

极端微生物蛋白质组学的研究现状

冯德芹¹, 杨苏声^{2*}

(¹中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101)

(²中国农业大学生物学院微生物与免疫学系, 农业部农业微生物资源及其应用重点开放实验室, 北京 100094)

摘要: 本文概述了近年来蛋白质组学技术在极端微生物研究领域中存在的关键问题、解决途径和研究现状。迄今为止, 虽然蛋白质组学技术快速发展, 但极端微生物的蛋白质组学的研究仍然存在很多困难。由于极端微生物的蛋白质-蛋白质复合物解离不彻底, 而嗜中温微生物的蛋白质解离和变性条件不适用于极端微生物合成的大多数蛋白质等特殊问题, 致使蛋白质组学技术还没有广泛应用于嗜盐、嗜热/冷、嗜酸/碱等微生物的研究中。当然, 蛋白质组学技术应用的潜能和前景吸引人们积极尝试各种各样的方法。目前, 通过研究已经有效地解决了嗜盐蛋白质的分离、嵌合膜蛋白的鉴定和新蛋白质的功能推测, 证实了基因组预测的一些结论, 并揭示基因组不能充分解析的某些特性和新蛋白质。极端微生物蛋白质组学的研究表明, 全面展示蛋白质表达谱需要不止一种蛋白质组学方法。此外, 蛋白质组学和基因组学的互相印证和结合, 将加速极端微生物的研究进程, 深入全面地揭示微生物适应极端环境的特殊机制, 进而阐明极端微生物生存的机理, 为改善胁迫因素导致的伤害提供新的研究方向。

关键词: 极端微生物; 蛋白质组学; 双向电泳

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008)12-1675-06

极端微生物具有特殊的生理和遗传功能, 是微生物领域的研究热点。但是, 仅通过基因组学不能获得全部可表达基因的信息, 尤其不能完全推测所有基因的功能。利用蛋白质组学有可能揭示该类菌群适应极端环境的独特机制, 从蛋白质组学获得的信息可通过确证和纠正基因的分配来改善基因组的注释。然而, 该类菌群的特殊性仍然使其蛋白质组学的研究开展比较缓慢。

1 嗜盐微生物

若干蛋白质适应细胞质中的高盐浓度的机制已由蛋白质组学研究清楚, 大多数蛋白质的等电点为 3~6, 这与高度的负电荷相关。由于嗜盐蛋白含有高

含量的谷氨酸和天冬氨酸^[1], 是嗜盐蛋白质在饱和盐浓度中行使功能的主要机制。在极端嗜盐古菌中, 存在两类嗜盐蛋白质: 一类与非嗜盐蛋白质相似, 另一类拥有独特的、与盐有关的特性^[2]。此外, 发现某些蛋白质具有不同的等电点, 其银染及与两性电解质的相互作用也都不同。而采用基因组预测, 发现极端微生物盐杆菌属 (*Halobacterium*) 存在极酸的蛋白质, 其平均等电点为 4.2, 缺乏碱性蛋白质, 这是在高盐和高辐射的极端环境中与生命相关的明显特征。由此可见, 基因组学和蛋白质组学从各自的角度证实和互相印证了嗜盐微生物耐盐的机制。

1.1 极端嗜盐古菌

由于酸性的嗜盐蛋白质在低离子强度溶剂中极不稳定, 在等电聚焦时易于聚集, 造成严重的横纹,

基金项目: 国家科技国际合作项目(2006DFA31060)

*通讯作者。Tel: +86-10-62732674; Fax: +86-10-62731332; E-mail: yangssh@cau.edu.cn

作者简介: 冯德芹(1971-), 女, 北京人, 博士, 主要从事微生物蛋白质组学的研究。Tel: +86-10-64807353; E-mail: fengdq@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2008-07-17; 修回日期: 2008-09-24

