

宏蛋白质组学研究策略及应用

于仁涛¹, 高培基², 韩黎¹, 黄留玉¹

1 军事医学科学院疾病预防控制中心, 北京 100071

2 山东大学 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

摘要: 宏蛋白质组学是近年来出现的一种对天然环境微生态进行大规模蛋白质组学研究工作, 其定义为对给定位点的环境微生物群落的所有蛋白质组成进行的即时的大规模的分析。以下将通过分析已有的宏蛋白质组学研究, 并结合本研究组的研究经验, 对本领域的研究策略、进展情况等加以综述。

关键词: 宏蛋白质组学, 微生态, 双向电泳, 质谱

Strategy and application of metaproteomics

Rentao Yu¹, Peiji Gao², Li Han¹ and Liuyu Huang¹

1 Center for Hospital Infection Control, the Institute for Disease Prevention and Control of PLA, Beijing 100071, China

2 The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: Metaproteomics is an emerging proteomics technology to analyze large scale protein expression in environmental microbial ecosystem. It is termed as the large-scale characterization of the entire protein complement of environmental microbial community at a given point in time. This review focuses on the research strategies and the recent applications in this field based on the published reports and in combination with our own research experiences.

Keywords: metaproteomics, microecosystem, two-dimensional electrophoresis, mass spectra

分子生物学和生物信息学极大地改变了生物学研究的深度和广度, 借助于基因组学和蛋白质组学技术, 现在已经具备了对大规模生物样品进行分析的能力。蛋白质组学研究内容主要包括 3 个部分: 表达蛋白质组学(研究特定细胞、组织或器官中蛋白质表达种类和量的变化, 以及不同时期的表达谱的改变等); 结构蛋白质组学(以阐明生物大分子的三维结构和功能的关系特性为目的); 功能蛋白质组学(研究细胞在各种生理和病理条件下蛋白质之间的相互作用关系及其调控网络, 以及蛋白质的转录后修饰

等)^[1]。但就研究对象而言, 还主要局限于微生物的纯培养或单一细胞系或单一组织^[2], 对于组成复杂的天然样品, 或含有大量不可培养微生物的自然微生态的蛋白质组学研究还很不足。而近年来出现的宏蛋白质组学(Metaproteomics)研究正是针对这一问题发展而来的大规模组学研究, 已经初步显示出蕴含的巨大威力, 而这一研究在国外已有一定开展, 国内还鲜有相关研究报道, 以下将从起源、技术环节、研究实例等方面结合笔者实际研究工作对这一新兴技术原理和应用加以讨论。

Received: February 26, 2009; **Accepted:** May 18, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30801045).

Corresponding author: Li Han. Tel/Fax: +86-10-66948344; E-mail: HanliCDC@163.com

国家自然科学基金项目(No. 30801045)资助。

1 蛋白质组学研究

人类基因组全部测序任务的完成标志后基因组时代来临。后基因组研究以完全解释和阐明基因序列的功能和作用为目标,其研究的内容包括功能基因组学和蛋白质组学,前者主要在基因水平认识细胞的生理病理变化,后者则通过分析比较不同生理病理条件下,细胞或组织中表达的蛋白质或区域细胞器亚单位蛋白质的异同,来揭示生命现象中起关键作用的蛋白质分子^[3]。蛋白质组的概念是由澳大利亚的 Wilkins 和 Williams 于 1994 年首先提出的,即一个基因组所表达的所有蛋白质;也可以认为是细胞、组织或机体在特定时空所表达的全部蛋白质^[4],对蛋白质组进行研究以及得到的结果称为蛋白质组学。蛋白质组学研究出现后,发展非常迅速,论文发表的数量完全反映了这一特点,1998 年~2005 年,SCI 共收录蛋白质组学论著型论文 9063 篇。1998 年蛋白质组学论文为 67 篇,以后文献量逐年上升,2005 年达到 2807 篇^[5]。蛋白质组学的研究难度要远大于基因组学,表现在以下几个方面。第一,蛋白质由 20 种氨基酸参与构成,而核酸仅有 4 种核苷酸排列而成;第二,可变剪切的存在使一个基因可能翻译为数种蛋白质;第三,在蛋白质翻译结束后,许多蛋白质还需经过复杂的翻译后加工和修饰过程才有活性;第四,蛋白质的表达存在时空差异性;最后,对于低丰度蛋白还缺乏有效的蛋白浓缩和分析方法。近年来蛋白质组学研究中陆续出现了一些新的技术手段,如:在样品分离过程中对样品预分离以减少样本的复杂性,采用激光捕获显微切割技术以更精确地分离需要的组织和细胞,固相化 pH 胶条和窄范围的 pH 胶条的使用可以分离到更多的蛋白质点,荧光染料的使用使得蛋白质的分离更加准确可靠,切胶和酶解的自动化减少了样品操作过程中角蛋白的污染。技术方面,二维色谱(2D-LC)、二维毛细管电泳(2D-CE)、液相色谱-毛细管电泳(LC-CE)等新型分离技术都是目前发展的主要方向^[6]。随着系统生物学概念的深入人心以及对大规模蛋白质组间相互作用研究的日益重视,发展高通量和高精度的蛋白质相互作用检测技术也受到科学家的关注,蛋白质组学研究已经进入了新的时代^[7]。

