzio 等^[52]对不同植物共生的 *Frankia* 蛋白质进行研究, 发现多数蛋白质参与能源和氮代谢, 固氮酶和固氮酶铁蛋白质最为丰富, 可能在共生中发挥重要作用。Udwary^[53]结合基因组信息和蛋白质组技术对 *Frankia* 共生主要天然产物合成潜力进行了挖掘。Huang^[54]对 CcI3 培养条件下和在木麻黄根瘤进行了比较蛋白质组学分析, 分别鉴定到 1 000 多个蛋白质, 意味着在不同条件下至少 25% 的基因被激活, 还发现管家功能相关蛋白质广泛存在。

2.4 代谢机理及特殊功能相关的蛋白质组学

放线菌的研究是伴随着抗生素工业的发展而来, 其产生的次级代谢产物结构多样, 因而具有多样的生物学活性。一般在野生菌株中这些生物活性次级代谢产物产量较低。为了满足在医药与工农业应用中的需求, 需要对野生株

进行改造。因此对代谢机理和关键蛋白质的功能研究至关重要。王玉霞^[55]基于“shotgun”蛋白质组学研究策略, 采用 2D LC-MS/MS 技术分析了藤黄灰链霉菌 *Streptomyces luteogriseus* 产抗(麦拓莱霉素, Maituolaimysin) 菌株 103 和突变不产抗菌株 *cnnl* 的菌体总蛋白质提取物, 分别鉴定到 726 和 809 个蛋白质, 建立了两个菌株的蛋白质表达谱, 并对两个菌株所鉴定蛋白质的理化性质(分子量、等电点)、亚细胞定位和功能分类进行了统计分析。Maréchal 等^[56]采用基于 2-DE 蛋白质技术对抗生素低产菌株变铅青链霉菌 *S. lividans* 野生株和相应抗生素高产菌株 *ppk* 突变株进行了比较, 发现贮存的脂质降解而非己糖分解代谢的突变对抗生素产量的影响巨大。Tiffert 等^[57]对 *S. coelicolor* 野生株和 GlnR 缺失突变株蛋白质组进行了比较, 发现 50 个差异蛋白质, 且多数蛋白质都参与氨基酸的生物合成和碳代谢, 表明 GlnR 并非单纯地与氮代谢相关, 而且在微生物整个代谢中发挥重要作用。Mason 等^[58]对蓝色链霉菌 *S. cyaneus*、嗜温热单孢菌 *Thermomonospora mesophila* 和马杜拉放线菌 *Actinomadura* sp. 的孢外蛋白质对木质纤维素的增溶作用进行了研究。Gallo 等^[59]通过对拟无枝酸菌 *Amycolatopsis balhimycinachan* 产 balhimycin 的野生株和不产抗生素突变株比较, 发现抗生素的合成始终与 balhimycin(*bal*)生物合成基因簇特异酶、碳代谢、细胞能量和氧化还原平衡上调酶相关。Haußmann 等^[60]结合转录组和蛋白质组学结果, 采用 Simple-MudPIT 技术对木质素降解红球菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 膜蛋白质进行分析, 对类固醇的利用机制进行了研究。Unell 等^[61]对 5 °C 和 28 °C、4-氯苯酚和苯酚培养的氯酚节杆

菌 *Arthrobacter chlorophenolicus* 蛋白质进行了比较,发现不同培养条件下蛋白质差异性很大。不仅如此,作者在这个工作中还鉴定了数百个未知蛋白质,阐明了 4-氯苯酚降解途径。嗜热裂孢菌 *Thermobifida fusca* 属于嗜热放线菌,一种植物细胞壁的主要降解菌,Adav 等^[62]采用 iTRAQ 和 LC-MS/MS,对含纤维素、木质素、纤维素和木质素混合培养基上生长的 *T. fusca* 分泌蛋白质进行了研究,发现了独特的胞外酶系统,包括纤维素酶的离散多酶复合物、半纤维素酶、糖苷水解酶、蛋白质酶、过氧化物酶和转运蛋白质。当菌株在纤维素、木质素、纤维素和木质素等底物上生长时,纤维素酶、半纤维素酶和转运相关蛋白质上调。此外,他们还鉴定了降解木质素 DYP 型过氧化物酶、新颖非血红素过氧化物酶、过氧化氢酶、细胞色素 C 氧化酶和超氧化物歧化酶。*C. glutamicum* 具有产生谷氨酸盐,赖氨酸等氨基酸的能力。Fränzel 等^[63]对产赖氨酸菌株 DM1730 突变株进行了研究,共发现了 1 107 个可溶性蛋白质和膜蛋白质,应激相关蛋白质分布较广泛,而参与细胞生长、分裂和细胞合成的蛋白质相对较少,还发现大量赖氨酸的合成会造成 *C. glutamicum* 氧胁迫和离子浓度受限。Li 等^[64]采用 2-DE 和 MALDI-TOF-MS 技术对谷氨酸产生菌株 *C. glutamicum* ATCC 14067 的胞质蛋白质进行了分析,发现 166 个蛋白点代表 139 种不同的蛋白质,产谷氨酸菌株 ATCC 14067 和 ATCC 13032 有明显的差异,意味着不同菌株的蛋白质还是有其独特之处。Barriuso 等^[65]对 *C. glutamicum* ATCC13032 适应不同 pH 值的胞质蛋白质和膜蛋白质进行了研究。

