

元蛋白质组学在土壤微生物生态功能研究中的应用*

刘文干¹ 吴云¹ 崔中利¹ 何园球² 林先贵² 曹慧^{1†}

(1 南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

(2 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008)

摘要 元蛋白质组学是近年出现的一种基于蛋白质组学对微生物群落进行研究的新技术, 其定义为对特定环境的所有微生物蛋白质进行的即时的、大规模的分析。虽然目前对元蛋白质组学的研究还处在起步阶段, 但是它已在特定环境的微生物研究中显现出其强大的功能。本文通过对目前元蛋白质组学常用研究策略和技术进行比较, 概述土壤元蛋白质组的提取、纯化、分离与功能鉴定等方面的研究现状, 并对土壤元蛋白质组学研究的意义进行了展望。土壤元蛋白质组学的发展深受提取方法的影响, 现有的方法很难提供既可成功分离又易于鉴定的蛋白质, 而土壤蛋白鉴定的主要问题在于土壤蛋白质含量低, 通过质谱分析对蛋白质鉴定时缺乏足够的序列-数据库信息。一旦这些问题得以解决, 土壤元蛋白质组学便能在土壤微生物生态功能研究方面得到更加广泛和深入的应用。

关键词 元蛋白质组学; 环境微生物; 微生物群落; 功能性生物指示物; 稳定同位素探针连接蛋白

中图分类号 S154.39 **文献标识码** A

土壤是一个复杂的动态系统, 土壤中时刻发生着物理、化学、生物组分的相互作用。微生物在土壤物质的降解、转运以及元素循环(碳元素、氮元素、磷元素等)中发挥重要的作用。然而, 传统的研究主要是以核酸基础上微生物群落结构多样性分析, 直至最近几年才掀起对土壤微生物群落结构和生态功能耦合关系的研究热潮。蛋白质是生理功能的执行者和生命活动的直接体现者, 对微生物群落结构和功能的研究归根到底就是要对微生物的蛋白质进行研究, 而传统的蛋白研究方法已经无法满足后基因组时代的要求, 2004 年, Rodriguez-Valera 提出了元蛋白质组 (Metaproteome)^[1], 元蛋白质组学的主要特征是能够提供群落微生物蛋白和功能多样性间的信息^[2]。本文主要概述了土壤蛋白提取、纯化、分离与鉴定, 分析了土壤元蛋白质组学存在的问题, 并对研究前景进行了展望, 以期引起我国环境微生物学研究者的关注。

1 元蛋白质组学的产生背景

2001 年 2 月, 人类基因组框架图在《Nature》上发表, 这是人类遗传研究的一个里程碑; 同期登载了

一条关于人类蛋白质组织 (Human Proteome Organization, HUPO) 成立的消息, 标题为“*And now for the Proteome*”^[3]。《Science》将蛋白质组学列为 2002 年六大研究热点之一, 其“热度”仅次于干细胞研究^[4]。2003 年 3 月, 《Nature》上的一系列研究更是将蛋白质组学推到了令人瞩目的地位。但是, 这些蛋白质组学的研究主要集中在医学和药学等学科, 对一些模式生物进行研究, 在微观生命领域中的研究较少^[5]。近年来, 随着分子生物学技术的发展, 微生物在自然界中的重要作用日趋凸显, 环境中来源于微生物的酶蛋白是生态系统元素循环主要推动者^[1]。

在过去 20 多年中, 基于纯培养技术与分子生态学技术的研究发现: 人们能够获得纯培养的微生物还不足自然界微生物总数的 1%, 自然界的绝大多数微生物未被发现^[6]。宏基因组学的出现弥补了这种不足, 它是直接提取环境样品中的总 DNA 并对其进行分析的技术, 宏基因组学的研究表明微生物群落中存在着高度的遗传和功能多样性^[7-10]。以 DNA 为基础的分子生物学技术使得微生物的群落结构在基因水平上得到研究, 并鉴定出参与特定代谢途径的微生物功能基因数量和种类; 以 RNA 为基

* 国家自然科学基金项目(40871125)和土壤与农业可持续发展国家重点实验室项目(0812000063)资助

† 通讯作者, E-mail: hcao@njau.edu.cn, Tel: 025-84396753

作者简介: 刘文干(1987—), 男, 硕士研究生, 主要从事微生物分子生态学研究。E-mail: ganwenliu@163.com

收稿日期: 2011-12-01; 收到修改稿日期: 2012-05-10

础的方法使得这种研究在转录的背景下得以分析。宏转录组学(一个群落中所有微生物 RNA 的集合)的出现构成了揭示土壤微生物功能的第二阶段;但是这些以核酸为基础的研究不能从蛋白质表达水平对土壤蛋白质的结构和功能进行阐述,而元蛋白质组学正是对群落中的所有微生物蛋白进行研究并能提供与代谢途径相关的实际功能,这较功能基因组学和核糖核苷酸的研究更直接。

