

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(2):241-248; 4 February 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

酸胁迫下短乳杆菌 NCL912 蛋白质的差异表达及其作用

黄桂东^{1,2}, 钟先锋^{1,2}, 李超波¹, 曹郁生^{1*}

¹食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学中德联合研究院, 南昌 330047

²河南科技大学食品科学和生物工程学院, 洛阳 471003

摘要:【目的】本文从蛋白质组水平, 对本实验室分离的一株高产 γ -氨基丁酸的短乳杆菌 NCL912 (*Lactobacillus brevis*) 在酸胁迫下蛋白质的差异表达及其应激机理进行探讨。【方法】利用双向凝胶电泳技术对 pH 5.0 和 pH 4.0 条件下, 不含 L-谷氨酸钠的培养物的蛋白质组电泳图谱进行了分析, 并对酸胁迫下差异表达的蛋白进行了比较。利用质谱检测技术和生物信息学技术对这些差异表达的蛋白进行了鉴定、功能分类和代谢途径分析等。【结果】通过双向凝胶电泳技术, 可以得到均匀、背景清晰、分辨率高、重复性好的 *Lb. brevis* NCL912 的双向凝胶电泳图谱。对 pH 5.0 和 pH 4.0 条件下培养的该菌总蛋白质电泳图谱进行比较, 发现有 25 个差异表达的蛋白点。对这 25 个差异表达的蛋白进行了质谱鉴定。由于缺乏短乳杆菌 NCL912 的全基因组, 所以其中只有 8 个蛋白点被质谱鉴定和分析得到。它们分别参与了蛋白质的合成、核苷酸的合成、糖酵解代谢、细胞能量水平的调节等。【结论】酸应激下这些表达蛋白质可通过其相应的功能来保护细胞耐受酸胁迫, 从而使菌能够在酸性环境下生存增值。这可能就是 *Lb. brevis* NCL912 的酸胁迫应激机理之一。

关键词: *Lactobacillus brevis* NCL912, 酸胁迫, 蛋白质组分析

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 02-0241-08

乳酸菌由于其在食品安全性能上的优势, 在轻工、医药特别是食品行业中已经得到广泛的应用。乳酸菌可发酵碳水化合物产生有机酸, 能够促进宿主肠壁蠕动, 帮助消化, 抑制病原菌, 同时延长食品的保存时间^[1-2]。然而, 随着有机酸不断积累, 迅速下降的胞外 pH 会对乳酸菌造成酸胁迫; 另外, 可作为益生菌的乳酸菌, 被人体摄入后, 也会受到胃肠道酸性环境的胁迫^[3]。酸胁迫下的乳酸菌, 其细胞质 pH 会降低, 从而导致质子动力消耗、对酸敏感的酶活性丧失、蛋白质变性、细胞膜和 DNA 结构损坏等, 使细胞的生长和代谢受到限制^[4]。但多种微生物

可对酸性环境产生应激反应, 从而消除酸胁迫所带来的不利影响。研究证明乳酸菌也具有这一功能^[5]。

短乳杆菌 NCL912 (*Lactobacillus brevis* NCL912) 是本实验室从泡菜中分离得到的一株高产 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 的乳酸菌, 它可以将培养基中添加的 L-谷氨酸钠转化成 GABA。前期我们对该菌在酸胁迫下的生长和存活进行了研究, 对其在含有 L-谷氨酸钠的培养基与不含 L-谷氨酸钠的培养基中的生长及耐酸性进行了比较, 发现在含有 L-谷氨酸钠的培养基中该菌生长的更好, 酸耐

* 通信作者。Tel: +86-791-8327754; Fax: +86-791-8333708; E-mail: yysccc@hotmail.com

作者简介: 黄桂东 (1978 -), 女, 河北唐山人, 讲师, 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室博士研究生, 主要从事食品生物技术研究。
E-mail: guidongh78@126.com

收稿日期: 2010-09-02; 修回日期: 2010-11-16

受性更强,说明 L-谷氨酸钠在该菌的酸胁迫应激反应中起着重要的作用。但同时研究发现,在不含 L-谷氨酸钠的培养基中培养的短乳杆菌 NCL912,在酸胁迫条件下也能生长并有一定的酸耐受能力^[6]。说明该菌在应对酸胁迫环境时,其他因素在酸胁迫应激反应中也起着关键的作用。