沈雪玲^[66]利用蛋白质对接技术 (Protein-

protein docking technology),建立了核糖体、新生肽链、4.5S RNA、Ffli、FtsY、SecYEG 转运孔道等多方相互作用的理论三维结构模型,提出了大肠杆菌 FtsY 膜定位机制的假设。通过比较 *S. coelicolor* FtsY 和 *E. coli* FtsY 在关键区域的差异,最终提出了链霉菌 FtsY A 结构域在膜定位中发挥不同功能的假说。利用膜蛋白质分离和 Mal-PEG 标记技术,他们分析了链霉菌 FtsY 的 A 结构域膜定位功能。石宣明等^[67]用蛋白质酶 K 保护/高 pH 法制备链霉菌膜内侧蛋白质组样品,并用多维蛋白质鉴别技术进行分析,得到 154 个可能的膜内侧蛋白质(包括膜内在蛋白质和膜外周蛋白质),其中含跨膜区的膜内在蛋白质 44 个,含 3 个以上跨膜区的膜内在蛋白质有 23 个,还鉴定了一批膜内侧蛋白质的亲水性肽段及其在膜上的拓扑位置。Gamboa 等^[68]研究发现非病原性丝状菌 *S. lividans* 产生的重组 O-糖蛋白质 APA 会随不同培养条件而变化。Bradshaw 等^[69]采用无标记 LC-MS/MS 对 *S. coelicolor* 的拟核系统地检测新颖的拟核相关蛋白质,基于高分度和预测的 DNA 结合能力,共鉴定了 24 个拟核相关蛋白质。

2.5 病原放线菌致病性相关的蛋白质组学

少数放线菌是致病菌,会引起人和动植物病害,如棒杆菌、分枝杆菌和丙酸杆菌等,部分棒杆菌会引起小反刍动物干酪样淋巴结炎慢性疾病;部分丙酸杆菌驻留在毛囊皮脂腺内,会引起痤疮,多数分枝杆菌为病原菌,会引起反刍动物衰弱慢性肠炎、肺结核和麻风病等疾病。组学从开始的描述性研究逐步深入到机理性认识,揭示了致病菌重要生理和病理特征,如滞留和休眠的分子机理。这为认识致病菌系统进化、

发现更好的诊断标记、药物靶标和候选疫苗组分提供了基础。Malen 等^[70]使用了无标记定量蛋白质组学方法,比较了结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 和毒性较弱菌株 H37Ra 的差异分泌蛋白质,旨在探索这些分泌蛋白质在宿主组织降解和诱发炎症方面的作用机制。为了解 *M. tuberculosis* 特有的生物合成和分泌过程,Wolfe^[71]对 *M. tuberculosis* 的细胞壁蛋白质进行了研究。Lini 等^[72]发现麻风分枝杆菌 *M. leprae* 小热激蛋白质 (sHsp18) 可防止限制性内切酶 *Sma* I 和 *Nde* I 热失活。Bell 等^[73]通过分离亚细胞组分并富集细胞膜组分,共鉴定了 *M. tuberculosis* 细胞壁、细胞膜、细胞浆、裂解物和分泌产物,共得到 1 051 个蛋白质。Rosenkrands 等^[74]采用代谢标记,对 *M. tuberculosis* 低氧胁迫蛋白质组(包括细胞组分和分泌蛋白质)进行了鉴定。Betts 等^[75]采用 2-DE 技术对 *M. tuberculosis* H37Rv 和 CDC 1551 蛋白质组进行了比较,共发现约有 1 750 个蛋白质有差异。Starck 等^[76]对 *M. tuberculosis* 在好氧和厌氧条件下的蛋白质组进行了比较,结果发现了 50 个差异蛋白质,且结核菌休眠诱导约 1% 基因表达。Cho 等^[77]于 2012 年对美国食品药品监督管理局标准品 PPD-S2 进行分析,揭示了已使用 60 多年的用于诊断潜伏结核病和体外免疫检测感染结核菌的纯化蛋白质衍生物 (Purified protein derivative, PPD) 的蛋白质组成。