2 元蛋白质组学的研究现状

虽然元蛋白质组学的研究起步较晚,但是随着越来越多的蛋白质序列被陆续测定公开,极大的丰富了蛋白质数据库,各种蛋白质分离和鉴定技术的发展,为元蛋白质组学研究提供了基础,促进了元蛋白质组学的发展。在元蛋白质组学概念正式提出之前,已有学者运用这种策略进行过研究。如1999年,南非的 Ehlers 等直接提取活性污泥中的总蛋白质,并运用 SDS-PAGE 技术对其 34 周的运行状况进行监测^[11]。结果发现活性污泥处理系统中总蛋白质功能结构变化很小,表明在实验过程中微生物群落结构较为稳定。随着元蛋白质组学概念正式提出,掀起了对元蛋白质组学研究的热潮。2004年, Wilmes 和 Bond^[12]以具有生物除磷作用的活性污泥为研究对象,研究了一个完整的废水除磷过程中活性污泥的总蛋白质的变化。研究者分别研究了有氧处理阶段、厌氧处理阶段以及厌氧处理和好氧处理交替进行阶段的微生物蛋白表达情况,研究发现:好氧处理和厌氧处理过程中的元蛋白质组存在差异,在单一处理的污泥系统中,蛋白质表达较为稳定,而在好氧和厌氧交替的污泥中蛋白质表达相对不稳定。

2005年, Kan 等^[13]将以 2D 电泳为基础的元蛋白质组学研究与宏基因组初步结合,对 Chesapeake 海湾海水微生物群落进行研究。研究者利用滤膜收集了不同水域(上、中、下)微生物群落,通过 2D 电泳发现该海湾不同水域蛋白质组存在较大差异。通过对有表达差异的 7 种蛋白质谱分析,并与已知数据库进行比对,鉴定出 4 种新的蛋白质。他们用 DGGE 技术对所采集样品的微生态结构进行分析,结果表明元蛋白质组的差异可能是由于不同水域的微生态结构不同造成的。同年, Ram 等以美国 Richmond 铁矿酸性水表面的生物膜为研究对象,成功地将元蛋白质组学和宏基因组学结合起来对极端环境微生物进行研究^[14],先对同一研究对象的

宏基因组进行了研究,得出大量该生物膜的核酸序列数据,并以此建立了一个包含 12 148 种元蛋白质数据库,然后用元蛋白质组学的研究表明该生物膜主要由 *Leptospirillum* group II 组成,此外还包含 *Leptospirillum* group III、*Sulfobacillus* 和与 *Ferroplasma acidarmanus* 及与“*G-plasma*”有关的古细菌,对比从质谱方法中得到的肽段,最后有 2 033 种蛋白质得到了鉴定。发现其中 1 362 种蛋白由 *Leptospirillum* 类群 II 产生,另外 270 种蛋白来自 *Leptospirillum* 类群 III,84 种来自 *Ferroplasma* 类群 I,90 种来自 *Ferroplasma* 类群 II,122 种来自 *G-plasma*,此外还有大量的蛋白不能确定其功能,可能是新基因产物。例如,在胞外组分中含有 52% 的特殊蛋白,其中 14% 为新蛋白。在这些胞外蛋白中,有 3 种最保守但功能未知的蛋白,其中一种来自 *Leptospirillum* 类群 II,被鉴定为与铁氧化有关的细胞色素(Cyt579),因此与 AMD 酸矿形成有关。同年, Schulze 等分析了来自 4 种不同环境下(森林湖泊、荒置落叶林土壤、管理的水杉林土壤、云杉林下酸性土壤)溶解态有机物中的各种蛋白质,希望找到与生态循环有关的胞外蛋白^[15]。研究发现分离于森林湖泊的蛋白质有 78% 源于细菌,而分离于森林土壤中的蛋白质只有 50% 源于细菌,这可能与森林土壤中的微生物多样性较高有关。在森林采集的水样中,来自植物,真菌和脊椎动物的蛋白质含量约是湖水样品中的 2 倍。在冬天,有匹配记录的蛋白质数量较夏天多 50%,当将所有发现的已知功能的蛋白质进行比较时发现湖水和森林样品中的蛋白质组成不同。Schulze 等的工作是首次将元蛋白质组学运用于元素生物地球化学循环研究上,显示了元蛋白质组学在揭示生态功能上的强大作用。

2009年, Chen 等^[16]通过逐级提取法对不同农田土壤蛋白质进行提取、纯化并获得了适用于 1D 和 2D 凝胶电泳图谱的蛋白质,该方法是根据不同组分的蛋白质溶解度差异,首先将含量高的易溶蛋白去除,降低样品蛋白的复杂性,从而得到许多常规方法难以获得的蛋白质,因此逐级提取法是获得土壤蛋白的适宜方法。同年 Erin 等^[17]对比从土壤中直接提取蛋白质方法和利用 DGC-EXT 方法提取,结果表明,密度梯度离心无论在土壤蛋白质提取率上,还是在 SDS-PAGE 条带分辨率上,较直接提取方法高,这提供了一种利用离心力有目的分离复杂样品或杂质的可能。