研究表明,乳酸菌酸胁迫应激反应是一个非常复杂的网络调控体系,涉及到基因和蛋白质的表达调控等^[7]。在缺乏基因序列数据库的情况下,运用蛋白质组技术研究蛋白质表达的变化是一种可靠且有效的研究手段,可以从整体水平揭示菌的酸胁迫应激反应机理。但是,目前对酸胁迫应激蛋白种类及功能的认识还非常的有限,对短乳杆菌在酸胁迫环境下的蛋白表达差异以及与酸胁迫相关的应激作用的研究尚未见到报道。因此,本研究运用双向凝胶电泳(2-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)和质谱技术,从蛋白质组水平,研究 pH 对 *Lb. brevis* NCL912 蛋白表达的影响。对该菌在酸胁迫下蛋白质的差异表达及其功能进行探讨。以期从蛋白质水平分析 *Lb. brevis* NCL912 的酸胁迫应激反应作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基: *Lb. brevis* NCL912 为本实验室分离保存,高产 γ -氨基丁酸。种子培养基(1 L):葡萄糖 25 g,大豆蛋白胨 6.25 g,酵母浸膏 6.25 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.025 g, 5 mL Tween 80, L-谷氨酸钠终浓度 0.1 mol/L。发酵培养基(1 L):葡萄糖 50 g,大豆蛋白胨 12.5 g,酵母浸膏 12.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.05 g, 10 mL Tween 80。发酵培养基中未添加 L-谷氨酸钠。

1.1.2 主要试剂和仪器: 17 cm 固相 pH 梯度干胶条(pH 3-10)、载体两性电解质(pH 3-10)、碘乙酰胺(IAA)、过硫酸铵(APS)、Bradford 蛋白定量试剂盒等购自 Bio-Rad 公司;丙烯酰胺、N,N-2 甲叉双丙烯酰胺、硫脲(Thiourea)、二硫苏糖醇(DTT)、3-[(3 胆酰胺丙基)-乙二胺]-1-丙磺酸(CHAPS)、蛋白酶抑制剂丙甲基磺酰氟(PMSF)、尿素(Urea)等购自 Sigma 公司。IPGphor 等电聚焦仪(Bio-Rad 公司), protean II xi cell 垂直电泳槽、Image Scanner II 透射扫描仪、ImageMaster 2D Elite 5.0 图像分析软件均为 Amersham Biosciences 公司产品; Applied

Biosystems Voyager System 4700 MALDI-TOF-TOF-MS 质谱仪系美国 ABI 公司产品,其他电泳设备购自 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞裂解液的制备

7 Mol/L 尿素 4.2 g, 2 mol/L 硫脲 1.52 g, CHAPS (4%, w/v) 0.4 g, 65 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L EDTA, 加 MilliQ 水定容至 10 mL, 分装, -20℃ 保存,使用时不可反复冻融,用前加 PMSF 至终浓度 2 mmol/L。

1.3 菌的培养

挑取 *Lb. brevis* NCL912 单菌落接种于种子培养液中, 32℃ 静置培养 24 h, 然后将其接种于装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 32℃, 摇床培养 12 h, 活化 2 次。取活化 2 次后的菌液, 3773 × g 离心 5 min, 然后将离心后的菌体 (4.1×10^9) 接种于不同初始 pH (自然 pH, 5.0, 4.0, 3.5, 3.0) 的 100 mL 发酵培养基中, 32℃ 静置培养, 每隔 2 h 取样, 测 OD_{600} , 以时间为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制不同初始 pH 下菌的生长曲线。本研究中将所有种子或发酵培养基成分混合在一起时, 其培养基 pH 被认为是自然 pH, 其范围是 6.2-6.4。

1.4 耐酸性实验

取活化 2 次后的稳定期的菌液 10 mL (4.1×10^9), 11620 × g 离心 5 min, 然后将离心后的菌接种于 pH 2.0 的 100 mL 发酵和对照培养基中, 32℃ 静置培养 0-6 h, 每隔 2 h 取样。每次吸取 0.5 mL 的菌液加入到 4.5 mL 无菌水中, 摇匀即制成了 10 倍稀释液, 依此再进行稀释不同倍数。取稀释样品 100 μ L 于已制备好的含已灭菌琼脂培养基的培养皿中, 32℃ 静置培养 48 h, 待菌落长出后, 统计菌落数。所有实验均重复 3 次, 取平均值。

1.5 双向凝胶电泳

对 pH 5.0 和 4.0 条件下培养的细菌取样进行双向凝胶电泳。首先提取菌体总蛋白, 取菌液样品量为 1×10^9 , 3773 × g 离心 5 min, 收集菌体, 然后用磷酸缓冲液(20 mmol/L, pH 7.0)洗涤 2 次。将配置好的细胞裂解液加入到装有菌体的试管中, 室温静置 1 h, 4℃ 13200 × g 离心 60 min 后取上清即为细胞总蛋白质。采用 Bradford 蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度。本研究培养基的 pH 用盐酸和氢氧化钠调节, pH 偏差是 ± 0.1 。

