

宏蛋白质组学研究进展及应用

吴重德^{1,2*}, 黄钧¹, 周荣清¹

1(四川大学 轻纺与食品学院, 皮革化学与工程教育部重点实验室, 四川 成都, 610065)

2(酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡, 643000)

摘 要 宏蛋白质组学是近几年出现的一种应用蛋白质组学方法对环境微生态系统进行研究的一种新技术,已在环境生态领域研究中展示出了强大的功能。文中综述了宏蛋白质组学的研究技术及策略、介绍了其在污水生物处理、土壤及发酵食品微生物群落结构分析中的应用,并对其在环境生态领域中的研究进行了展望。

关键词 宏蛋白质组学; 二维电泳; 环境微生物; 微生物群落结构

人类基因组计划的完成,标志着生命科学研究进入了后基因组时代。然而随着对基因组研究的不断深入,人们认识到单纯依靠基因组信息并不能完全揭示生命活动规律。因为只有蛋白质才是生命活动的主要体现者,而这些蛋白质是基因经转录、翻译后产生的。即使同一生物,在不同环境下所表达的蛋白质都有可能不同。为此 WASINGER 等首次提出了“蛋白质组”(Proteome)的概念,即一个基因组所表达的全部蛋白质,也可以定义为细胞、组织或机体所表达的全部蛋白质^[1]。其主要研究内容包括表达蛋白质组学(研究特定细胞、组织或器官中蛋白质种类和数量的变化,以及不同时期的表达谱的改变等);结构蛋白质组学(揭示生物大分子的三维结构和功能的关系)和功能蛋白质组学(蛋白质相互作用关系及调控网络以及蛋白质的转录后修饰等)^[2]。2004年,RODRÍGUEZ-VALERA 提出了宏蛋白质组(Metaproteome)的概念,即环境中所有生物的蛋白质组的总和^[3]。本文主要介绍了宏蛋白质组学的研究现状及应用,并对其研究及发展趋势进行了展望。

1 宏蛋白质组学及研究方法

自从蛋白质组学的概念提出以后,关于蛋白质组学的研究就如火如荼地开展起来了,并且发展迅速。就微生物而言,主要包括微生物蛋白质组参考图谱的建立^[4-6]、胁迫条件下蛋白质组学分析、基因工程菌

的蛋白质组学分析等^[7-9]。但就其研究对象而言,主要集中在纯培养或单一培养的微生物、组织或细胞,样品来源清楚,基因组背景单一。然而面对复杂环境,由于样品组成复杂,缺乏完整的基因组背景,采用宏蛋白质组学的方法对其中的所有蛋白质进行研究就显得尤为重要。

宏蛋白质组的研究方法与传统的蛋白质组研究方法相似,其流程一般包括蛋白质样品制备、蛋白分离和蛋白鉴定等。目前的研究策略主要有2种,一种采用凝胶染色为基础结合质谱(MS)分析(如2D电泳),另一种是多重色谱分离与MS联用技术进行宏蛋白质组分析(图1)。

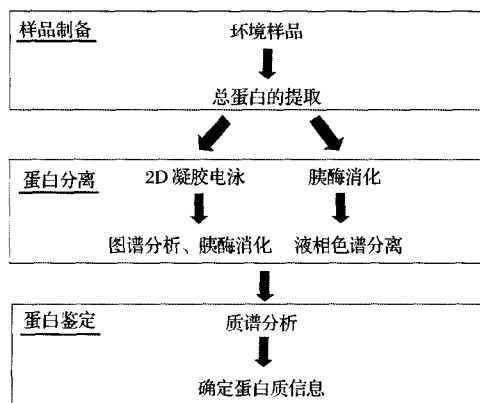


图1 宏蛋白质组学研究策略

Fig. 1 Research strategies for metaproteomics

早期的蛋白质组学研究通常采用二维凝胶电泳结合质谱技术,能对复杂蛋白质混合样品进行定性和定量分析。但是该技术对部分低丰度蛋白、极端等电点的蛋白以及一些疏水性蛋白分离效果不佳。近年来,随着多重色谱分离与质谱联用技术的发展,色谱

第一作者:博士,副教授(本文通讯作者,E-mail:cdwu@scu.edu.cn)。

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 31301546);中央高校基本科研业务费专项基金(No. SCU2015D008);酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金(No. NJ2014-12)资助

收稿日期:2015-09-05,改回日期:2015-11-12

分离法在蛋白质组学分析中应用日益广泛。与传统 2D 电泳相比,色谱法虽然没有 2D 电泳的高分辨率和直观,但分离效果要优于 2D 电泳,可以得到十分精确的蛋白质信息,因此,色谱法有望在宏蛋白质组学研究中获得更为广泛的应用^[2]。