表 1 概括了近几年来主要的一些元蛋白质组学研究进展情况。

3 元蛋白质组学的研究策略

壤蛋白质样品的提取和纯化;(2)蛋白质的分离;(3)蛋白质的鉴定。图 1 概括了元蛋白质组学常用的两种分析策略分别基于 2D-PAGE 和液相色谱^[21]。

元蛋白质组学的研究策略一般包括:(1)土

表 1 微生物的多样性及元蛋白质组研究筛选的蛋白

Table 1 The diversity of microorganisms and the proteins scalped from metaproteome studies

微生物生态系统 Microbial ecosystem	微生物物种数量(个) Microbial species number (Ind.)	估计表达蛋白数量(个) Estimated number of expressing protein (Ind.)
马尾藻海 ^[9] Sargasso Sea	1 824 ~ 47 733	$5.5 \times 10^6 \sim 1.4 \times 10^8$
AMD 生物膜 ^[14] AMD biofilm	6	1.8×10^4
污水 ^[18] Sewage	17 ~ 268	$5.1 \times 10^4 \sim 8.0 \times 10^5$
海水(1 ml) ^[19] Sea water	160	4.8×10^5
土壤(1 g) ^[20] Soil	1×10^6	3.0×10^9

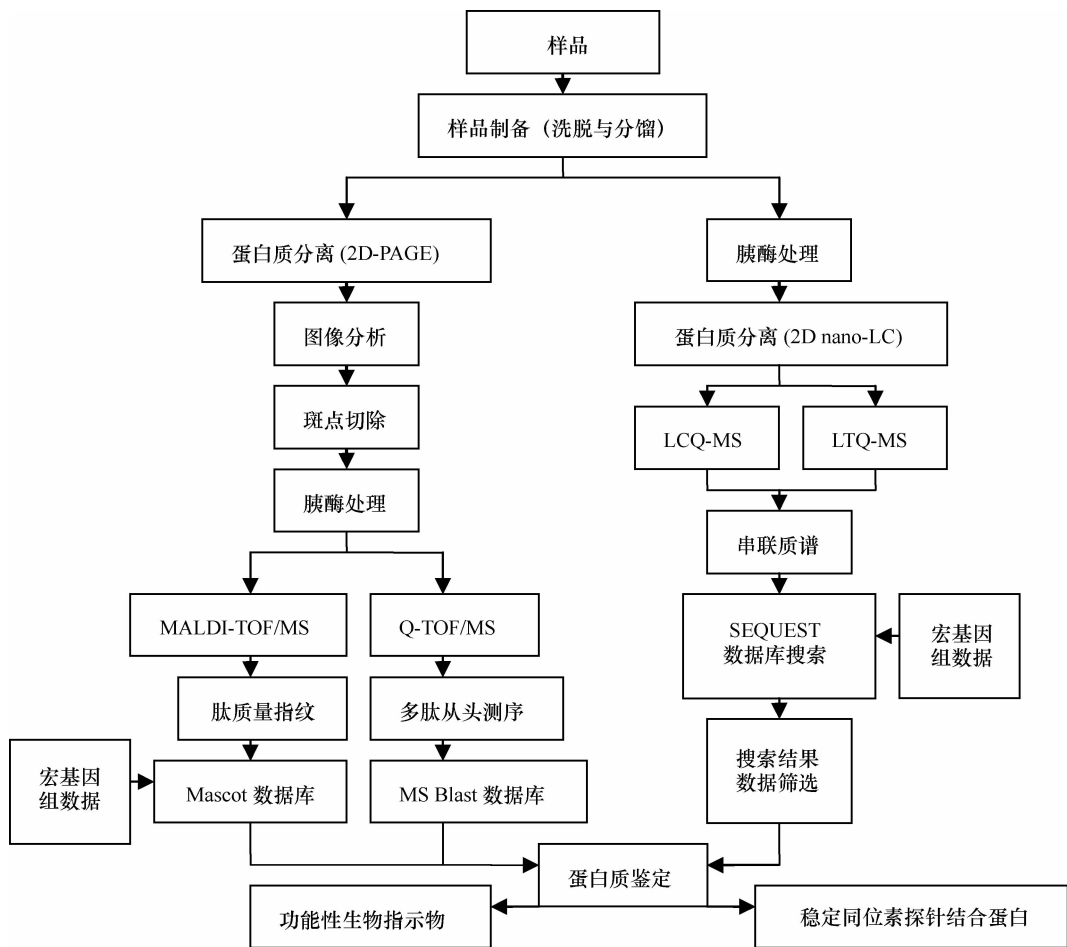


图 1 元蛋白质组学常用研究策略

Fig. 1 Favorite strategies in metaproteomics

注: MALDI-TOF-MS: 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱, Q-TOF-MS: 四级杆飞行时间质谱, LCQ-MS: 多级离子阱液质联用仪, LTQ-MS: 多级二维线性离子阱液质联用仪 Note: MALDI-TOF-MS: Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, Q-TOF-MS: Quadrupole time of flight mass spectrometry, LCQ-MS: Liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry, LTQ-MS: Linear ion trap quadrupole mass spectrometry