1.5.1 第一向等电聚焦(IEF)电泳: 双向凝胶电

泳主要参考 Cörg A 等人提出的方法^[8]及 Bio-Rad 仪器操作手册进行,重复 3 次。蛋白质上样量为 200 μg (约 10 μL),与上样缓冲液充分混合,总体积均为 350 μL 。干胶条水化和聚焦在 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。30 V 重泡胀 12 h 后进行等电聚焦,设置等电聚焦的程序达到 80000 伏小时数。第一向电泳结束后,取出胶条,如不及时进行垂直板 SDS-PAGE 电泳,胶条可于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5.2 第二向 SDS-PAGE 垂直电泳: 将上述胶条置于平衡液中平衡 2 次,每次 15 min。平衡缓冲液 A 包括 6 mol/L 尿素,2% SDS,0.05 mol/L pH8.8 Tris-HCl,20% 甘油,2% DTT;平衡缓冲液 B 就是将 A 液中的 2% DTT 替换成 2.5% 的碘乙酰胺。DTT 和碘乙酰胺在需要前临时加入,并让其充分溶解。将平衡好的胶条转入 protean II xi cell 垂直电泳槽中进行 SDS-PAGE 电泳,垂直电泳分离胶的浓度为 12%,电泳条件为:每胶 220 V,10 mA,30 min,然后每胶 25 mA 恒流,直至溴酚蓝指示线到达凝胶底部停止电泳。凝胶电泳结束后,取出凝胶,进行考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.6 凝胶图像分析 用 Image Scanner II 透射扫描仪扫描染色后的凝胶,以获取 2-DE 凝胶图像。用 ImageMaster 2D Elite 5.0 图象分析软件对扫描后的图像进行分析。

1.7 质谱分析及数据库检索

通过 ImageMaster 2D Elite 5.0 软件分析,找出两组图谱之间的差异蛋白点,进行质谱鉴定。首先沿边缘切取凝胶上的差异蛋白点,置于管内,然后依次水洗,脱色,再水洗 2 次,至蛋白点无色透明,再脱水,真空冷冻干燥。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中,用 5-10 μL TPCK 处理的胰蛋白酶(12.5 ng/ μL)酶解过夜。最后萃取,脱盐。将肽段全部点到不锈钢 MALDI 靶板上并分析。MALDI-TOF-MS 分析模式为反射模式,正离子谱测定,激光源为 Nd:YAG 激光器,其波长为 355 nm,加速电压为 20 kV。基质和样品肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprint, PMF)质量扫描范围为 700(3500 Da)。然后直接选择与对照基质的 PMF 图有差异的肽段离子进行 MS/MS 分析。所有实验样品的质谱图均用默认模式获得。应用 Mascot 软件检索 NCBI 数据库(<http://www.matrixscience.com>)进行蛋白质同源查询,获取差异表达的蛋白质信息。

1.8 统计学分析

用 SPSS11.0 软件对所得数据进行统计分析,两组间比较采用独立样本 t 检验。认为 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同 pH 下 *Lb. brevis* NCL912 的生长及存活曲线

由图 1 可以看出, *Lb. brevis* NCL912 的对数生长期是 2-20 h。该菌 NCL912 在 pH > 3.0 的酸性环境中可以生长且在初始 pH 5.0 的培养基中生长较好。而在 pH 2.0 的极端酸性条件下,生存时间超过了 4 h(图 2)。说明该菌具有一定的酸耐受能力。

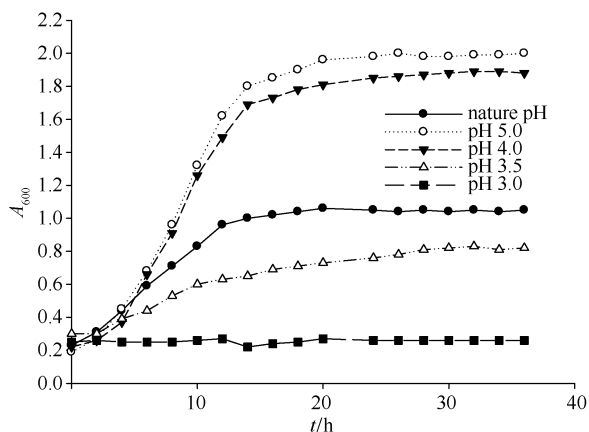


图 1 不同 pH 条件下 *Lb. brevis* NCL912 的生长曲线

Fig. 1 The growth curves of *Lb. brevis* NCL912 at different pHs.