假结核棒杆菌 *Corynebacterium pseudotuberculosis* 会引发山羊患干酪样淋巴结炎。Seyffert 等^[78]采用 2-DE 免疫印迹法对 *C. pseudotuberculosis* 的分泌蛋白质进行鉴定,共发现了 23 个免疫反应点,对其中 6 个蛋白质进行了鉴定,其中细菌复苏因子 (RpfB)、

NlpC/P60、假定外排蛋白质和表层蛋白质 (Spl A) 等 4 个蛋白质在其他细菌中已有报道,而假定分泌蛋白质 (spot2) 虽与已报道的其他放线菌蛋白质序列有一定的相似性,但目前还未被详细描述,另一个蛋白质 (spot6) 归属于金属蛋白质酶家族,广泛存在于绿脓假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*、梭状芽胞杆菌 *Clostridium* spp.、炭疽芽胞杆菌 *Bacillus anthracis* 和单核细胞增生利斯特菌 *Listeria monocytogenes* 等病原细菌中。疮疱丙酸杆菌 *Propionibacterium acnes* 可与人体皮肤共生,引发一系列皮肤病。Holland 等^[79]采用 2-DE 和 MALDI-MS 对 *P. acnes* (5 个物种,4 个不同类型) 的分泌蛋白质进行研究,共得到 239 个蛋白质。其中,菌株 266、KPA、P6、329 和 487 分别得到 64、63、54、30 和 28 个蛋白质点。进一步蛋白质鉴定发现其中有 20 个蛋白质在绝大多数菌株中都能被检测到,且这些蛋白质具有多样的生物降解活性,包括糖苷水解酶类、 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶、溶菌酶、溶血磷脂酶、三酰基甘油脂肪酶和其他蛋白酶。此外,他们还发现了其他分泌的因素,包括克里斯蒂-阿特金斯-蒙克-彼得森 (CAMP) 因子、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 和一些假定蛋白质是 *P. acnes* 特有蛋白质。

这些蛋白质组学在探索病原放线菌分子机制研究方面的尝试及其结果将为发病机理的研究和治疗靶点的寻找提供有益的线索,也为将来微生物疾病蛋白质组学研究提供经验。

2.6 天然产物筛查相关的蛋白质组学

具有抗癌和抗真菌等生理活性的多数抗生素是由非核糖体肽合成酶 (NRPSs) 和聚酮合

酶 (PKSs) 合成的^[80]。尽管基因组研究显示许多微生物具有合成这些非核糖体肽 (NRPS) 和聚酮类化合物 (PKS) 的巨大潜力, 但很难预测这些天然产物产生的可能性、培养条件, 也难于阐明其合成机理^[81]。Bumpus 等^[82]借助 NRPS 和 PKS 的片段大和它们共同辅因子的独特标记性离子, 首次提出次级代谢产物的蛋白质组学调查技术 (Proteomic Investigation of Secondary Metabolism, PrISM), 检测 NRPS 和 PKS 基因簇的表达情况。此方法在检测 *Bacillus* 和 *Streptomyces* 等已知 NRPS/PKS 系统时显示了良好的检测效果。当对环境中新分离到的 22 株未知活性菌株去筛查时, 发现了双效菌素生物合成基因簇, 同时还发现一个 NRPS 基因簇编码一个新的 7 残基脂肽。这种“蛋白质至上”策略可为研究者提供一个高效检测产生新型天然产物基因簇表达的方法。2012 年 Chen 等^[83]也采用改进的 PrISM 方法, 对 26 株未测序放线菌针对性地筛查 NRPSs 和 PKSs 的表达, 发现 6 株菌株中含有 10 个 NRPS/ PKS 基因簇。