3.1 土壤样品蛋白的提取和纯化

土壤元蛋白质组学发展的主要瓶颈是土壤蛋白质的有效提取方法,土壤蛋白质的成功提取是蛋白序列分析的基础和关键。土壤蛋白质易与腐殖质及其他化合物结合在一起,如何将蛋白质与这些腐殖质分离成为蛋白质提取方法的主要障碍;此外土壤蛋白既包含胞内蛋白也包含胞外蛋白^[22]和膜蛋白。胞内蛋白,即微生物蛋白;膜蛋白,即镶嵌在微生物膜上的蛋白;胞外蛋白,即由土壤动物、植物、微生物分泌的蛋白。土壤中的蛋白质绝大部分来自于土壤微生物,就此而言,提取土壤蛋白质的过程,实际上也是提取土壤微生物的过程。土壤蛋白质的稳定性和活性受土壤的植被类型、土壤的有机构成、土壤的养分状况和外界环境等多种因素的影响,因此其稳定性较微生物体内蛋白差,由于土壤蛋白的提取方法较微生物菌体蛋白的直接提取方法较为复杂,提取条件较为苛刻,不可避免的降低了提取蛋白质的活性,而现有的提取方法很难提取到含量和纯度均符合元蛋白质组分析要求的样品。而现有的各种总蛋白质提取方法提取效果不尽人意,还没有一种提取环境中总蛋白的通用方法^[19],任何一种蛋白质提取方法必须满足以下三个原则:(1)提取的蛋白量足够多;(2)所获蛋白质的纯度高,以便于进行序列分析;(3)提取条件不能改变蛋白质的结构,否则不利于质谱分析。目前常用的蛋白质提取方法主要有直接法和间接法。

3.1.1 直接法 直接法即通过破碎的方法使土壤中的微生物胞体内蛋白释放出来,然后从土壤中提取全部蛋白质。这种方法可以获得样品的完整蛋白(胞外+胞内)。一方面由于维持蛋白质三维结构的作用力较弱,易受温度、pH、离子强度等环境因素的影响,虽然蛋白质的一级结构不变,但是蛋白质三维结构易发生改变。因此,提取缓冲液对维持目标蛋白的结构和功能具有重要影响。另一方面由于直接法是对土壤中的所有蛋白质进行提取,条件较为剧烈,为此要考虑以下因素:(1)提取缓冲液的 pH,因为 pH 不仅可以引起蛋白质变性还可以引起多肽键的水解、二硫键断裂等;(2)化学物质,不同的化学物质会导致土壤混合物从不同位点释放蛋白质和某些有机质,例如,用盐溶液提取时会释放一些交换键结合蛋白而用碱性磷酸盐或 NaOH 处理会释放一些与土壤金属元素共价结合的蛋白质。

表 2 总结了近几年不同土壤的提取和纯化方法及其在土壤元蛋白质组学中的潜在应用,研究者可

以根据研究目的、实验条件并结合表 2 中各方法的优缺点选择适宜的方法。

直接法提取环境中的蛋白质存在一定缺陷。首先由于所获得的蛋白质是混合蛋白,会导致 SDS-PAGE 电泳带型分散不开,没有纯菌株条带清晰,对被检测出的蛋白质的分类造成困难。其次,由于大量干扰物的存在,直接裂解应用到自然环境蛋白质的提取中仍存在很多技术上的困难^[2]。如 Kan 等以 Chesapeake 海湾海水微生物群落的元蛋白质组研究,比较了单一菌株、人工混合多种菌株以及环境样品总蛋白的提取效果^[13]。结果显示人工混合多菌株及环境样品总蛋白的 SDS-PAGE 胶的电泳条带没有单一菌株条带清晰。

3.1.2 间接法 间接法即先将土壤中的微生物溶解出来,然后从微生物中提取、纯化、分离蛋白。密度梯度离心法提取菌体蛋白是一种有效的提取方法,但是其提取效率主要取决于土壤混合物的理化性质,因为这种理化性质能够使环境菌体蛋白的定性和定量回收造成偏差^[30]。通过这种方法, Ehlers 等^[11]证明了 21 种具有生物除磷作用的活性污泥系统具有相同的功能蛋白质结构。

3.2 土壤总蛋白的分离

目前,元蛋白质组学研究中常用的样品分离策略主要是基于双向凝胶电泳和液相色谱分离技术。

3.2.1 土壤总蛋白的 2D 电泳分离 自 O'Farrell 和 Klose^[31-32]等首先建立了 2D 电泳后,2D 电泳就被广泛地运用到蛋白质组学的研究中。其基本原理是:2D 电泳的第一向 IEF,根据蛋白质的等电点(PI)进行分离;第二向为 SDS-PAGE,根据蛋白质分子量大小进行分离。所以在样品的组织被中,一切影响等电聚焦和凝胶电泳的因素均应该考虑在内。由于双向凝胶电泳具有高分辨率、高重复性和兼具微量制备以及便于计算机进行图像分析处理,与质谱分析匹配,能够鉴定差异蛋白等性能,被广泛应用于元蛋白质组学的研究中。如 Wilmes 和 Bond^[12]等首次将元蛋白质组学与 2D-PAGE 结合起来研究了一个完整的废水除磷过程中活性污泥的蛋白质组的变化。