使得嗜盐菌的样品制备和蛋白质的分离存在很多困难,尤其是高含量的盐分会严重干扰等电聚焦,必须去除其盐分。研究人员经过不断的探索,研究了很多有效分离嗜盐蛋白质的方法。其中,Cho等^[3]发现,联合使用 IPGphor /Multiphor 电泳仪比只用 IPGphor 电泳仪能更有效地分离酸性蛋白质。在蛋白质样品裂解后,通过超声波破碎,将上清液用核酸酶处理。采用离心过滤装置脱盐,经三氯乙酸/冷丙酮沉淀后,蛋白质重新溶解,并再次脱盐,用 IPGphor 电泳仪主动水化后转移到 Multiphor 电泳仪聚焦。由于在完全脱盐后,嗜盐古菌蛋白质倾向于聚集,而且样品在制备过程中大量损失,使得起始材料用量相对较大及程序费时。Kirkland等^[4]提出一种新的提取方法,即在细胞与苯酚/异硫氰酸胍混匀后澄清,与氯仿混合进行相分离,于苯酚层添加无水乙醇并离心。然后将苯酚/乙醇上清液加入异丙醇沉淀蛋白质,机械破碎蛋白质后加盐酸胍,混合后离心,去除苯酚。再用冷丙酮洗涤蛋白质,重新悬浮,水化后聚焦。这种方法可以让样品在完全脱盐时极大地减少蛋白质损失,并防止蛋白质聚集。在该样品制备过程中,使用苯酚/异硫氰酸胍,也可用于分析其他生物的嗜盐蛋白质。

研究证明,经典双向电泳虽然可以鉴定大多数周质膜蛋白,但只能鉴定其中少数嵌合膜蛋白,而使用液相色谱/串联质谱却可以简单、快速地加以鉴定嵌合膜蛋白^[5]。Klein等^[6]指出,由于嗜盐古菌的膜蛋白在等电聚焦时不可逆沉淀,导致嵌合膜蛋白很难被鉴定,其他等电聚焦方法和胶条溶解技术也无法克服这个问题,它们在胰蛋白酶消化过程中也会产生麻烦,不利于基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析。而液相色谱/串联质谱不依赖去污剂、强有机酸或溴化氰介导的蛋白质裂解,由于该法简单、有效,而且不存在干扰质谱的化合物,可进行膜蛋白混合物或不同膜样品的大规模蛋白质组学研究。

此外,低分子量蛋白质的分离鉴定一直存在很多困难,其基因表达量通常较低。Klein等^[7]用滤膜离心富集低分子量蛋白质,在凝胶分离后不染色,直接实施短时间的酶切,结合傅立叶变换离子回旋共振质谱仪(FT-ICR),成功地鉴定了嗜盐古菌中分子量低于20 kDa的蛋白质,为低分子量蛋白质的分离鉴定提供了一种快速有效的方法。

目前,虽然蛋白质的数据库很多,而且有关蛋白

质的资料也在迅速增长,但由于蛋白质种类和数量的多样化、翻译后修饰的复杂性及基因组存在没有预测出的大量蛋白质,尤其是测序的生物很少,所以蛋白质的鉴定仍然困难很大,更不用说预测一个未知蛋白质的功能。结合生物信息学,Choi等^[8]提出筛选嗜盐古菌的新蛋白质和预测其功能的方案。他从基因组获得蛋白质的氨基酸序列,提交到BLASTp进行同源性搜索。进一步用PSI-BLAST分析无功能域的蛋白质,得到少数按照某一功能特征分类成组的匹配蛋白,再进行逆向BLAST分析,在PSI-BLAST的功能组找出典型的蛋白质序列。然后将显著同源的候选蛋白按功能分组,用ClustalW排列其序列,通过ExPasy考查蛋白质的一般特征。最后,通过酶活力实验或蛋白质-蛋白质相互作用以及串联质谱,证实初步推测的新酶功能。该法也适于其他微生物蛋白质的研究,对基因组未知的微生物会更有帮助。

除建立有效的嗜盐蛋白质分离和鉴定方法外,研究人员还进一步研究了极端嗜盐古菌中各种代谢途径的生理和胁迫调节,对感兴趣的蛋白质进行PCR扩增、表达,并在纯化后检测生物活性^[8]。目前已经分离鉴定了盐杆菌NRC-1中很多与不同代谢途径相关的膜蛋白和细胞质蛋白,发现在许多代谢途径中超过50%的蛋白质能够表达,暗示这些途径是活跃的,或是进行组成型表达,揭示该菌具有一些独特的、未被基因组注释过的蛋白质^[9],以及很多在参考图谱上不存在的蛋白质,其中有些蛋白质发生翻译后修饰^[10]。