PrISM 蛋白质组学方法可用于发现新的生物合成途径、探测新的生物合成转换、鉴定新的天然产物, 并可揭示基因簇和代谢产物的相关性。因此, 也可应用于其他微生物的蛋白质组学研究中。

3 展望

20 世纪生物学经历了由表及里、宏观到微观、描述性到定量分析的发展历程。人们对生物体的认识也逐步由表型深入到分子层次。生物体是一个非常复杂的系统, 唯有通过各种调控机理、合成途径和动态网络的整体研究才能全面系统地揭

示复杂的生命现象。蛋白质组学技术为放线菌的研究提供了新的思路和手段, 特别是其与多种质谱法、基因组学、转录组学、生物信息学等的融合可更好地应用于放线菌蛋白质研究中。

伴随着蛋白质组学基础理论和技术的不断进步和完善, 放线菌蛋白质组学已取得了巨大的进展, 但与其他生物如大肠杆菌、酵母、果蝇及小鼠相比, 放线菌蛋白质组学相对滞后。具体表现在: 1) 目前蛋白质组学研究的热点为定量蛋白质组学, 而在放线菌相关的研究中目前还多使用 2-DE 方法, 技术相对落后, 方法、策略上的创新较少。因此在较好的杂志中很少见到放线菌蛋白质组学研究的“身影”。2) 研究对象主要集中于放线菌模式菌株 *S. coelicolor*, 而对其他稀有放线菌的研究较少, 且不深入。但对一些生命禁区发现的放线菌特殊类群进行研究, 可能会进一步解释生物进化和生命起源。3) 研究不够系统, 重金属胁迫方面, 只研究了镍胁迫, 而其他重金属影响却没有相关研究。在重金属耐受机理探索方面也仅仅停留在蛋白质点的变化, 缺乏深入研究。4) 蛋白质的功能研究多数是基于生物信息学归类, 相应的功能验证实验较缺乏。5) 多数蛋白质组学研究是基于比较蛋白质组学、差异蛋白质组学、基因组、转录组和蛋白质组相结合而展开, 而翻译后修饰蛋白质组学报道几乎没有。Hesketh 等^[84]采用 2-DE 和 MALDI-TOF 技术检测到 2002 年公布的 *S. coelicolor* 所公布的理论蛋白质的 10%, 并发现平均每个基因均能检测到 1.2 个蛋白质, 意味着还存在着广泛地转录或翻译后修饰现象。质谱研究也证明在放线菌中存在 N-乙酰化、腺苷酰化、蛋白质酶解加工等现象。因此对放线菌

此方面的研究可能更好地揭示细胞周期调控和信号传导等众多生命活动的分子机制。

极端微生物 (Extremophiles) 一词最早由 Mcelory 于 1974 年提出, 是指生长在生命禁区极端环境中的微生物类群, 由于其特殊的生理生化和遗传特性, 引起了科学家的广泛关注。地球上存在着多种盐环境, 有自然形成的, 如死海、美国大盐湖等水域环境以及盐山、干盐湖、咸水滩等盐土环境; 还有人工形成的, 如盐场、盐池、盐腌制食品等。在这些盐环境中, 生活着多样性丰富的微生物, 它们行使着物质循环的功能。这些微生物在长期进化过程中, 形成了一些独特的细胞组分, 同时通过其特有的调控机理来适应盐环境, 从而成为盐生境中的主角。

目前包括本研究团队在内的我国很多学者已陆续对新疆、西藏、内蒙古、云南盐矿等地开展了嗜盐菌资源的研究^[85-88], 发现放线菌中的拟诺卡氏菌 *Nocardiopsis* 是高盐环境分布较为广泛的类群, 属于放线菌群落中的优势菌。我们推测 *Nocardiopsis* 对高盐特殊生境的适应性可能是长期自然选择的结果。国内外目前对 *Nocardiopsis* 的研究主要集中于新物种的分离鉴定、活性化合物的分离、物种基因组分析等, 但对其复杂环境的适应机理了解甚少。Li 等^[89]对 17 株 *Nocardiopsis* 菌株全基因组的比较为进一步从蛋白组水平认识其嗜盐分子机制提供了一定的数据支撑。对 *Nocardiopsis* 盐环境适应机制的蛋白质组学研究, 不仅为放线菌盐环境适应性研究打开大门, 而且可为利用这些微生物特殊的生理适应机制进行极端环境的改造提供线索。