样品的制备是蛋白质组学研究中的关键步骤,其制备的优劣往往影响后续研究的成败。对于宏蛋白质组学而言,由于研究对象的复杂性,其中的微生物群落有极大差别,同时纯化一些具有重要功能的低丰度蛋白也是宏蛋白质组学研究的关键。因此,目前还没有一种提取宏蛋白的通用方法。JENSEN 等^[10]对活性污泥中宏蛋白质组的提取方法进行了优化,分别考察了磁珠法、反复冻融法、超声法以及试剂盒的方法对蛋白提取的影响,通过比较蛋白浓度、蛋白数量、蛋白分子质量分布以及重现性等,建立了活性污泥宏蛋白提取的最适方法。CHOUREY 等^[11]建立了针对土壤样品的 SDS-TCA 法,即先用热辅助的 SDS 法裂解土壤样品,接着用 TCA 对蛋白样品进行沉淀,然后用液相色谱质谱法进行蛋白质组学研究。因此,在进行宏蛋白质组学研究中需要根据研究对象的特性,选取合适的蛋白提取方法。

宏蛋白组学中蛋白的分离与普通蛋白质组学的研究是一致的,常用的方法主要是基于二维电泳和色谱技术。二维电泳可以很直观的呈现整个宏蛋白质组中特定蛋白质的变化。分离的不同蛋白点,经图谱分析和蛋白鉴定,构建蛋白参考图谱,为后续比较蛋

白组及功能蛋白组的分析奠定基础。色谱法通常采用液相分离法,相对于二维电泳技术,色谱技术操作方便,分离效果更优,但是分辨率和直观性较差。

蛋白的鉴定常用质谱方法进行,常用的方法有串联质谱(MS/MS)、基质辅助激光解析时间-飞行质谱(MALDI-TOF/MS)、四级杆-飞行时间串联质谱(Q-TOF-MS)等。KAN 等^[12]利用宏蛋白质组学的方法对 Chesapeake 海湾海水中的微生物群落进行了研究,分别利用 MALDI-TOF 和 MS/MS 对相关蛋白进行了鉴定,研究结果表明,采用 MALDI-MS 技术鉴定蛋白匹配度较低,不合适对环境中的蛋白质样品进行分析。此外,在蛋白鉴定中,数据库的选择也很重要,可以根据特定的研究对象选择合适的数据库进行搜索,数据库中蛋白质来源相似度越高,则蛋白质鉴定的准确性也越高,特别是一些未培养的微生物,由于缺少相关蛋白的信息,对宏蛋白质的鉴定构成严重挑战。因此,进一步丰富宏蛋白质组数据库是宏蛋白质组学研究中亟待解决的问题。

2 宏蛋白质组学研究举例

近年来,随着环境微生物基因组数据库的逐渐完善,宏蛋白质组学在环境生态系统研究中的应用也日益广泛,主要集中在土壤生态系统、废水生物处理、发酵食品等环境微生物方面(表 1),这也为全面认识环境系统中微生物的功能奠定了基础。

表 1 宏蛋白质组学在环境生态系统中的应用
Table 1 Applications of metaproteomics in environmental ecology

研究对象	研究方法	获得和鉴定的蛋白数量	参考文献
污水生物处理			
具有生物除磷效果的活性污泥	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS	638/46	[13]
具有生物除磷效果的活性污泥	2D-LC, ESI-MS/MS	5029/2378	[14]
降解双酚 A 和壬基酚的活性污泥	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS	588/78	[15]
处理含镉污水活性污泥	2D-PAGE, MALDI-TOF-MS/MS	500/109	[16]
土壤生态系统			
落叶林土壤	Nano-LC, MS/MS	~ ^a /50	[17]
2,4-二氯苯氧基乙酸污染的土壤	2D-PAGE, LC-ESI-MS	~/26	[18]
苯污染的土壤	2D-PAGE, LC-ESI-MS	~/240	[19]
草地土壤	2Dnano-LC-MS/MS	~/>500	[11]
发酵食品			
黄酒麦曲	2D-PAGE, MALDI-TOF/TOF-MS	145/124	[20]
汾酒大曲	2D-PAGE	-	[21]
黑曲霉分泌蛋白	2D-PAGE, nano-LC-MS/MS	~/51	[22]
酱油曲	2D-PAGE, MALDI-TOF/TOF-MS	~/16	[23]