2 宏蛋白质组学研究的兴起

现代分子生物学揭示,自然界中微生物群落远比人们预期的复杂和多样^[8],大量的不可培养微生物是潜在的资源宝库,如何认识这些不可培养微生物以及如何对其利用是值得研究者深入思考的问题。目前不可培养微生物的研究主要集中在核酸层面,这要归功于 PCR 技术所具有的扩增作用,在一定程度上解决了如何认识和鉴定不可培养微生物这一难题^[9,10]。而不依赖于培养的宏基因组学的出现,标志对于不可培养微生物的核酸层面研究已经进入了一个新的时代^[11],使基因组学分析从单一微生物扩展到复杂生境。宏基因组(Metagenome)最初用来定义土壤细菌混合基因组^[12],现在则定义为特定环境全部生物遗传物质总和^[13]。宏基因组的概念产生后,相应地, Rodriguez-Valera 首先建议用宏蛋白质组(Metaproteome)来定义那些环境中大量表达的蛋白^[14]。2004 年, Wilmes 和 Bond 以具有生物除磷作用的活性污泥为研究对象,第一次实际运用了宏蛋白质组学(Metaproteomics)的研究方法,在其研究论文中将宏蛋白质组学定义为对某一特定地点的微生物群落所产生的全部蛋白质进行即时地、大规模地研究^[15]。2005 年,美国一项针对切萨皮克海湾(Chesapeake)的蛋白质组学研究,被认为是第一个研究纯天然环境的宏蛋白质组学工作,研究者利用滤膜收集了海湾不同水域的微生物群落,利用 2D 电泳展示了其蛋白质组,并通过质谱方法鉴定了部分蛋白^[16]。从此大规模的宏蛋白质组分析开始进入了人们的视野。

3 宏蛋白质组学的一般研究策略

宏蛋白质组学归根到底还是一种蛋白质组学研究,因此和一般蛋白质组学有相似的研究策略,主要包括样品制备、蛋白分离和多肽鉴定这 3 个主要部分。二者的主要区别在于样品来源的不同,一般蛋白质组学的工作主要针对一种微生物、细胞或组织,样品来源清楚,基因组背景单一,而宏蛋白质组学所关注的是天然生境,样品组成复杂,样品中包含的生物种类数量完全不清楚,或仅知道部分丰度较高生物组成,缺乏完整的基因组背景,因此在研究方法上,存在独特之处。

3.1 样品制备

众所周知, 蛋白质组学研究中, 第一步样品制备的优劣往往决定了后续研究的优劣甚至成败, 而正是由于宏蛋白质组学研究对象的复杂性, 造成了其第一步样品制备变得非常困难, 这也是宏蛋白质组学研究的瓶颈之一。另外, 蛋白样品没有 PCR 那样的扩增手段, 因此无法从小量样本入手进行研究, 只能依赖于对大量样品的浓缩, 在去除样品中杂质的同时尽量保持原始的样品组成, 并排除高丰度蛋白的影响, 难度很大。就目前的技术水平来看, 蛋白质组学研究还仅能够获得研究体系中部分丰度相对较高的, 或是适合于样品制备条件的蛋白, 对于宏蛋白质组学研究来说尤为如此。样品提纯策略也需要根据目标蛋白(如原核/真核, 胞外/胞内)和后续的蛋白分析方法的不同而进行调整。因此, 不太可能找到适用于大多数样品的通用制备方法。