放线菌最为熟知的特征是具有非凡的次级代谢产物编码能力。已知的微生物生物活性化合物中有超过一半以上都是由放线菌产生的。

多种来源于放线菌的包括抗生素在内的生理活性物质在保护人类健康、防治农业病虫害和保护环境等方面发挥着重要的作用。随着蛋白质组学技术的发展和放线菌蛋白质组学的深入研究, 放线菌中广泛存在的次级代谢产物基因资源还可能被继续挖掘和利用, 因而具有重要的意义。

REFERENCES

- [1] 中国遗传学会第九次全国会员代表大会暨学术研讨会[EB/OL]. [2013-12-14]. <http://cpfd.cnki.com.cn/Article/CPFDTOTAL-ZGYL201309001002.htm>.
- [2] Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 2002, 417(6885): 141-147.
- [3] Yague P, Garcia AR, Garcia MT, et al. Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: first compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. *PLoS ONE*, 2013, 3(8): e60665.
- [4] Hesketh AR, Chandra G, Shaw AD. Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 2002, 4(4): 917-932.
- [5] Lian W, Jayapal KP, Charaniya S, et al. Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *BMC Genomics*, 2008, 9: 56.
- [6] Ohnishi Y. Studies on regulation of secondary metabolism and morphogenesis of *Streptomyces* by DNA microarray analysis. NISR Research GRANT, 2007.
- [7] Gatewood ML, Bralley P, Weil MR, et al. RNA-Seq and RNA immunoprecipitation analyses of the transcriptome of *Streptomyces coelicolor* identify substrates for RNase III. *J Microbiol*, 2012,

- 194(9): 2228.
- [8] Im JH, Kim MG, Kim ES. Comparative transcriptome analysis for avermectin overproduction via *Streptomyces avermitilis* microarray system. *J Microbiol Biotech*, 2007, 17(3): 534–538.
- [9] Alloisio N, Queiroux C, Fournier P, et al. The *Frankia alni* symbiotic transcriptome. *Mol Plant Microbe Interact*, 2010, 23(5): 593–607.
- [10] Bickhart DM, Benson DR. Transcriptomes of *Frankia* sp. strain CcI3 in growth transitions. *BMC Microbiol*, 2011, 11: 192.
- [11] Marcellin E, Mercer TR, Cassani CL, et al. *Saccharopolyspora erythraea*'s genome is organised in high-order transcriptional regions mediated by targeted degradation at the metabolic switch. *BMC Genomics*, 2013, 14: 15.
- [12] Gu MZ. Gene knockout of *Saccharopolyspora erythraea* and function research on SACE_0069[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2013 (in Chinese).
古明珠. 红色糖多孢菌基因敲除和 SACE_0069 基因功能研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- [13] Li H. Genomics, Transcriptomics and Functions of G1nR in *S. erythraea*[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2011 (in Chinese).
李豪. 红色糖多孢菌基因组、转录组和 G1nR 功能研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2011.
- [14] Schwientek P. Genomics and transcriptomics of the industrial acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110[D]. Germany: Bielefeld University, 2012.
- [15] Ignatov D, Malakho S, Majorov K, et al. RNA-Seq analysis of *Mycobacterium avium* non-coding transcriptome. *PLoS ONE*, 2013, 8(9): e74209.
- [16] Chen HP, Zhu SH, Casabon I, et al. Genomic and transcriptomic studies of an RDX(Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine)-Degrading actinobacterium. *Appl Environ Microb*, 2012, 78(21): 7798.
- [17] Barreiro C, Nakunst D, Hüser AT, et al. Microarray studies reveal a 'differential response' to moderate or severe heat shock of the HrcA- and HspR-dependent systems in *Corynebacterium Glutamicum*. *Microbiology*, 2009, 155: 359–372.
- [18] Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1996, 13: 19–50.
- [19] He FC. "Life omics" of discovery age. *Science Chin*, 2013, 43(1): 1–15 (in Chinese).
贺福初. 大发现时代的“生命组学”. *中国科学*, 2013, 43(1): 1–15.
- [20] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000, 405: 837–846.
- [21] Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Human Genetik*, 1975, 26(3): 231–243.
- [22] O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975, 250(10): 4007–4021.
- [23] Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, et al. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(17): 9390–9395.
- [24] Molloy MP. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal Biochem*, 2000, 280 (1): 1–10.
- [25] Zhou G, Li H, DeCamp D, et al. 2D Differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1: 117–123.
- [26] ÜnlüM, Morgan ME, Minden JS, et al. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, 1997, 18: 2071–2077.
- [27] Fodor K, Nelson DO, Hartman MA, et al. Statistical challenges in the analysis of two-dimensional difference gel electrophoresis experiments using DeCyder. *Bioinformatics*, 2005, 21(19): 3733–3740.
- [28] Gygi SP, Rist B, Gerber SA, et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*, 1999,