注:a,未见报道。

2.1 宏蛋白质组学在污水生物处理中的应用

宏蛋白质组学在污水生物处理方面的应用主要

包括功能性蛋白质/酶的鉴定、污染物生物降解机制的解析及废水生物处理系统关键代谢途径的重构

等^[24]。2004年,WILME等^[25]应用2D-PAGE技术分析了实验室水平的具有生物除磷功能的活性污泥微生态系统,并首次提出了宏蛋白质组学的概念。应用四级杆-飞行时间质谱对相关蛋白进行了鉴定,研究发现活性污泥中具有除磷功能的优势微生物为Rhodocyclus等未培养微生物。在随后的研究中WILMES等^[13]继续利用宏蛋白质组学的方法,阐明了微生物的更替对增强的生物除磷(EBPR)的重要作用。在选定的111个蛋白点中鉴定了46个蛋白,并对这些蛋白质的功能进行了解析,研究发现,这些蛋白质主要与参与糖原的合成与分解、三羧酸循环、脂肪酸的合成、磷的转运以及胁迫响应有关,研究结果为聚磷菌的代谢活性及污水中物质转换提供了直接证据,同时为污泥除磷机制的研究奠定了基础。COLLADO等^[15]利用宏蛋白质组学的方法研究了活性污泥中双酚A和壬基酚的降解机制。对苯二酚双加氧酶(HQDO)是双酚A和壬基酚生物降解中的一种特有标记物(酶),可由鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp. TTNP3)代谢产生。作者分别构建了纯化的HQDO和纯培养的TTNP3的二维电泳参考图谱,然后将TTNP3按照不同的梯度分别接种到活性污泥样品中,建立活性污泥的宏蛋白质图谱。然后将纯培养的电泳参考图谱和活性污泥的宏蛋白质图谱进行比对,在宏蛋白组图谱上找到了对应的HQDO的亚基HqdB。可以通过检测HqdB了解废水处理系统中双酚A和壬基酚的降解情况。因此,将宏蛋白质组学应用于污水生物处理领域,通过分析活性污泥中蛋白质,可以提供大量的关于微生物群落结构的信息,为污水生物处理的优化控制及工艺技术研究提供坚实的理论基础。

2.2 宏蛋白质组学在土壤群落分析中的应用

土壤微生物在土壤物质降解、循环与转化中发挥着重要作用,而关于土壤微生物群落结构多样性及功能的研究日益受到重视。土壤宏蛋白质组学为揭示土壤微生物功能、代谢与环境相互作用等提供了新的方法和研究视角^[26]。然而由于土壤样品的特殊性,如组分复杂、蛋白质含量低、干扰物质多(酚类物质、腐殖酸等)等,使样品的制备难度加大,相关的宏蛋白质组学研究较其他生态系统少。许多研究者对各种土壤样品蛋白质提取的方法进行了优化,然而还没有一种统一的提取土壤样品宏蛋白的通用方法。BENNDORF等^[18]报道了一种从土壤中提取宏蛋白的方法,样品先经0.1 mol/L NaOH处理,提取其中的

腐殖酸和蛋白质,然后进一步用酚抽提,除去腐殖酸等,然后进行了蛋白质组学研究,同时该方法还成功应用于分析被氯苯污染的地下水样品,但是经过预处理后的样品蛋白得率较低,需要经过预培养才能获得足够分析的蛋白浓度。这些研究显示了宏蛋白质组学研究在揭示生态环境功能中具有重要作用。SINGLETON等^[27]采用宏蛋白质组学的方法比较了镉污染的土壤中微生物生物量与蛋白质含量的关系,结果表明,被镉污染的土壤,其中的总蛋白的含量显著低于未被污染的土壤样品,利用SDS-PAGE分析表明,被镉污染的土壤中存在小分子质量的蛋白(如金属硫蛋白)表达。研究结果为土壤污染检测、生态修复等奠定了方法学基础。SCHULZE等^[17]研究了不同环境溶解态有机物(DOM, dissolved organic matter)中蛋白质的组成,研究发现,来自湖泊的蛋白质有78%来自于细菌,而森林土壤中只有不到50%来自于细菌。分析落叶林土壤微生物发现,随着土壤取样深度的增加和土壤有机碳含量的降低,鉴定的蛋白数量从75种降低到28种。同时研究不同季节的森林土壤宏蛋白组发现冬天的土壤中鉴定的蛋白比夏天多50%。研究还首次将宏蛋白组学用于生态元素循环上,希望找到与生态循环有关的胞外蛋白。将云杉的树皮进行环带切除以阻止碳元素运输到根际,结果根际土壤的蛋白组成发生明显变化,蛋白数量减少了50%。此外,在森林土壤中还分离到了纤维素酶和漆酶,表明土壤有机物的分解发生在土壤颗粒表面的生物膜上^[17]。