目前报道的蛋白质组学研究多数是以“水”作为研究对象的, 如生物除磷活性污泥、海水、湖水以及土壤渗出液等^[15-17], 以水为研究对象, 组成简单, 容易获得, 在一定程度上回避了样品提纯的困难, 容易得到较为理想的结果。而对于诸如土壤样品这样的样品来说, 由于干扰化合物(酚类物质、腐殖酸等)的存在使样品提纯的难度更大。Schulze 等为了研究不同环境溶解态有机物(DOM, dissolved organic matter)中蛋白的组成, 除了直接收集湖水和土壤渗出液外, 还用溶出法对土壤进行了研究, 发现不同环境中细菌蛋白的含量存在明显差异, 湖水中为 78%, 而森林土壤溶液中小于 50%^[17]。

溶出法仅适用于胞外蛋白的研究, 如果要获得样品的完整蛋白(细胞蛋白+胞外蛋白), 可以考虑直接对样品进行原位裂解, 然后再进行纯化、定量、分析, 在活性污泥^[15]、水^[16]、土壤^[18]、生物膜^[19]等研究中都应用了这一策略。虽然原位裂解能提供样品中细菌、真菌、原生动物等所产生的全部蛋白混合物, 但这种混合也会造成分类学上的困难, 另外, 由于干扰物的存在, 直接裂解应用到天然环境蛋白提取中仍存在很大的技术困难^[20]。2007 年, Benndorf 等报道了一种从土壤中进行蛋白分离的方法, 先通过 0.1 mol/L NaOH 从土壤样品中提取蛋白质、微生物、腐殖酸等, 然后再经过一步酚抽提, 将蛋白和腐殖酸分开, 然后进行蛋白质组学研究^[21]。

当然, 如果能够很清楚地知道某一生境中微生物的组成, 然后再模拟天然生境培养这些微生物, 研究其蛋白表达, 这一研究策略可称为间接裂解法。对于某些组成相对简单, 某种或某几种微生物占绝对优势的样品来说, 这一策略是可行的, 但对于这里讨论的宏蛋白质组学来说, 由于人为降低了样本复杂性, 因此对研究结果仅能起到部分补充作用。

3.2 样品分离

目前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色谱分离技术, 在这一技术环节上, 宏蛋白质组学研究和一般蛋白质组学研究是一致的, 双向电泳是最初也是目前应用最广泛的蛋白质组分离技术, 能对复杂蛋白质混合样本进行定性和定量分析。尽管该技术对部分低丰度蛋白、酸性蛋白、碱性蛋白以及疏水蛋白分离效果不佳, 但完善优化中的该技术在当前蛋白质组学的研究中仍无法被取代。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。通过各种生理、病理状态下的蛋白质分子图的比较, 可以筛选出具有临床标志意义的蛋白质关键分子, 提供药物作用的靶蛋白质分子, 以及发现在信号传递中起重要作用的蛋白质分子, 也可比较不同组织、细胞蛋白质的异同从而寻找特异蛋白和保守蛋白。

色谱分离法在蛋白质组学中的应用主要是液相分离法, 需要对样品进行预先处理以降解成短肽, 常使用多维色谱进行分离, 一般先经过一个强阳离子交换柱然后再经反相柱分离, 可直接与质谱串联进行蛋白鉴定, 如 LC-MS。虽然色谱没有 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。与 2D 电泳相比, 色谱法操作方便迅速, 但是不直观, 其分辨率也不太高, 在寻找差异表达蛋白方面和 2D 电泳比有天然的劣势。但是, 在对生态环境中低丰度蛋白质的分离鉴定上, 色谱分离法相比电泳分离有很大的优势, 在需要对所有表达蛋白进行分离鉴定方面优势明显。