- 17: 994–999.
- [29] McSheehy S, Yang W, Pannier F, et al. Speciation analysis of selenium in garlic by two-dimensional high-performance liquid chromatography with parallel inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 421: 147–153.
- [30] Momose T, Mure M, Iida T, et al. Method for separation of the unconjugates and conjugates of chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid by two-dimensional reverse-phase thin-layer chromatography with methyl β -cyclodextrin. *J Chromatogr A*, 1998, 811: 171–180.
- [31] Clarke NJ, Crow FW, Younkin S, et al. Analysis of *in vivo*-derived amyloid- β polypeptides by on-line two-dimensional chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2001, 298: 32–39.
- [32] Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1: 376–386.
- [33] Gerber SA, Rush J, Stemman O, et al. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 6940–6945.
- [34] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3: 1154–1169.
- [35] Jayapal KP, Philp RJ, Kok YJ, et al. Uncovering genes with divergent mRNA-protein dynamics in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS ONE*, 2008, 3: e2097.
- [36] Novotna J, Vohradsky J, Berndt P, et al. Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. *Mol Microbiol*, 2003, 48(5): 1289–1303.
- [37] Manteca A, Jung HR, Schwämmle V, et al. Quantitative proteome analysis of *Streptomyces coelicolor* nonsporulating liquid cultures demonstrates a complex differentiation process comparable to that occurring in sporulating solid cultures. *J Proteome Res*, 2010, 9(9): 4801–4811.
- [38] Manteca A, Sanchez J, Jung HR, et al. Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9: 1423–1436.
- [39] Jayapal KP, Sui S, Philp RJ, et al. Multitagging proteomic strategy to estimate protein turnover rates in dynamic systems. *J Proteome Res*, 2010, 9: 2087–2097.
- [40] Schmidta A, Haferburga G, Sineriz M, et al. Heavy metal resistance mechanisms in actinobacteria for survival in AMD contaminated soils. *Chem Erde-Geochem*, 2005, S1: 131–144.
- [41] Kim YJ, Moon MH, Song JY, et al. Acidic pH shock induces the expressions of a wide range of stress-response genes. *BMC Genomics*, 2008, 9: 604.
- [42] Gruber TM, Gross CA. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol*, 2003, 57: 441–466.
- [43] Wang C, Long X, Mao X, et al. SigN is responsible for differentiation and stress responses based on comparative proteomic analyses of *Streptomyces cescoelicolor* wild-type and sigN deletion strains. *Microbiol Res*, 2010, 165: 221–231.
- [44] Kinoshita S, Udaka S, Shimono M. Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol*, 2004, 50: 331–343.
- [45] Becker J, Wittmann C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels-*Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23: 631–640.
- [46] Kramer R, Morbach S. BetP of *Corynebacterium glutamicum*, a transporter with three different functions: betaine transport, osmosensing, and osmoregulation. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1658: 31–36.