1.2 中度嗜盐微生物

由于中度嗜盐菌的盐浓度适应范围比极端嗜盐古菌更为广泛,国内外对其适应不同胁迫的机制研究逐渐升温,但是,中度嗜盐菌的蛋白质组学研究起步较晚。Gade等^[11]鉴定*Rhodospirillum rubrum*在不同生长期的蛋白质,证明其三羧酸循环与磷酸戊糖氧化循环的调节相反,并用双向电泳谱重构中枢代谢途径,鉴定了糖酵解途径、三羧酸循环途径和磷酸戊糖氧化分支中几乎全部的酶。他们还研究在不同碳水化合物中生长的蛋白质调节,发现很多上调蛋白是该菌特有的、功能未知的蛋白质。同时,对中度嗜盐菌耐受不同胁迫的机制进行研究,发现在不同Na⁺浓度下,溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的渗透胁迫响应蛋白OmpV和OmpW的变化明显相反,表明这两个蛋白质可能随NaCl浓度的变化而改变^[12]。近年来,我们

研究了各种胁迫对达坂喜盐芽孢杆菌 (*Halobacillus dabanensis*) D-8^T 的影响,以期全面了解中度嗜盐菌独特的耐受机制。Feng 等^[13]研究该菌株在不同盐浓度下的蛋白质表达,其双向电泳图谱表明它们存在显著差异,而且大多数蛋白质在等电点 4.0~6.0 范围内,因而从蛋白质组学的角度证实该菌蛋白质的酸性本质,与极端嗜盐古菌的蛋白质特征相类似,并且发现蛋白质的分离存在相似的等电聚焦困难,推断它们有着某些相同的耐盐机制。我们改善了分离该菌蛋白质的方法,发现在高盐度下显著上调的蛋白质参与渗透适应和胁迫反应。此外,还研究了该菌遭受高盐冲击^[14]和低渗胁迫^[15]所产生的蛋白质表达差异,发现胁迫后热激蛋白和分子伴侣等保护性蛋白的表达增加。从上述结果可以看出,蛋白质组学在蛋白质水平上,展示了中度嗜盐菌耐受各种胁迫的分子机制及其渗透调节网络的概貌,为遗传学研究提供新的思路。由此可以看出,基因组学的成果应该通过蛋白质组学资料重新评价,后者有助于解释复杂的、多层次水平调节的细胞功能。两者的结果可以互相印证和补充,共同揭开生命活动的真正本质。

关于真核嗜盐微生物的蛋白质组学研究较少。Matis 等^[16]用双向电泳荧光差异技术(2-D DIGE)研究嗜盐黑酵母(*Hortaea werneckii*)响应类固醇激素黄体酮的蛋白表达,揭示了受黄体酮影响的分子机制。

2 嗜热微生物

极端嗜热微生物的最适生长温度在 65 以上,它们大多数是古菌。从双向电泳图谱可以看出,在极端嗜热菌中,大多数蛋白质的等电点小于 6,分子量在 14~45 kDa,但经基因组预测,它们却存在很多等电点超过 7 的蛋白^[17,18]。由于嗜热古菌蛋白质复合物的解离可能不彻底,而且嗜中温微生物的最适温度为 25~37,其蛋白质的解离和变性条件不能应用于嗜热微生物的蛋白质。所以,嗜热古菌蛋白质的样品制备和双向电泳分离也是特殊的难题^[18]。

为了探索生命科学的奥秘,不仅要结合多种蛋白质组学技术,也需要蛋白质组学与基因组学相互补充。通过广泛深入的蛋白质组学研究,可以适当地解决基因组学很少或没有注释的很多问题,例如,借此可以发现新的代谢途径^[19]或关键途径的新酶^[20]。Wang 等^[20,21]分别采用鸟枪法、单向和双向电泳技术