另外毛细管电泳、反相毛细管电泳等技术的发展能够为复杂蛋白混合物提供更为高通量的蛋白分离分析手段, 未来有望在宏蛋白质组学研究中获得

更广泛的应用。

3.3 蛋白鉴定

对蛋白质组的解读依赖于蛋白质的精确鉴定,这是蛋白质组学研究的核心内容,也是目前宏蛋白质组学研究所面临的最大的挑战^[22]。质谱技术在蛋白质大分子鉴定中的应用是蛋白质组学研究的基础,而质谱技术的进步也很大程度上推动着蛋白质组学的发展。目前在蛋白质组学中常用的质谱技术主要有电喷雾离子技术(ESI)和基质辅助激光解吸电离技术(MALDI),以及 SELDI(Surface enhanced laser desorption/ionization)蛋白指纹质谱技术。

电喷雾离子技术(ESI)是蛋白和多肽的离子化技术之一,很容易与以液相色谱为基础的蛋白分离方法联合,组成液质联用系统(LC-MS),是分析复杂样品的首选技术,可用于低丰度蛋白的鉴定。而 ESI 和反相毛细管电泳技术所构建的反相毛细管 LC-ESI-MS 是目前蛋白质组学研究最有力的工具之一,可显著改善分离效率、检测灵敏度、以及检测通量^[23]。如果将 3 个四级杆检测器串联起来,可组成自动化的 ESI-MS/MS 实现蛋白鉴定,样品通过第一个检测器选择目标肽段,然后在第二个检测器中进行片段化,在第三个检测器中进行分析,然后通过特定的算法可以获得氨基酸序列信息。除了 ESI-MS/MS 外,还有其他种类的串联设备用于蛋白鉴定。

基质辅助激光解吸电离技术(MALDI)的基础是基质吸收短波长的激光后使弥散于基质中的分子产生离子化,通过高压加速后,在飞行管道中飞行,通过记录飞行时间来确定分子的大小。MALDI-TOF 结合肽指纹图谱技术是应用最为广泛的质谱鉴定技术之一,如果基因组背景清楚,通过数据库比对,理论上可鉴定出所有蛋白,而在宏蛋白质组学研究中的实际应用中往往会遇到很大的困难,因为数据库是根据已有蛋白或者根据已有的基因预测而来的,显然从自然环境中得到的蛋白很难获得准确鉴定。而各种蛋白的翻译后修饰也大大限制了 MALDI-TOF 的应用^[16]。相比较而言, MALDI-TOF/TOF-MS/MS 在未知蛋白的鉴定方面则更为有效。

在 MALDI 的基础上,表面增强激光解吸电离((Surface enhanced laser desorption/ionization, SELDI)-行时间质谱技术,创造性地增加了特异蛋白芯片阅读系统,将传统基质改为以色谱原理设计

的蛋白质芯片,可将多种性质不同的待测蛋白质被捕捉到相应芯片的芯池中,芯池中的被测蛋白质通过激光解吸等过程,经过质谱检测系统检测,软件系统分析,最后绘制成蛋白指纹质谱图,从而实现大规模的样品分析,将疾病组与对照组的谱图进行比较,能发现和捕获疾病特异性相关蛋白质。这一分析技术目前可实现对多种样品的直接分析,如血清、尿样、组织液等。现在 SELDI-TOF MS 已经在各个医学研究领域中使用,在识别特定蛋白质的表达物、进行蛋白质水平的药物筛选、揭示蛋白质激酶的作用、蛋白质的翻译后修饰、蛋白质间的相互作用、测定血清中的小分子物质含量等方面均证实准确迅速^[24]。

近年来,越来越多的质谱技术应用于蛋白质组学研究,如线性多级离子阱傅里叶回旋共振质谱(LTQ-FT-ICR-MS),电场轨道阱回旋共振组合质谱(LTQ-Orbitrap MS)等,都具有极高的分辨率和强大的分析能力,充分显示出蛋白质组学对于技术进步的依赖性,相信这些新的有效的蛋白鉴定手段能够在宏蛋白质组学组学研究中发挥重要的作用。