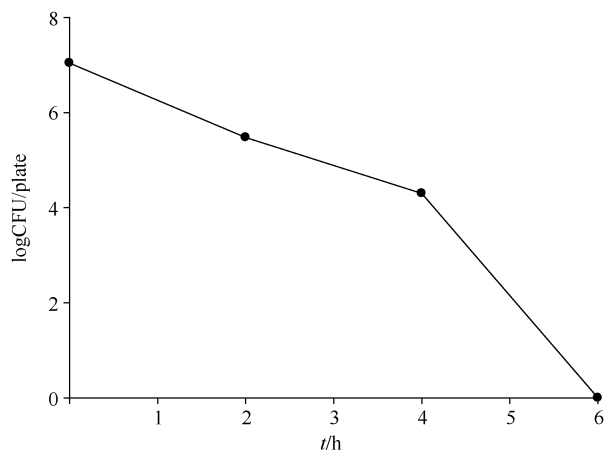


图 2 pH 2.0 条件下 *Lb. brevis* NCL912 的存活曲线

Fig. 2 The survival curve of *Lb. brevis* NCL912 at pH 2.0.

2.2 pH 5.0 和 pH 4.0 下培养物的差异蛋白谱图分析

在相同电泳实验条件和同一参数下分别对 pH 5.0

和 pH 4.0 培养基培养的 *Lb. brevis* NCL912 的总蛋白进行了 3 次重复实验,得到均匀、背景清晰、分辨率高的 2-DE 图谱(图 3)。对两张图谱进行比较分析,发现其匹配点数为 833 ± 68 个,匹配率为 88%。绝大多数的蛋白质点所在的位置及其丰度是一致的,主要分布于

pH 4 - 7 和分子量 15 - 50 kDa 的区域。采用 ImageMaster 2D Elite 5.0 软件分析并结合肉眼观察去除杂质、气泡等造成的假蛋白点,挑选了在表达量上差异显著、与周围蛋白点分的较开的 25 个蛋白点,将这些点从凝胶上切下,进行质谱检测。