研究嗜热嗜热厌氧菌(*Thermoanaerobacter tengcongensis*),鉴定了大量不同的蛋白质,表明获得蛋白质表达谱的全貌需要多种蛋白质组学方法互相补充。通过对该菌的研究,将温度敏感的蛋白质大致分为特定温度下特异表达的蛋白质和响应温度升高而表达变化一致的蛋白质。此外,还发现了基因组不能充分解析的几个特性。Zeldovich 等^[22]将蛋白质组学和基因组学结合研究,发现蛋白质的结构和稳定性与嗜热的进化机制有直接联系,提供了原核生物适应极端环境条件的蛋白质组和基因组成分的全貌。

在极端环境中,微生物也会遭受各种各样的环境胁迫,如高/低温、压力、缺氧和乙醇等,导致大量蛋白质的种类和表达发生变化。长期选择使它们进化而产生特殊的抵御机制,研究这些机制有利于改善不良环境下生物的生存能力。温度胁迫是常见的不利因素,在热激时嗜热真菌的蛋白质表达与嗜中温真菌的差异很大,并诱导特异的热激蛋白^[23],而且在热激和高温条件下,从嗜热菌分别检测到热激蛋白和高温生长的特异蛋白^[17],表明极端嗜热微生物产生新型的热激蛋白,以提高它们在超高温条件下生存的能力。嗜热菌遭受冷激的研究有助于全面理解其适应温度胁迫的复杂调控机制。Sinchaikul 等^[24]研究冷激后嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)的蛋白质变化,证明冷激蛋白主要为酸性蛋白,而且发现冷激诱导的蛋白质包括转录调节子和特异的芽孢转录激活剂等,其中多个蛋白质与芽孢形成的信号传导途径相关^[25]。有趣的是,处于压力下的超嗜热产甲烷菌(*Methanococcus thermolithotrophicus*)则出现一系列正常压力下检测不到的碱性蛋白质^[26]。Topanurak 等指出,嗜热脂肪芽孢杆菌的抗氧化酶在氧胁迫下有规律地增加,并具有不同的等电点^[27]。但是,长时间的氧胁迫不影响过氧化物酶亚型的表达水平,该发现有助于理解微生物在氧胁迫下的适应机制。Williams 等^[28]用二阶段双 N-二甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺凝胶分离膜蛋白,解决了在传统上采用基于凝胶的蛋白质组学方法分析膜蛋白存在的主要难题,发现嗜热梭菌的膜蛋白表达发生显著变化,暗示膜蛋白与其耐乙醇的能力相关。由于蛋白质组学能有效地检测各种胁迫前后微生物的蛋白质表达的变化,使我们能全面、快捷地了解微生物对各种胁迫的抵御机制,为改善胁迫因素导致的伤害提供新的线索。

3 嗜冷、嗜酸和嗜碱微生物

在深海中,微生物既嗜冷也耐高压。这类嗜冷微生物耐低温机制的研究在工业和日常生活中都有应用价值。蛋白质同源的三维模型暗示,蛋白质组分的改变可能增加酶在低温中的有效性^[29]。通过蛋白质组学研究发现,嗜冷菌群的蛋白质组成以及蛋白质-分子伴侣的相互作用能保证酶类等蛋白质在低温下的正常功能,与其耐低温关系密切。嗜冷菌 *Oleispira antarctica* 分子伴侣 Cpn60 的转基因菌株在低温下生长良好。Strocchi 等^[30]筛选 *cpn*⁽⁺⁾转基因的大规模蛋白质表达谱,并用免疫共沉淀的方法发现,蛋白质-分子伴侣相互作用是低温下蛋白质功能的关键决定子,表明能与分子伴侣和少数关键的冷敏感分子伴侣相互作用的蛋白质在冷敏感、冷适应和细胞体系的耐冷作用中是很重要的。