4 宏蛋白质组学研究实例

4.1 国外相关研究

虽然宏蛋白质组学研究正式出现于 2004 年,但人们对于天然环境中蛋白质的研究从很早就开始了,Ogunseitan 发表了多篇从天然环境中直接分离蛋白质、催化性酶的文章^[25-28],虽然这些研究尚未明确提出蛋白质组学的思想,也并未应用大规模的组学分离和蛋白鉴定手段,但已经开始尝试不依赖培养,直接对天然环境蛋白质进行研究。2004 年,Wilmes 等对具有生物除磷功能的活性污泥的研究中首次明确提出了宏蛋白质组学的概念,此研究应用 2D-PAGE 分析一个实验室水平的活性污泥生物除磷微生物生态系统,在此过程中厌氧处理和好氧处理交替进行,处理过程的主角是能够富集磷酸盐的微生物,如 *Rhodocyclus* 等未培养生物。本研究发现好氧处理过程和厌氧处理过程中的宏蛋白质组存在差异,在比较稳定的污泥中,蛋白质表达比较稳定,而在好氧和厌氧交替的污泥中蛋白质表达相对不稳定^[15]。2008 年,Wilmes 在其最新的报道中继续利用宏蛋白质组学研究方法,通过鉴定活性污泥中高度

表达的蛋白阐明了体系中微生物的转变对增强的生物除磷(EBPR)的重要作用。由于已经获知了活性污泥的宏基因组信息,因此在选定的 111 个蛋白中鉴定了 46 个蛋白,大多数都可与生物除磷功能直接相关,本研究将“*Accumulibacter*”的代谢活性与 EBPR 中观察到的化学转化直接联系起来^[29]。Wilmes 等在活性污泥系统中的系列研究展现了宏蛋白质组学技术在探索环境微生物的特殊功能方面的巨大作用。

2005 年, Kan 等对 Chesapeake 海湾进行了宏蛋白质组学分析,这是第一次针对纯天然环境的、大规模的宏蛋白质组学工作,研究者利用滤膜收集了海湾不同水域的微生物群落,研究了天然样品和人工混合菌株样品在蛋白提取中的异同,利用 2D 电泳展示了其蛋白质组,并鉴定了少量蛋白^[16],显示了宏蛋白质组学与生物多样性、功能多样性、生态学等的紧密联系,同时清楚地展现了蛋白鉴定困难对于此类研究的限制。同一年, Banfield 等在 Science 上发表的一篇文章为这一问题的解决提供了可行的方向,他们在研究美国 Richmond 铁矿区酸性水表面的生物膜时,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,并以此建立宏蛋白质数据库,对比从质谱方法中得到的肽段,最后有 2033 种蛋白质得到了鉴定^[19],充分显示了宏基因组学研究和宏蛋白质组学研究二者结合的重要性。同一年, Schulze 等研究了分离于森林湖泊及土壤中溶解态有机物的各种蛋白质^[17],希望找到与生态碳循环有关的细胞外蛋白质。他们比较了来源于不同环境的样品其蛋白组成的不同;发现阻止碳元素运输到根际会对根际土壤的蛋白组成发生明显的改变,这一研究首次将宏蛋白质组学运用于生态元素的循环研究上,显示了宏蛋白质组学研究在揭示生态环境功能上的作用。

此后,陆续出现了一些宏蛋白质组学研究的实例,虽然部分研究是以功能蛋白质组学或蛋白质组指纹图谱等名称出现,但就其研究内容来说可以归于宏蛋白质组学研究。如 2007 年,宏蛋白质组学第一次应用于婴儿肠道排泄物的微生物谱系研究中,发现随着时间的改变,宏蛋白质发生改变,并且发现了一个蛋白点含有的肽段序列和双歧杆菌的醛糖转移酶非常类似^[30]。2009 年, Verberkmoe 等运用非定向的“鸟枪法”,对人类粪便进行了大规模的宏

蛋白质组学研究,结果显示蛋白表达和宏基因组信息间存在明显的不对称,和基因组数据库预测信息相比,会产生更多的与翻译、能量产生和碳水化合物代谢相关蛋白,另外研究还发现了部分未知蛋白,可能与人体免疫或未知的微生物活动有关^[31]。这些研究将宏蛋白质组学从环境转移到人体内的微生物,借以阐述人体和寄居于人体的微生物间的相互作用,显示宏蛋白质组学已经渗透到越来越多的领域中。