- [47] Weinand M, Kramer R, Morbach S. Characterization of compatible solute transporter multiplicity in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 76: 701–708.
- [48] Fränzel B, Trötschel C, Rückert C, et al. Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to salt-stress conditions. Proteomics, 2010, 10: 445–457.
- [49] Fischer F, Wolters D, Rögner M, et al. Toward the complete membrane proteome: high coverage of integral membrane proteins through transmembrane peptide detection. Mol Cell Proteomics, 2006, 5: 444–453.
- [50] Washburn MP, Wolters D, Yates JR. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. Nat Biotechnol, 2001, 19: 242–247.
- [51] Mastrorunzio JE. Genomic and proteomic analyses of extracellular and symbiosis-related proteins in Frankia[D]. Storrs: University of Connecticut, 2009.
- [52] Mastrorunzio JE, Benson DR. Wild nodules can be broken: proteomics of Frankia in field-collected root nodules. Symbiosis, 2010, 50: 13–26.
- [53] Udway DW, Gontang EA, Jones AC, et al. Significant natural product biosynthetic potential of actinorhizal symbionts of the genus Frankia, as revealed by comparative genomic and proteomic analyses. Appl Environ Microb, 2011, 3617–3625.
- [54] Huang Y. Growth kinetics and characteristics of Frankia sp. Cc13 and proteomic analyses of nitrogen-fixing vesicles[D]. Amrica: University of Connecticut, 2011.
- [55] Wang YX. Study on the application of “shotgun” proteomic strategies in solving several bioengineering problems[D]. Tianjin: Tianjin University, 2006 (in Chinese).
王玉霞. “shotgun”蛋白质组学策略解决若干生物工程问题研究[D]. 天津: 天津大学, 2006.
- [56] Maréchala PL, Decottignies P, Marchanda CH, et al. Comparative proteomic analysis of the wild-type and the ppk mutant of *Streptomyces lividans* revealed the importance of storage lipids for antibiotic biosynthesis. Appl Environ Microb, 2013, 79(19): 5907–5917.
- [57] Tiffert Y, Wachtel MF, Fladerer C, et al. Proteomic analysis of the GlnR-mediated response to nitrogen limitation in *Streptomyces coelicolor* M145. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 89(4): 1149–1159.
- [58] Mason JC, Richards M, Zimmermann W, et al. Identification of extracellular proteins from actinomycetes responsible for the solubilisation of lignocellulose. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 28(3): 276–280.
- [59] Gallo G, Alduina R, Renzone G, et al. From microbial proteomics to synthetic biology: *Amycolatopsis balhimycina* case. J Chem Eng, 2012, 27: 217–222.
- [60] Haußmann U, Wolters DA, Fränzel B, et al. Physiological adaptation of the *Rhodococcus jostii* RHA1 membrane proteome to steroids as growth substrates. J Proteome Res, 2013, 12(3): 1188–1198.
- [61] Unell M, Abraham PE, Shah M, et al. Impact of phenolic substrate and growth temperature on the *Arthrobacter chlorophenolicus* proteome. J Proteome Res, 2009, 8(4): 1953–1964.
- [62] Adav SS, Ng CS, Arulmani M, et al. Quantitative iTRAQ secretome analysis of cellulolytic *Thermobifida fusca*. J Proteome Res, 2010, 9(6): 3016–3024.
- [63] Fränzel B, Poetsch A, Trötschel C, et al. Quantitative proteomic overview on the *Corynebacterium glutamicum*l-lysine producing strain DM1730. J Proteomics, 2010, 12(10): 2336–2353.
- [64] Li LY, Wada M, Yokota A. Cytoplasmic proteome reference map for a glutamic acid-producing *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067. Proteomics, 2007, 7(23): 4317–4322.
- [65] Barriuso IM, Schluesener D, Barreiro C, et al. Response of the cytoplasmic and membrane proteome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 to pH changes. BMC Microbiol, 2008, 8: 225.
- [66] Shen XL. Evolutional and functional researches on