2.3 宏蛋白质组学在发酵食品微生物群落结构分析中的应用

发酵食品体系作为一个独特的微生态系统,其中的微生物群落结构复杂、功能多样,与发酵食品的品质和风味有直接的关系。深入剖析发酵食品中的微生物群落结构为进一步改进食品发酵工艺、探究食品风味形成机理提供了理论基础。然而由于食品样品的复杂性,利用宏蛋白质组学技术解析其群落结构的研究才刚刚起步。张武斌等^[21]对汾酒大曲宏蛋白质组的制备与双向电泳的条件进行了研究,分别对样品制备方法、蛋白溶解方法、上样量等进行了优化,建立了汾酒大曲宏蛋白质组的双向电泳体系。孔令琼等^[28]以黄酒麦曲浸提物为研究对象,分别比较了TCA-丙酮沉淀法、丙酮沉淀法、2D Clean-up试剂盒法对麦曲宏蛋白组提取的影响,初步建立了适用于黄酒麦曲提取液的宏蛋白质组制备方法,获得了较为理想

的二维电泳图谱。在此基础上,ZHANG 等^[20]通过双向电泳技术结合串联质谱分析对绍兴黄酒生麦曲进行了宏蛋白质组学研究,共成功鉴定蛋白 144 个,其中 18 个蛋白点来源于米曲霉、黑曲霉、烟曲霉、米根霉、木霉、产黄青霉、蜡样芽孢杆菌等 14 种微生物所分泌的 16 种蛋白,通过对蛋白功能进行了分类,共包括水解酶类、糖代谢酶、氧化还原酶、抗性蛋白、贮藏蛋白以及功能未知的假定蛋白 6 类。研究结果为深入了解麦曲功能及黄酒酿造机制奠定了基础。因此,随着宏蛋白质组学技术在食品发酵领域的应用日益广泛,将会更加全面认识微生物群落结构及其酿造机理。

3 宏蛋白质组学研究展望

蛋白质是生命活动的主要体现者,蛋白质组学的研究能够有效监测环境系统中蛋白的组成、数量及相互作用等。随着蛋白质组学研究中样品制备方法及高通量测序技术的进步,宏蛋白质组学必将在将来的研究中发挥更加重要的作用。近年来,随着宏组学(宏基因组、宏转录组、宏蛋白组、宏代谢组)的发展,宏蛋白质组学和另外几种宏组技术联系将越来越紧密。宏基因组可以提供环境中总 DNA 的信息及微生物群落的组成;宏转录组可以用来实时检测基因的表达信息,它们都可以提供微生物的潜在功能信息;宏代谢组则可以提供环境中代谢产物的总体信息。通过整合宏基因组、宏转录组、宏蛋白组及宏代谢组的研究结果,可以在全局的角度从不同水平对环境微生物群落结构及功能进行解析,获得新的功能性微生物及功能性代谢产物资源,为环境生态领域的进一步发展提供新的研究动力。

参 考 文 献

- [1] WASINGER V C, CORDWELL S, CERPA-POLJAK ANNE, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes; *Mycoplasma genitalium* [J]. Electrophoresis, 1995, 16(7):1 090-1 094.
- [2] 于仁涛, 高培基, 韩黎, 等. 宏蛋白质组学研究策略及应用 [J]. 生物工程学报, 2009, 25(7):961-967.
- [3] RODRÍGUEZ-VALERA F. Environmental genomics, the big picture [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 231(2):153-158.
- [4] MAO S, LUO Y, ZHANG T, et al. Proteome reference map and comparative proteomic analysis between a wild type *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 and its mutant with enhanced butanol tolerance and butanol yield [J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(6):3 046-3 061.
- [5] MAJUMDER A, SULTAN A, JERSIE-CHRISTENSEN R R, et al. Proteome reference map of *Lactobacillus acidophilus* NCFM and quantitative proteomics towards understanding the prebiotic action of lactitol [J]. Proteomics, 2011, 11(17):3470-3481.
- [6] DE LA LUZ MOHEDANO M, RUSSO P, DE LOS RÍOS V, et al. A partial proteome reference map of the wine lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 [J]. Open Biology, 2014, 4(2):130-154.
- [7] WANG X, QIN J, WANG L, et al. A comparative proteomic analysis of *Bacillus coagulans* in response to lactate stress during the production of L-lactic acid [J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(12):2 545-2 549.
- [8] JIN J, QIN Q, GUO H, et al. Effect of pre-stressing on the acid-stress response in *Bifidobacterium* revealed using proteomic and physiological approaches [J]. PloS One, 2015, 10(2):e0117702.
- [9] OLGUÍN N, CHAMPOMIER-VERGÈS M, ANGLADE P, et al. Transcriptomic and proteomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 response to ethanol shock [J]. Food Microbiology, 2015, 51(10):87-95.
- [10] HANSEN S H, STENSALLE A, NIELSEN P H, et al. Metaproteomics: Evaluation of protein extraction from activated sludge [J]. Proteomics, 2014, 14(21/22):2 535-2 539.
- [11] CHOUREY K, JANSSON J, VERBERKMOES N, et al. Direct cellular lysis/protein extraction protocol for soil metaproteomics [J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(12):6 615-6 622.
- [12] KAN J, HANSON T E, GINTER J M, et al. Metaproteomic analysis of Chesapeake Bay microbial communities [J]. Saline Systems, 2005, 1:7.
- [13] WILMES P, WEXLER M, BOND P L. Metaproteomics provides functional insight into activated sludge wastewater treatment [J]. PloS One, 2008, 3(3):e1778.
- [14] WILMES P, ANDERSSON A F, LEFSRUD M G, et al. Community proteogenomics highlights microbial strain-variant protein expression within activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal [J]. The ISME Journal, 2008, 2(8):853-864.
- [15] COLLADO N, BUTTIGLIERI G, KOLVENBACH B A, et al. Exploring the potential of applying proteomics for tracking bisphenol A and nonylphenol degradation in activated sludge [J]. Chemosphere, 2013, 90(8):2 309-