4.2 在天然木质纤维素降解研究中的应用

木质纤维素的降解对于自然生境来说是重要的物质和能量循环的过程,此过程非常复杂,这种复杂既体现在底物组成的复杂性,同时表现在其降解菌组成的复杂性,而且这种组成往往不是一成不变的,而是动态变化的。研究模式多年来一直是先菌株筛选,然后是纤维素酶纯化。那么自然生境中是不是还存在更为复杂的酶体系?用传统方法是不是已经将全部或者大部分的纤维素酶分离出来?从微生物的可培养性来看这一问题,答案很有可能是否定的,因为目前所能得到纯培养的可能小于 1%^[9]。为深入理解这一问题,笔者选取腐烂青贮作为研究对象,不考虑青贮中微生物的可培养性,从中直接分离纯纤维素酶获得成功。然而,面对大量不可培养微生物和胞外分泌蛋白的存在,这种直接分离的方式显然不能彻底回答上面所提出的问题,因此必须寻求新的大规模的研究方法。借鉴宏蛋白质组学研究思路,笔者对从天然青贮中得到的总蛋白进行了进一步蛋白质组学分析,并利用一种酶活性染色技术鉴定了其中的内切纤维素酶^[32]。虽然限于基因组信息的匮乏还不能进行更进一步生物信息学分析,但本研究对于揭示天然生境中木质纤维素的降解规律以及加强对不可培养微生物资源的利用,无疑是一种有益的尝试。2009 年, Toyoda 进行了类似的研究,他们选择的对象是羊瘤胃,在鉴定的 5 个纤维素结合蛋白中,4 个来源于 *Fibrobacter succinogenes*,显示其可能在瘤胃纤维素降解过程中起非常重要的作用^[33]。

5 展望

蛋白质是生命活动的主要承载者,一切生命活动所涉及的所有反应都需要酶的参与,而生命活动是无处不在的。如果能够有效的监控某体系所有

蛋白质的组成、丰度、新陈代谢以及相互作用等信息,可以预见,对于这一体系运作的具体细节、发生发展的演变过程、外加干预的效果以及生物学本质等会有深刻的理解,这也正是宏蛋白质组学研究所期望最终能够达到的境界。因此,宏蛋白质组学研究有望在将来发挥日益重要的作用。但是目前来看针对蛋白质的研究却充满挑战,主要表现在其结构复杂,稳定性差,难以扩增,而且蛋白丰度差异较大,特别是对于大规模分析来说,研究仪器价格昂贵、体积巨大,限制了研究开展的范围^[34]。特别是宏蛋白质组学研究,目前正处于起步阶段,真正体现其强大分析能力的研究还比较少,许多技术难题还有待解决,如大规模复杂样品的制备、高通量蛋白鉴定等。相信随着越来越多的基因组序列的测定完成,各种组学技术的协同发展,以及新的高通量质谱技术的出现,宏蛋白质组学研究必然会越来越成熟,将在环境微生态、极端微生物、未知样品检测、医学研究等方面发挥重要作用。