经双向凝胶电泳分离不同蛋白斑点,经成像分析和蛋白质鉴定制成参考图,建立蛋白质数据库或比较发现差异蛋白质分子是当前蛋白质组研究的基本路线。然而,这一技术仍然被一些主要问题所限制,极酸、极碱蛋白质;疏水性蛋白质;极大、极小蛋白质以及低丰度蛋白质用此种技术难以有效分离,许多蛋白质质点包含多种蛋白质,胶内酶解过程费时、费力,难以与质谱联用实现自动化。

表 2 不同土壤中蛋白质提取和纯化方法及其在土壤元蛋白质组学中的潜在应用

Table 2 Methods of protein extraction and purification from soil and their potential application in the study of soil Metaproteome

提取液和提取条件 Extracting solution and conditions	纯化或浓缩方法 Purification or concentration method	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
0.3 mol L ⁻¹ K ₂ HPO ₄ , 0.3 mol L ⁻¹ EDTA (pH 8) ^[23]	用 60% (W/V) (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀	提高了蛋白质的酶学活性	蛋白纯化受腐殖质干扰导致蛋白质含纯度偏低; 未能检测到被 SDS-PAGE 分离的蛋白质
67 mmol L ⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0), 过滤 ^[24]	TCA-丙酮沉淀, 乙醇和乙醚分别冲洗	能通过 SDS-PAGE 提取分离蛋白质	只能提取和分析部分土壤样品的胞外蛋白
20~50 mmol L ⁻¹ 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 121℃, 30 min ^[25]	不需要蛋白质的纯化和浓缩过程	专门用来提取球囊霉素的方法	不能从分子角度对蛋白质进行分析, 提取蛋白中含腐殖质, 不能对其他蛋白提取、分析
不同的提取液, 蒸馏水, 4 种盐溶液 ^A 5 种缓冲液 ^B pH6.0 ^[26]	用滤膜和 PEG 对蛋白进行浓缩	蛋白质提取的最佳方法, 避免其他物质干扰, 可以与 Bradford 试剂反应	通过 SDS-PAGE 不能使蛋白质分离, 不能用质谱分析蛋白
50 mmol L ⁻¹ TRIS - HCl, 2 mmol L ⁻¹ DDT, 4 mmol L ⁻¹ EDTA, 0.1% Brij58 (pH7.6) ^[27]	丙酮, 4℃, 进行蛋白沉淀	检测到镉被污染土壤中小分子量蛋白质增加, 蛋白质总浓度增加	SDS-PAGE 仅能检测很少的蛋白条带, 镉污染和对照土壤的 SDS-PAGE 蛋白条带无变化
用硅酸盐玻璃吸气盘提取土壤蛋白 ^[15]	通过琼脂糖 4B 凝胶分离腐殖质和蛋白质	对环境中提取的蛋白进行鉴定; 了解这些蛋白的催化功能; 能够通过质谱分析鉴定	不能对土壤中的全部蛋白质组进行分析, 仅能对溶解态有机蛋白分析
0.1 mol L ⁻¹ NaOH, 30 min, 一步酚抽提 ^[28]	二相提取液 (石炭酸和水) 将蛋白质从腐殖质中分离	能对土壤元蛋白质组进行功能分析; 能提取胞外和胞内蛋白	从土壤中回收的蛋白量太少; 需对土壤进行前处理以获得充足水平的蛋白质
0.1 mol L ⁻¹ 焦磷酸钠 pH7.0; 67 mmol L ⁻¹ 磷酸盐缓冲液 pH6.0; 0.5 mol L ⁻¹ 硫酸钾 pH6.6 ^[29]	PVPP 和一个 10000MWCO 的纤维透析仪	腐殖质-酶复合物和胞内蛋白的研究主要取决于缓冲液	依赖于 SDS-PAGE; 不能通过质谱分析鉴定蛋白

注: A 表示 4 种盐溶液: 氯化钙、氯化钾、氯化钠、硫酸钠; B 表示 5 种缓冲液: 醋、bis-TRIS、PO₄³⁻、胶磷酸盐、柠檬酸盐 Note: A presents four salt solutions; CaCl₂, KCl, NaCl, Na₂SO₄; B presents five buffers: succinate, bis-TRIS, PO₄³⁻, pyrophosphate, citrate

3.2.2 土壤总蛋白的质谱分离 液相色谱分离法也是土壤总蛋白常用的分离方法之一, 对土壤总蛋白进行液相色谱分离前, 蛋白质需要经过蛋白酶消化成短肽^[33]。液相色谱分离法的基本原理是: 溶于流动相中的各组分经过固定相时, 与固定相发生相互作用 (吸附、分配、离子吸引、排阻、亲和等), 由于作用的大小、强弱等不同, 各组分在固定相中的滞留时间不同, 由此从固定相中流出的先后顺序也不同, 并最终使流动相中不同组分得到分离。色谱法没有 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、详细的蛋白质信息, 在低丰度蛋白的分离上, 其效果要优于 2D 电泳。

针对液相色谱存在局限, 不少科学家正在尝试

应用新的分离方法。如 Yates^[34] 等使用多维液相色谱、串联质谱、数据库搜索等方法对 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株 BJ5460 的蛋白组进行研究, 得到了目前最大的蛋白质组分析数据, 分析并检测了 1 484 种蛋白质, 其中包括许多低丰度的蛋白质, 如转录因子和蛋白激酶。