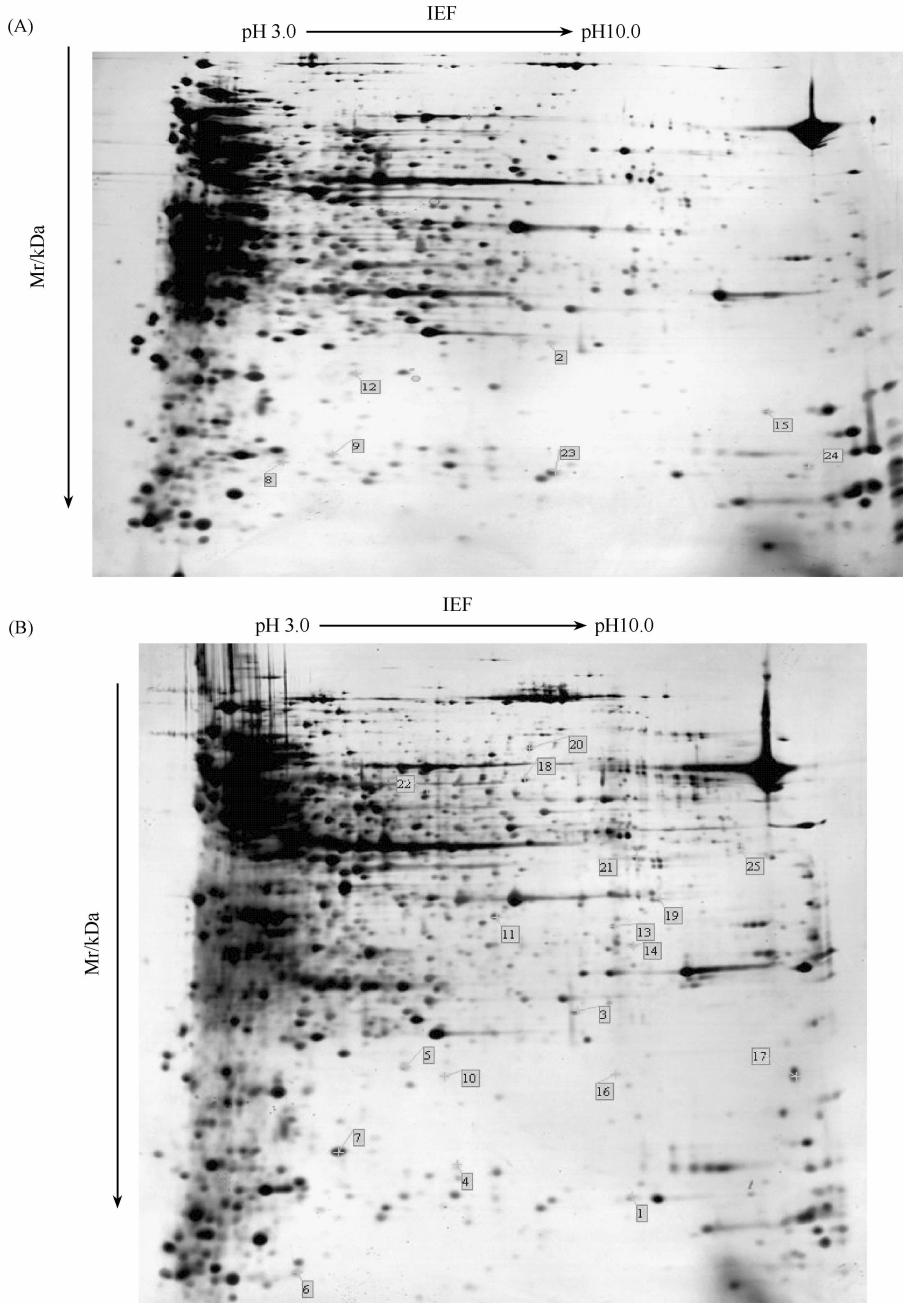


图 3 pH 5.0 和 pH4.0 培养基中培养的 *Lb. brevis* NCL912 总蛋白 2-DE 图

Fig. 3 2-DE profiles of proteins from *Lb. brevis* NCL912 at pH 5.0 and 4.0. A: pH 5.0, B: pH 4.0.

2.3 差异蛋白质点的质谱分析及生物信息学检索

对上述 2-DE 图谱的差异蛋白质点进行了质谱鉴定和分析。将获得的蛋白质点的 PMF 输入

Mascot 查询系统,检索 NCBIInr 数据库。只有当 Mascot 蛋白质分数大于 50 分时才有统计学意义 ($P < 0.05$),认为蛋白得到了鉴定。研究结果显示,

由于 *Lb. brevis* NCL912 的基因序列数据库的缺失,所以 25 个差异蛋白质点中只有 8 个得到了鉴定(表 1)。在 pH4.0 培养基培养的 *Lb. brevis* NCL912 鉴定的蛋白质点中有 7 个蛋白点表达是上调的,1 个蛋白点表达下调。这 8 个蛋白点包括:酸应激蛋白 2 个,分别是通用应激蛋白 UspA 蛋白和含 CBS 结构

域蛋白;与蛋白质合成有关的蛋白 3 个,分别是 50S 核糖体蛋白 L10,核糖体循环因子和 SSU 核糖体蛋白 S30P;与代谢相关的蛋白是依赖 NADP 的 3-磷酸甘油醛脱氢酶;与核苷酸合成有关的蛋白是次黄嘌呤核苷酸脱氢酶;表达下调的蛋白是一个假设蛋白 LVIS_0520,其功能未知。

表 1 质谱鉴定成功的蛋白质信息

Table 1 List of all proteins successfully identified by MS

No.	Accession No.	Protein	Protein MW/Da	PI	Protein scores	Functions
1	gi116332842	UspA	16474.8	6.82	234	repairing the DNA system
3	gi116333173	CDCPs	24174.7	6.32	72	regulation of cellular energy
5	gi130023223	SSU ribosomal protein S30P	21065.1	5.63	103	initiate of protein synthesis
7	gi118475868	50s ribosomal protein L10	21449.4	7.79	278	regulation of replication, transcription and translation
10	gi142782915	RRF	20618	5.79	126	ribosome recycle
15	gi116333182	LVIS_0520	19479.6	5.62	94	unknown
18	gi142779090	IMPDH	52383.4	5.53	488	purine metabolism
22	gi130019023	NADP-GAPDH	51768.9	5.63	122	glycolysis pathway

3 讨论

酸胁迫应激反应是一个非常复杂的生理生化过程。*Lb. brevis* NCL912 在酸胁迫条件下,某些蛋白质的表达量发生了改变,而这些蛋白质主要是通过参与其相应的功能来保护细胞耐受酸胁迫,对这些蛋白质的种类及功能分析如下:

3.1 应激蛋白

当菌受到外部环境胁迫时,为了使菌体迅速适应环境变化,在应激条件下会产生一系列应激蛋白或原有的部分蛋白表达量发生改变。*Lb. brevis* NCL912 在酸胁迫条件下,应激蛋白:通用应激蛋白 uspA (universal stress protein, uspA) 和含 CBS 结构域蛋白 (cystathionine β -synthase domain containing proteins, CDCPs) 的表达量升高。

UspA 是在细菌、古生菌、真菌、原生动物和植物等生命体中普遍存在的一种含量较少的胞内菌体蛋白^[9-10]。当这些生命体处于如冷、热、酸、盐、氧、饥饿等外部环境胁迫时,UspA 的表达量会发生改变^[11-15]。说明在应对不同胁迫的过程中,生命体启动了一些共享的反应网络机制。但是到目前为止其对环境胁迫应激的机理尚不明确。有研究显示,UspA 蛋白是通过调节生物膜的形成、增加菌体的运动和粘附性、保护和修复 DNA 系统等功能来应对环境的胁迫以保护细胞,使其在逆境环境中存活^[10-11,16]。

广泛分布于古细菌、原核生物、真核生物和哺乳动物中的 CDCPs 是由许多在进化上高度保守的蛋白组成^[17]。当受到外部环境如盐、干旱、冷、高温、紫外线和基因毒性等胁迫时,该蛋白的表达会发生改变^[17]。CDCPs 的功能目前尚不明确,但与 CBS 结构域和其他功能性结构域的存在密切相关^[17]。CBS 结构域可以做为细胞能量的传感器,在生物体遭受外部环境胁迫引起的能量应激中参与细胞能量水平的调节,以维持生命体的正常存活^[17-18]。pH 4.0 培养基培养的 *Lb. brevis* NCL912 中 CDCPs 的表达量比在 pH 5.0 条件下菌中该蛋白的表达量高,说明 CDCPs 在该菌应对酸胁迫环境时起到了重要的作用。可能是通过参与细胞能量水平的调节,使该菌能够在酸性环境下生存。

3.2 与蛋白质合成相关的蛋白

蛋白质的生物合成分为起始、延伸和终止 3 个阶段,每一阶段都有一套相关的蛋白质因子发挥作用。通过对 *Lb. brevis* NCL912 的双向电泳图谱进行的质谱鉴定与分析发现,该菌为了能够在酸胁迫下生存,50s 核糖体蛋白 L10 (50s ribosomal protein L10),SSU 核糖体蛋白 S30P (SSU ribosomal protein S30P) 和核糖体循环因子 (ribosomal recycling factor, RRF) 的表达均升高,它们主要是通过参与蛋白质的合成来保护 *Lb. brevis* NCL912 免受酸胁迫。

有研究表明,斯氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* A1501 在高氧胁迫下,50S 核糖体蛋白 L10 基因 *rplJ*

表达上调了 2.3 倍。*rplJ* 是参与复制、转录、翻译调控的基因^[19]。对于核糖体蛋白 L11 的研究认为该蛋白是多肽链终止过程所必需的^[20]。然而,目前,还未见关于 SSU 核糖体蛋白 S30P 的报道,但是,30S 小亚基能够参与翻译起始复合物的形成,所以推测当 *Lb. brevis* NCL912 处于酸胁迫环境的时候,SSU 核糖体蛋白 S30P 表达的上调是因为该蛋白可能参与了蛋白质合成的起始。而核糖体循环因子 RRF 是多肽链合成的终止因子,它促使核糖体脱离翻译完成的 mRNA,以便重新执行翻译任务。在 *E. coli* 受到高温胁迫时,该蛋白使得该菌对高温胁迫产生了耐受,是细菌生长所必需的蛋白^[21]。

由上述 3 种蛋白质的功能推测,当 *Lb. brevis* NCL912 处于酸胁迫环境时,表达上调的 30S 小亚基上的 SSU 核糖体蛋白 S30P 启动了蛋白质合成的起始,而核糖体循环因子表达的增多使得核糖体快速脱离翻译完成的 mRNA,以便其重新执行蛋白质合成任务,50S 核糖体蛋白 L10 则促进了 RRF 的活性,使得该菌更多或更快的产生能够适应酸胁迫环境的蛋白。