- 2 314.
- [16] LACERDA C M, CHOE L H, REARDON K F. Metaproteomic analysis of a bacterial community response to cadmium exposure [J]. *Journal of Proteome Research*, 2007, 6(3):1 145 - 1 152.
- [17] SCHULZE W X, GLEIXNER G, KAISER K, et al. A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and of soil particles [J]. *Oecologia*, 2005, 142(3):335 - 343.
- [18] BENNDORF D, BALCKE G U, HARMS H, et al. Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater [J]. *The ISME journal*, 2007, 1(5):224 - 234.
- [19] BENNDORF D, VOGT C, JEHLICH N, et al. Improving protein extraction and separation methods for investigating the metaproteome of anaerobic benzene communities within sediments [J]. *Biodegradation*, 2009, 20(6):737 - 750.
- [20] ZHANG B, KONG L Q, CAO Y, et al. Metaproteomic characterisation of a Shaoxing rice wine "wheat Qu" extract [J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(1):387 - 391.
- [21] 张武斌, 张秀红, 段江燕. 汾酒大曲宏蛋白质组的制备与双向电泳技术的建立 [J]. *生物学杂志*, 2013, 30(6):50 - 53.
- [22] MEDINA M L, HAYNES P A, BRECI L, et al. Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus* [J]. *Proteomics*, 2005, 5(12):3 153 - 3 161.
- [23] LIANG Y, PAN L, LIN Y. Analysis of extracellular proteins of *Aspergillus oryzae* grown on soy sauce koji [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(1):192 - 195.
- [24] 陈世霞, 王雷, 韩志英. 宏蛋白质组学技术在废水生物处理工艺研究领域中的应用 [J]. *应用生态学报*, 2014, 25(10):3 056 - 3 066.
- [25] WILMES P, BOND P L. The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms [J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(9):911 - 920.
- [26] 王小丽, 叶俊, 黄丹枫. 土壤宏蛋白质组学蛋白质提取方法及其应用 [J]. *应用与环境生物学报*, 2012, 18:691 - 696.
- [27] SINGLETON I, MERRINGTON G, COLVAN S, et al. The potential of soil protein-based methods to indicate metal contamination [J]. *Applied Soil Ecology*, 2003, 23(1):25 - 32.
- [28] 孔令琼, 管政兵, 张波, 等. 黄酒麦曲浸提液中宏蛋白质组的制备 [J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(3):7 - 11.

Recent advance and application of metaproteomics

WU Chong-de^{1,2*}, HUANG Jun¹, ZHOU Rong-qing¹

1(College of Light Industry, Textile & Food Engineering, and Key Laboratory of Leather Chemistry and Engineering, Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610065, China) 2 (Liquor Making Biological Technology and Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000, China)

ABSTRACT Metaproteomics is a newly emerging technology to investigate the micro-ecosystem in environmental system by proteomic approach, and it has shown powerful functions in the fields of environmental ecosystem. This review summarized the research strategies of metaproteomics and applications in wastewater biotreatment, soil and fermented food. It demonstrated the directions for future research in the field of microbial ecosystems.

Key words metaproteomics; two-dimensional electrophoresis; environmental microbe; microbial community structure