3.3 蛋白质的鉴定

在元蛋白质组学研究中, 蛋白质的鉴定是最关键的一环。目前蛋白质鉴定的主流技术是质谱技术。对于多肽而言, 质谱技术就是要确定一个蛋白质或多肽的分子量, 而由此获取的信息、涉及的领域已经远远超出了检测分子量这一简单的应用。因为分子量是一个蛋白质、多肽或氨基酸最基本的特征, 不同的氨基酸组成、不同的氨基酸序列、不同

的修饰方式、不同的蛋白质结合方式、不同的位点差异均可以在蛋白质分子量上体现,对蛋白质分子量的鉴定实际上就是对蛋白质的种类和性质的鉴定。

质谱技术的基本原理是样品分子离子化后,根据不同离子的质荷比(m/z)的差异来分离并确定分子量。目前常用的质谱技术主要有 MALDI-TOF-MS (基质辅助激光解析电离飞行时间质谱)、Q-TOF-MS (四级杆飞行时间质谱)、MS/MS (串联质谱)。其中,MADI-TOF-MS 的优势在于能够在纯度不高的样品中分析相对复杂的复合物,通过 MALDI-TOF-MS 后获得了蛋白质的肽质量指纹图谱(PMF),然后将获得的 PMF 与数据库中的蛋白质理论 PMF 比对就可以鉴定该蛋白质。

MS/MS 具有结构分析的功能,可以获得检测到的每个肽段序列,因此根据一级质谱检测到的精确分子质量和串联质谱所得到的序列信息,通过蛋白

质数据库的检索,无疑大大增加了蛋白质鉴定的准确性。

Q-TOF-MS 因具有高分辨率、灵敏度和精确度也被广泛地运用于蛋白质组的鉴定中。通过 Q-TOF-MS 所获得的碎片信息解析位置序列还存在困难:一是因为质谱仅获得碎片,无法分辨 N 端碎片离子(b 离子)和 C 端碎片离子(y 离子);二是由于 b 离子和 y 离子以外,其他离子的存在对序列解析有干扰;三是由于多肽断裂不全,造成离子序列不连续,难以确定某些氨基酸,因此需要进行“多肽从头测序”。然后结合 Blast 或 MS Blast 数据库对多肽进行鉴定。

除了通过以上 3 种方法对蛋白质进行鉴定外,由于 LC-MS/MS 能够鉴定一些低丰度的蛋白质,也常被用作蛋白质的鉴定。各种蛋白质的鉴定方法在元蛋白质组学研究中的应用见表 3。

表 3 目前报道的各种元蛋白质组研究比较

Table 3 Comparison of the recent studies on Metaproteomics

生态系统 Ecosystem	研究方法 Study methods	得到蛋白数量(个) Number of obtained proteins (Ind.)
具有除磷效果的活性污泥 ^[12] Activated sludge	2D - PAGE + MALDI - TOF - MS, Q - TOF - MS + Protein identification	约 700
Chesapeake 海湾 ^[13] Chesapeake Bay	2D - PAGE + MALDI - TOF - MS, LC - MS/MS + Protein identification	约 200
森林、湖泊及土壤 ^[15] Forest, lake, soil	SDS - PAGE + LC - MS/MS + Protein identification	约 70 *
AMD 生物膜 ^[14] AMD biofilm	LC - MS/MS + Protein identification	2 033

注: * 仅为从溶解态的有机物中提取的胞外蛋白 Note: * The number presents the extracellular proteins that were only isolated from dissolved organic matte

4 存在问题及展望

4.1 存在问题

土壤本身的复杂性必然决定了土壤元蛋白质组的复杂性,特别是目前元蛋白质组学研究正处于初级阶段,许多问题还有待解决。首先,在蛋白质的提取中,没有统一的、普遍适用的蛋白提取方案。因为土壤本身蛋白质含量低,不同土壤中蛋白质含量不同,土壤蛋白有胞内和胞外蛋白之分,因此有些蛋白很难被检测出来;其次,蛋白质的分离中,目前的分离技术对酸性蛋白、碱性蛋白、疏水性蛋白,特别是对土壤低丰度蛋白分离效果不佳。最后,在

蛋白质的鉴定中,土壤中的蛋白丰度极低,数据库中土壤微生物蛋白质序列信息较少,几乎没有完全匹配的序列,不利于通过质谱分析等方法来鉴定蛋白质^[23]。此外,不同种群中相似基因转录的动力学差异,RNA 翻译水平与相应的蛋白质合成之间的低相关性,这些均是元蛋白质组学发展的主要瓶颈,有待解决。

4.2 展望

4.2.1 元蛋白质组学在功能性生物指示物上的应用 毫无疑问,人类活动对土壤微生物的动态特性产生重大影响。土壤元蛋白质组学的研究能够近似评估微生物在特定降解途径上功能的响应机制。例如何种蛋白质在土壤沙化,受金属或其他有