- the *Streptomyces coelicolor* SRP pathway[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010 (in Chinese). 沈雪玲. 天蓝色链霉菌 SRP 途径进化与功能研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [67] Shi XM, Luo YM, Zhang GF, et al. Analysis of *Streptomyces coelicolor* inner proteome by multidimensional protein identification technology. *Chin J Biotech*, 2005, 21(5): 814–819 (in Chinese). 石宣明, 罗元明, 张贵锋, 等. 多维蛋白质鉴别技术分析天蓝色链霉菌膜内侧蛋白质组. *生物工程学报*, 2005, 21(5): 814–819.
- [68] Gamboa-Suasnavart RA, Valdez-Cruz NA, Cordova-Dávalos LE, et al. The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10: 110.
- [69] Bradshaw E, Saalbach G, McArthur M. Proteomic survey of the *Streptomyces coelicolor* nucleoid. *J Proteomics*, 2013, 83: 37–46.
- [70] Malen H, De Souza GA, Pathak S, et al. Comparison of membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and H37Ra strains. *BMC Microbiol*, 2011, 11: 18.
- [71] Wolfe LM, Mahaffey SB, Kruh NA, et al. Proteomic Definition of the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Proteome Res*, 2010, 9: 5816–5826.
- [72] Lini N, Rehna EA, Shiburaj S, et al. Functional characterization of a small heat shock protein from *Mycobacterium leprae*. *BMC Microbiol*, 2008, 8: 208.
- [73] Bell C, Smith GT, Sweredoski MJ, et al. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* proteome by liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics techniques: a comprehensive resource for tuberculosis research. *J Proteome Res*, 2012, 11(1): 119–130.
- [74] Rosenkrands I, Slayden RA, Crawford J, et al. Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. *J Microbiol*, 2002, 184(13): 3485–3491.
- [75] Betts JC, Dodson P, Quan S, et al. Comparison of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv with clinical isolate CDC 1551. *Microbiology*, 2000, 146(Pt 12): 3205–3216.
- [76] Starck J, Kallenius G, Marklund BI, et al. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* grown under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiology*, 2004, 150(11): 3821–3829.
- [77] Cho YS, Dobos KM, Prenni J, et al. Deciphering the proteome of the *in vivo* diagnostic reagent “purified protein derivative” from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics*, 2012, 12(7): 979–991.
- [78] Seyffert N, Pacheco LG, Silva WM, et al. Preliminary serological secretome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J Integrated Omics*, 2011, 2: 193–197.
- [79] Holland C, Mak TN, Arndt UZ, et al. Proteomic identification of secreted proteins of *Propionibacterium acnes*. *BMC Microbiol*, 2010, 10: 230.
- [80] Fischbach MA, Walsh CT. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem Rev*, 2006, 106: 3468–3496.
- [81] Zerikly M, Challis GL. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *Chembiochem*, 2009, 10: 625–633.
- [82] Bumpus SB, Evans BS, Thomas PM, et al. A proteomics approach to discovery of natural products and their biosynthetic pathways. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(10): 951–956.
- [83] Chen Y, Ntai I, Ju KS, et al. A proteomic survey of nonribosomal peptide and polyketide biosynthesis in Actinobacteria. *J Proteome Res*, 2012, 11(1): 85–94.
- [84] Hesketh AR, Chandra G, Shaw AD, et al. Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 2002, 46(4): 917–932.
- [85] Meklat A, Sabaou N, Zitouni A, et al. Isolation,

taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria. Appl Environ Microb, 2011, 77: 6710–6714.

- [86] Tian SZ. Studies on chemical constituents from secondary metabolites of two halophilic actinomycetes[D]. Kunming: Yunnan University, 2013 (in Chinese).

田守征. 两株嗜盐放线菌次生代谢产物的化学成分研究[D]. 昆明: 云南大学, 2013.

- [87] Zhang Y. The Actinobacterial and antibiotics biosynthetic genes diversity from alkali-removing canal and saline beaches in Tarim Basin[D]. Xinjiang Alar: Tarim University, 2013 (in Chinese).

张瑶. 塔里木盆地排碱渠和咸水滩放线菌及抗生

素合成基因多样性研究[D]. 新疆阿拉尔: 塔里木大学, 2013.

- [88] Zhou HJ. Baicheng salt mountains actinomycetes species diversity and its resistance to plant pathogenic bacteria screening[D]. Xinjiang Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2012 (in Chinese).

周慧杰. 拜城盐山放线菌物种多样性及其抗植物病原真菌的筛选[D]. 新疆乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2012.

- [89] Li HW, Zhi XY, Yao JC, et al. Comparative genomic analysis of the genus *Nocardiopsis* provides new insights into its genetic mechanisms of environmental adaptability. PLoS ONE, 2013, 8: e61528.

(本文责编 郝丽芳)



《生物工程学报》入选“2013年中国国际影响力优秀学术期刊”

据2013年12月30日《中国新闻出版报》消息,“2013中国最具国际影响力学术期刊”、“2013中国国际影响力优秀学术期刊”遴选工作已由中国学术期刊(光盘版)电子杂志社、清华大学图书馆、中国学术文献国际评价研究中心完成并发布,《生物工程学报》继入选“2012中国国际影响力优秀学术期刊”后,再次入选“2013中国国际影响力优秀学术期刊”。

“2013中国国际影响力优秀学术期刊”的遴选目的旨在从国际角度全面揭示,力求客观、全面、系统地反映我国学术期刊的学术影响力。评价中心采用的“期刊国际影响力指数”分科技、人文社科两个序列对我国学术期刊进行了排序,由70位期刊评价研究专家评审,根据指数高低分别按TOP5%选出“2013中国最具国际影响力学术期刊”,按TOP5%–10%选出“2013中国国际影响力优秀学术期刊”,科技类各175种,社科类各56种。

相关链接: <http://piccache.cnki.net/kns/images2009/other/gonggao/2013CAJZPDF/01.pdf>