REFERENCES

- [1] Hao C, Liu QH, Yang JS, *et al.* Metaproteomics: Exploration of the functions of microbial ecosystems. *Chin J Appl Environ Biol*, 2008, **14** (2): 270–275.
郝纯, 刘庆华, 杨俊仕, 等. 宏蛋白质组学: 探索环境微生态系统的功能. *应用与环境生物学报*, 2008, **14** (2): 270–275.
- [2] Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*, 2003, **422**: 193–197.
- [3] Cui JF, Liu YK. The basic technique of proteomics research-2D electrophoresis. *Foreign Med Sci*, 2003, **24**: 283–287.
崔杰峰, 刘银坤. 蛋白质组学研究的支撑技术-双向凝胶电泳. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2003, **24**: 283–287.
- [4] Graves P, Haystead TAJ. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, **66**: 39–63.
- [5] Zhang HR, Jiang YM, Zhang W. Status quo and strength in the field of proteomics in China. *Chin J Med Libr Inf Sci*, 2008, **17**(4): 68–72.
张惠荣, 姜玉梅, 张威. 蛋白质组学研究现状及我国研究实力. *中华医学图书情报杂志*, 2008, **17**(4): 68–72.
- [6] Anouti S, Vandenabeele-Trambouze O, Koval D, *et al.* Heart-cutting two-dimensional capillary electrophoresis for the on-line purification and separation of derivatized amino acids. *Anal Chem*, 2008, **80**(5): 1730–1736.
- [7] Tian SQ, Qin GY, Li ZW, *et al.* Development research on mass spectrometry and prospect in post-genomics. *Biotechnol Bull*, 2008, **3**: 50–53.
- [8] Schloss PD, Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotech*, 2003, **14**: 303–310.
- [9] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, **59**(1): 143–169.
- [10] Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, *et al.* The agent of bacillary angiomatosis: An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med*, 1990, **323**(23): 1573–1580.
- [11] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, **304**(5667): 66–74.
- [12] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chem Biol*, 1998, **5**: 245–249.
- [13] Rondon MR, August PR, Bettermann AD, *et al.* Cloning the soilmetagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 2541–2547.
- [14] Rodriguez-Valera F. Environmental genomics, the big picture? *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **231**(2): 153–158.
- [15] Wilmens P, Bond PL. The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganism. *Environ Microbiol*, 2004, **6**(9): 911–920.
- [16] Kan JJ, Hanson TE, Ginter JM, *et al.* Metaproteomic analysis of Chesapeake Bay microbial communities. *Saline Systems*, 2005, **1**: 7–15.
- [17] Schulze WX, Gleixner G, Kaiser K, *et al.* A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and of soil particles. *Oecologia*, 2005, **142**: 335–343.
- [18] Singleton I, Merrington G, Colvan S, *et al.* The potential of soil protein-based methods to indicate metal contamination. *Appl Soil Ecol*, 2003, **654**: 1–8.
- [19] Ram RJ, VerBerkmoes NC, Thelen MP, *et al.* Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science*, 2005, **308**: 1915–1920.
- [20] Maron PA, Ranjard L, Mougel C, *et al.* Metaproteomics: A new approach for studying functional microbial ecology. *Microb Ecol*, 2007, **53**: 486–493.
- [21] Benndorf D, Balcke GU, Harms H, *et al.* Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *ISME J*, 2007, **61**(9): 570–577.
- [22] Liska AJ, Shevchenko AJ. Combining mass spectrometry with database interrogation strategies in proteomics.

- Trends Anal Chem*, 2003, **22**: 291–299.
- [23] Cho W, Cheng C. Oncoproteomics: Current trends and future perspectives. *Expert Rev Proteomics*, 2007, **4**(3): 401–410.
- [24] Cho WC. Research progress in SELDI-TOF MS and its clinical applications. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(6): 871–876.
曹志成. 蛋白质芯片 SELDI-TOF MS 技术的研究进展及其在临床中的应用. *生物工程学报*, 2006, **22**(6): 871–876.
- [25] Ogunseitan OA. Direct extraction of proteins from environmental samples. *J Microbiol Methods*, 1993, **17**: 273–28
- [26] Ogunseitan OA. Protein profile in cultivated and native freshwater microorganisms exposed to chemical environmental pollutants. *Microb Ecol*, 1996, **31**: 291–304.
- [27] Ogunseitan OA. Direct extraction of catalytic proteins from natural microbial communities. *J Microbiol Methods*, 1997, **28**: 55–63.
- [28] Ogunseitan, OA. Protein method for investigating mercuric reductase gene expression in aquatic environments. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 695–702.
- [29] Wilmes P, Wexler M, Bond PL. Metaproteomics provides functional insight into activated sludge wastewater treatment. *PLoS ONE*, 2008, **3**(3): e1778.
- [30] Klaassens ES, de Vos WM, Vaughan EE. Metaproteomics approach to study the functionality of the microbiota in the human infant gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**: 1388–1392.
- [31] Verberkmoes NC, Russell AL, Shah M, et al. Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. *ISME J*, 2009, **3**(2): 179–189.
- [32] Yu RT, Wang LS, Duan XY, et al. Isolation of cellulolytic enzymes from moldy silage by new culture-independent strategy. *Biotechnol Lett*, 2007, **29**: 1037–1043.
- [33] Toyoda A, Iio W, Mitsumori M, et al. Isolation and identification of cellulose-binding proteins from sheep rumen contents. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**(6): 1667–73.
- [34] Cho WC. Proteomics technologies and challenges. *Geno Prot Bioinfo*, 2007, **5**(2): 77–85.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论(不用单列标题书写)。目的(Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法(Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results): 本文最后得出的结果(实验数据部分)。结论(Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。

凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的(如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。