机或无机化合物污染中发生“丢失”？通过与对照相比,便可以找到在特定途径中会涉及的蛋白和微生物。

近年来土壤酶学的研究备受重视,很多酶被用来作为表征土壤质量变化的指标,因为它们对土壤的改良、气候、重金属或其他化学试剂具有敏感性^[35-38]。然而土壤酶学活性的测量不能完全代表土壤的实际状态。通常用于衡量土壤微生物学活性的酶主要是一些与土壤元素循环有关的酶,如脲酶、蛋白酶、葡萄糖酶和磷酸酶等,这些酶学活性代表了一个生态系统的催化势,通过对它们的鉴定有助于我们建立特定物种或微生物的出现与土壤的生物地球化学关系,进而帮助我们理解土壤的动态变化^[22]。

通过土壤元蛋白质组的研究,有助于我们了解土壤环境的改变对土壤微生物酶学活性的影响,因为这种变化蛋白表达水平具有专一性^[2]。如 Singleton 等^[27]发现被镉污染的土壤中蛋白质含量显著降低。因此,对于在不同处理过程中发生变化的蛋白质的鉴定能够阐明土壤微生物功能的变化,作为土质生物指示物。

微生物蛋白通过凝胶电泳得以分离,得到蛋白质指纹图谱。环境胁迫可能会引起蛋白质指纹图谱的改变,而蛋白质指纹图谱的改变又可能导致微生物的功能发生变化。如果我们能够证明蛋白质指纹图谱的改变具有对特定环境胁迫的敏感性和专一性以及在不同环境中具有普遍存在性,那么那些被鉴定为特定的诱导蛋白或阻遏蛋白便可以作为功能性生物指示物^[33]。这些蛋白能够应用于简单、快捷、敏感的检测中,使得通过免疫学方法或蛋白质芯片技术来评估不同胁迫对生态系统功能影响成为可能,但仍需进一步研究。

4.2.2 稳定同位素探针链接蛋白(SIP-蛋白质)的应用 目前,由于蛋白质结构和功能的信息相对较少,何种蛋白质直接参与一个特定污染物的降解以及何种微生物和酶对土壤有机质的降解起基础作用仍是未知数。

为了检测微生物群落的功能关系,我们可以用¹³C或¹⁵N对底物进行标记,当这些C和N被代谢吸收后进入核酸和蛋白质等生物大分子中^[39],便可以鉴定这个特定过程的微生物种群了。

通过DNA/RNA-SIP可以对降解和同化吸收铝和苯的微生物进行定量检测^[40-41], Bernard等^[42]将SIP-核酸研究应用于土壤中提供了关于土壤微生物

功能的重要信息。这种方法已被 Jehmlich 等^[43]应用于培养基上,证明了超过94%的¹³C被吸收进入蛋白质中,较检测进入核酸中的¹³C更多,所以此种方法对微生物功能鉴定有重要的作用。因此,一旦蛋白质的提取纯化方法难题得以解决、数据库信息完善后,SIP-蛋白技术对土壤群落中专门负责生化途径的酶和微生物的确切鉴定而言是个非常有前景的选择。

参 考 文 献

- [1] Rodriguez-Valera F. Environmental genomics, the big picture? *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 231: 153—158
- [2] Maron P A, Ranged L, Mougell C, et al. Metaproteomics: A new approach for studying functional microbial ecology. *Microbial Ecology*, 2007, 53: 486—493
- [3] Abbott A. And now for the proteome. *Nature*, 2001, 409: 747
- [4] Service R F. High-speed biologist search for gold in proteins. *Science*, 2001, 294: 2 074—2 077
- [5] Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*, 2003, 422: 193—197
- [6] 崔晓龙, 徐丽华, 文孟良, 等. 未培养微生物资源. *微生物学通报*, 2005, 32(3): 144—146. Cui X L, Xu L H, Wen M L, et al. Resources of uncultured microorganisms (In Chinese). *Microbiology China*, 2005, 32(3): 144—146
- [7] Tringe S G, Mering C V, Kobayashi A, et al. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 2005, 308: 554—557
- [8] Tyson G W, Chapman J, Hugenholtz P, et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 2004, 428: 37—43
- [9] Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, 304: 66—74
- [10] Riesenfeld C S, Schloss P D, Handelsman J. Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics*, 2004, 38: 525—552
- [11] Ehlers M M, Cloete T E. Direct extractions of proteins to monitor an activated sludge system on a weekly basis for 34 weeks using SDS-page. *Water SA*, 1999, 25(1): 57—62
- [12] Wilmes P, Bond P L. The application of two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganism. *Environment Microbiology*, 2004, 6(9): 911—920
- [13] Kan J J, Hanson T E, Ginter J M, et al. Metaproteomic analysis of Chesapeake Bay microbial communities. *Saline System*, 2005, 1: 7
- [14] Ram R J, Verberkmoes N C, Thelon M P, et al. Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science*, 2005, 308: 1 915—1 920
- [15] Schulze W X, Gleixner G, Kaiser K, et al. A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and of soil particles. *Oecologia*,