3.3 与 DNA 合成相关的蛋白

次黄嘌呤核苷酸脱氢酶 (inositol-5-monophosphate dehydrogenase, IMPDH) 是鸟嘌呤核苷酸经典合成途径的限速酶。IMPDH 受抑制将导致鸟嘌呤核苷酸 (guanine nucleotide, GMP) 缺乏, DNA 合成受阻,使细胞静止于 G1 期,因此其活性与细胞增殖紧密联系。酸胁迫下, *Lb. brevis* NCL912 的 IMPDH 表达量上调,这意味着 IMPDH 有利于 DNA 的合成,使得该菌能够耐受酸性环境的胁迫而生长存活。

3.4 与糖酵解代谢有关的蛋白质

3-磷酸甘油醛脱氢酶是糖酵解途径中的关键酶, NADP 是其催化过程中的辅酶。Kitatani T 等对蓝藻菌 *Synechococcus* PCC 7942 的研究认为依赖 NADP 的 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, NADP-GAPDH) 即可以参与 C3 光合碳还原循环 (the photosynthetic carbon reduction cycle, PCR 循环) 也是糖酵解过程中的重要酶^[22]。在酸胁迫下的 *Lb. brevis* NCL912 的 NADP-GAPDH 表达量升高,说明在

酸胁迫下, NADP-GAPDH 对菌的基础糖代谢模式进行了调控, 该菌通过控制代谢调节, 使得细胞适应外部酸性环境而得以生长。也表明糖代谢调控在酸胁迫应激过程中发挥着重要的作用。

由此可见, 为了在酸胁迫环境中生长增殖, *Lb. brevis* NCL912 诱发了酸胁迫应激反应。在培养基中不含有 L-谷氨酸钠的情况下, 通过对正常环境 (pH 5.0) 与酸胁迫下 (pH 4.0) 生长的 *Lb. brevis* NCL912 的蛋白质组学的研究比较发现, 两种环境下生长的菌的蛋白表达有差异。对质谱鉴定的 8 个蛋白点的生物信息学分析发现他们通过参与蛋白质的合成、核苷酸的合成、糖酵解代谢、细胞能量水平的调节等来保护 *Lb. brevis* NCL912 耐受酸胁迫, 这可能与 *Lb. brevis* NCL912 的酸胁迫应激机理有关。

参考文献

- [1] 许珂, 魏萍. 益生菌作用机制的研究进展. 中国微生态学杂志 (*Chinese Journal of Microecology*), 2009, 21(1): 90-92.
- [2] 赵龙飞. 乳酸菌的保健功能及其在食品中的应用研究. 中国调味品 (*China Condiment*), 2009, 6(34): 30-32.
- [3] Richard H, Foster JW. *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *The Journal of Bacteriology*, 2004, 186(18): 6032-6041.
- [4] Presser KA, Ratkowsky DA, Ross T. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(6): 2355-2360.
- [5] Lee K, Lee HG, Pi K, Choi YJ. The effect of low pH on protein expression by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. *Proteomics*, 2008, 8(8): 1624-1630.
- [6] 黄桂东, 李超波, 曹郁生. 短乳杆菌 NCL912 耐酸性研究. 食品与发酵工业 (*Food and Fermentation Industries*), 2010, 12.
- [7] Van de Guchte M, Serron P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD, Maguin E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, 82(1-4): 187-216.
- [8] Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-

- dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, 21(6):1037-1053.
- [9] Sousa MC, McKay DB. Structure of the universal stress protein of *Haemophilus influenzae*. *Structure*, 2001, 9(12):1135-1141.
- [10] Persson O, Valadi A, Nyström T, Farewell A. Metabolic control of the *Escherichia coli* universal stress protein response through fructose-6-phosphate. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(4):968-978.
- [11] Shih CJ, Lai MC. Differentially expressed genes after hyper- and hypo-salt stress in the halophilic archaeon *Methanohalophilus portucalensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2010, 56(4):295-307.
- [12] Bouchal P, Struhárová I, Budinská E, Sedo O, Vyhřídálová T, Zdráhal Z, van Spanning R, Kucera I. Unraveling an FNR based regulatory circuit in *Paracoccus denitrificans* using a proteomics-based approach. *Biochimical et Biophysica Acta*, 2010, 1804(6):1350-1358.
- [13] Spaniol V, Troller R, Aebi C. Physiologic cold shock increases adherence of *Moraxella catarrhalis* to and secretion of interleukin 8 in human upper respiratory tract epithelial cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 2009, 200(10):1593-1601.
- [14] Zhang Y, Griffiths MW. Induced expression of the heat shock protein genes *uspA* and *grpE* during starvation at low temperatures and their influence on thermal resistance of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 2003, 66(11):2045-2050.
- [15] Gawande PV, Griffiths MW. Growth history influences starvation-induced expression of *uspA*, *grpE*, and *rpoS* and subsequent cryotolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(6):1154-1158.
- [16] Chen W, Honma K, Sharma A, Kuramitsu HK. A universal stress protein of *Porphyromonas gingivalis* is involved in stress responses and biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 264(1):15-21.
- [17] Kushwaha HR, Singh AK, Sopory SK, Singla-Pareek SL, Pareek A. Genome wide expression analysis of CBS domain containing proteins in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh and *Oryza sativa* L. reveals their developmental and stress regulation. *BMC Genomics*, 2009, 10:200.
- [18] King NP, Lee TM, Sawaya MR, Cascio D, Yeates TO. Structures and functional implications of an AMP-binding cystathionine beta-synthase domain protein from a hyperthermophilic archaeon. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 380(1):181-192.
- [19] 窦岳坦, 燕永亮, 平淑珍, 陆伟, 陈明, 张维, 王忆平, 金奇, 林敏. 斯氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* A1501 氧胁迫下基因表达谱研究. 科学通报 (*Chinese Science Bulletin*), 2008, 53(6):664-671.
- [20] 王玉瑶, 张志云, 梁爱华. 核糖体蛋白 L11 及其功能. 生命的化学 (*Chemistry of Life*), 2008, 28(1):104-106.
- [21] Janosi L, Shimizu I, Kaji A. Ribosome recycling factor (ribosome releasing factor) is essential for bacterial growth. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 1994, 91(10):4249-4253.
- [22] Kitatani T, Nakamura Y, Wada K, Kinoshita T, Tamoi M, Shigeoka S, Tada T. Structure of NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Synechococcus* PCC7942 complexed with NADP. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2006, 62(Pt 4):315-319.

Analysis of differential expression proteins and functions in *Lactobacillus brevis* NCL912 under acid stress

Guidong Huang^{1,2}, Xianfeng Zhong^{1,2}, Chaobo Li¹, Yusheng Cao^{1*}

¹State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China

²Food Bioengineering College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

Abstract: [**Object**] We investigated the proteomic profile of *Lactobacillus brevis* NCL912 under optimum pH and acidic pH in the media without the addition of sodium L- glutamate to characterize the differential expression proteins and function by two-dimensional gel electrophoresis. [**Methods**] The differential expression proteins were separated and analyzed by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrum and bioinformatics. [**Results**] The results showed that the two-dimensional gel electrophoresis profiles of *L. brevis* NCL912 were uniformity, well-resolution and repeatability. 25 proteins were differently expressed in the two profiles. Among them, 8 proteins were identified and analyzed by the mass spectrum and bioinformatics due to the lack of genome sequence data of *L. brevis* NCL912. These proteins played the roles of the synthesis of protein and DNA, glycolysis and regulating the cellular energy level. [**Conclusion**] The differential expression proteins might play the important role in the acid stress resistance mechanism which may protect cell against acid stress.

Keywords: *Lactobacillus brevis* NCL912, acid stress, proteomics analysis

(本文责编:张晓丽)

* Corresponding author. Tel: +86-791-8327754; Fax: +86-791-8333708; E-mail: yysccc@hotmail.com

Received: 2 September 2010/Revised: 16 November 2010

本刊为了加强对综述投稿的管理,在2010年10月30日召开的《微生物学报》第九届编委会第四次会议上,讨论通过了综述类投稿的要求,增加了作者数量和第一作者的要求。2003年4月本刊出台了综述类投稿的具体要求(6条),坚持实行“Mini Review”的原则,在此基础上又增加了2条。下面就是最新修订的具体要求,欢迎大家根据要求踊跃投稿。感谢大家对《微生物学报》的支持!

《微生物学报》综述文章投稿要求

2010年11月修订

为了避免篇幅庞大、罗列文献、内容空泛、缺乏观点,力求内容更加新颖、并更具可读性,本刊对综述类投稿提出以下几点要求。

1. 本刊主要刊登微型综述(mini review),来稿字数最好控制在5000字以内(不包括参考文献)。
2. 综述的选题要有新意,对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。
3. 参考文献应控制在40篇以内,近3年发表的文献不少于10篇。
4. 应结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展,不要泛泛罗列文献,只述不评。
5. 应结合自己的研究工作,就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。
6. 综述文章不同于研究报告,规定作者的数量应不多于3人。
7. 要求文章的第一作者提供一份不少于200字的研究经历的简介。
8. 欢迎投送“能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义”的述评类文章。