- 2005, 142: 335—343
- [16] Chen S N, Matthias C, Rilling M C, et al. Improving soil protein extraction for metaproteome analysis and glomalin-related soil protein detection. *Proteomics Journal*, 2009, 9: 4 970—4 973
- [17] Erin B, Taylor A, Mark A, et al. Microbial protein in Soil; Influence of extraction method and C amendment on extraction and recovery. *Soil Microbiology*, 2010, 19(2): 390—399
- [18] Wagner M, Loy A, Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13: 218—227
- [19] Curtis T P, Sloan W T, Scannell J W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceeding of National Academy of Sciences of The USA*, 2002, 99: 10 494—10 499
- [20] Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 2005, 309: 1 387—1 390
- [21] Wilmes P, Bond P L. Metaproteomics: Studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends in Microbiology*, 2006, 14: 92—97
- [22] Bastida F, Moreno J L, Nicolas C, et al. Soil metaproteomics: A review of an emerging environment science. Significance, methodology and perspective. *European Journal of Soil Science*, 2009, 60(6): 845—859
- [23] Ogunseitan O A, LeBlanc J. Environmental proteomics: methods and applications for aquatic ecosystems. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2005, 1: 1 027—1 046
- [24] Murase A, Yoneda M, Ueno R, et al. Isolation of extracellular protein from greenhouse soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35: 733—736
- [25] Wright S F, Upadhyaya A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*, 1996, 161(9): 575—586
- [26] Criquet S, Farnet A M, Ferre E. Protein measurement in forest litter. *Biology and Fertility of Soils*, 2002, 35: 307—313
- [27] Singleton I, Merrington G, Colvan S, et al. The potential of soil protein-based methods to indicate metal contamination. *Applied Soil Ecology*, 2003, 23: 25—32
- [28] Benndorf D, Balcke G U, Harms H, et al. Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *The ISME Journal*, 2007, 1: 224—234
- [29] Masciandaro G, Macci C, Doni S, et al. Comparison of extraction methods for recovery of extracellular β -glucosidase in two different forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40: 2 156—2 161
- [30] Maron P A, Schimann H, Brothier E, et al. Evaluation of a quantitative and a qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation. *European Journal of Soil Biology*, 2006, 42: 65—73
- [31] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250: 4 007—4 021
- [32] Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a function analysis of the genome. *Electrophoresis*, 1995, 16: 1 034—1 059
- [33] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Annual Chemistry*, 1996, 68: 850—858
- [34] Yates J R, Washburn M P, Wolters D. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 242—247
- [35] Nannipieri P, Grego S, Ceccanti B. Ecological significance of the biological activity in soil//Bollag J M, Stotzky G. *Soil Biochemistry*. Volume 6. 1990: 293—355
- [36] Moreno J L, Garcia C, Hernandez T. Toxic effect of cadmium and nickel on soil enzymes and the influence of adding sewage sludge. *European Journal of Soil Science*, 2003, 54: 377—386
- [37] Ros M, Hernandez M T, Garcia C. Bioremediation of soil degraded by sewage sludge: Effects on soil properties and erosion losses. *Environmental Management*, 2003, 31: 741—747
- [38] Bastida F, Kandeler E, Moreno J L, et al. Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology*, 2008, 40: 318—329
- [39] Radajewski S, Ineson P, Parekh N R, et al. Stable isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 2000, 403: 646—649
- [40] Friedrich M W. Stable-isotope probing of DNA: Insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17: 59—66
- [41] Whiteley A S, Manefield M, Lueders T. Unlocking the 'microbial black box' using RNA-based stable isotope probing technologies. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17: 67—71
- [42] Bernard L, Mougel C, Nowak V, et al. Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from C-13-labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environmental Microbiology*, 2007, 9: 752—764
- [43] Jehmlich N, Schmidt F, von Bergen M, et al. Protein-based stable isotope probing (Protein-SIP) reveals active species within anoxic mixed cultures. *The ISME Journal*, 2008, 2: 1 122—1 133

APPLICATION OF METAPROTEOMICS IN STUDYING ECOLOGICAL FUNCTION OF SOIL MICROORGANISMS

Liu Wengan¹ Wu Yun¹ Cui Zhongli¹ He Yuanqiu² Lin Xiangui² Cao Hui^{1†}

(1 Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, MOA, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(2 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract Metaproteomics is a recently popped up new technology that based on proteomics is used in the study on microbial communities. It is defined as an instant broad-scaled analysis of all kinds of microbial proteins in a given environment. Though the study of metaproteomics is still at its primary stage, the technology has displayed its powerful function in the study of microorganisms in a given biotope. This paper is to compare the strategies and techniques commonly used in the study of metaproteomics, summarize the status quo of the research on extraction, purification, isolation and functional identification of soil metaproteome, and look into future significance of the study of soil metaproteomics. The development of soil metaproteomics is influenced strongly by extraction methods, while the methods currently available can hardly supply proteins that can be successfully isolated and easily identified as well. What is more, the major problems in identifying proteins reside in the fact that soil is a poor source of proteins and that there is not enough sequence-database information for identification of proteins with mass spectrometry. Once these obstacles are solved, the soil metaproteomics can find broader and deeper application in the study on ecological functions of soil microbe.

Key words Metaproteomics; Environmental microbe; Microbial community; Functional bio-indicator; SIP-protein