极端嗜酸菌在生物沥滤中广泛应用。采用蛋白质组学研究生物淘矿的微生物体系适应环境变化的全局调节,可能会有新的发现,进而分析该体系中单个参与者在生物沥滤过程中作用的有效程度^[31],并了解它们在极端酸沥滤环境中生存的原因^[32]。这样,可以达到回收金属的目的,又为降低和治理环境污染提供新的途径和方法。但是,极端嗜酸菌在酸矿液和酸性污泥中生存,必须具有特殊的机制,以抵抗重金属的伤害和胁迫。研究重金属对嗜酸菌蛋白表达差异的影响,可以更好地了解微生物沥滤的机制。Novo 等^[33]在检测不同重金属生长的氧化亚铁酸硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) LR 的蛋白质变化时,发现铜和钙都能诱导特异蛋白,并且铜能使细胞质蛋白和细胞质膜蛋白的磷酸化水平增加。由于微生物获得的耐铜能力有胁迫依赖性,而不具有持久特性。目前对抗铜的信息了解很少,所以有必要采用蛋白质组学进行全面的。Baker-Austin 等^[34]研究极端嗜酸古菌 *Ferroplasma acidarmanus* Fer1 抗铜的作用,认为诱导的胁迫蛋白与蛋白折叠和 DNA 修复相关,表明该菌有多个抗铜的机制。此外, Barry 等^[35]在研究硫磺矿硫化叶菌 (*Sulfolobus solfataricus*) 的蛋白质组学时,发现在杯上样法中,采用碱性范围的干胶条分离,要比主动或被动的重水化方法更为优越,是双向电泳分离碱性蛋白质的最佳方法,这在获得细胞的全蛋白质谱上具有重要的指导作用。

双向电泳技术可用于微生物蛋白质在外界 pH 值变化时的动态检测。嗜碱微生物的蛋白质组学研究发

现,该类微生物拥有多个适应碱性 pH 值动态平衡的机制,如调节氨基酸消耗的多条代谢途径可使外界 pH 值增加的影响降到最小^[36],这些结果补充了生理和遗传方面的研究。Gilmour 等^[37]发现,在不同 pH 条件下,假坚强芽孢杆菌 (*Bacillus pseudofirmus*) OF4 主要的表层蛋白质 SlpA 大量存在于 pH7.5 生长的细胞中,其表达不随 pH 值升高而变化,它的组成型表达增加了极端微生物调节高 pH 值的能力。研究人员通过对微生物蛋白质组的研究,发现了微生物耐不利外界环境的调节机理,可以更好地认识和利用它们。

4 问题和展望

蛋白质组学研究解决了极端微生物研究的几个问题:(1)证实了基因组预测的嗜盐蛋白的酸性本质,阐明细胞质中几种蛋白质耐受高盐浓度的机制,并发现两类不同的嗜盐蛋白及很多基因组未曾解析的新蛋白质;(2)揭示蛋白质-分子伴侣相互作用在冷敏感和冷适应中的重要性;(3)通过判断代谢途径的蛋白质是否活跃及蛋白质被修饰,宏观地了解不同代谢途径的调节状况;(4)采用双向电泳图谱可以检测在各种胁迫条件下蛋白质的动态变化,并推测新蛋白质的功能,挖掘基因组不能充分解析的特性,全面、快捷地了解微生物对胁迫的抵御机制,进而阐明极端微生物生存的机理,为改善胁迫因素导致的伤害提供新的研究方向。极端微生物的研究表明,蛋白质表达谱的全貌需要多种蛋白质组学方法互相补充,而全面了解微生物适应极端环境的机制也需要蛋白质组学和基因组学的相互印证与结合。

目前,蛋白质组学技术仍处在不断发展、完善的阶段,极端微生物在这方面的研究还存在不少的困难,但该技术的应用潜力和前景吸引着人们不断积极地尝试各种方法。在 1994 年以后,它的明显优势逐步被人们所认识,并迅速在各行各业中广泛应用。近年来,各种相关技术也相继应用在极端微生物的研究中,包括双向电泳荧光差异显示技术、鸟枪法、纳升电喷雾质谱、液质联用、质谱定量和蛋白质芯片,并解决了一些特殊问题,如嗜盐蛋白的分离方法和嵌合膜蛋白的鉴定等。随着蛋白质组学领域的不断开发,这些先进、快速而有效的技术将加速极端微生物的研究进程,而且结合基因组学研究,能更深入、全面地理解它们的适应机制,最终为人类做出贡献。

参 考 文 献

- [1] Stan-Lotter H, Lang FJ Jr, Hochstein LI. Electrophoresis and isoelectric focusing of whole cell and membrane proteins from the extremely halophilic archaeobacteria. *Appl Theor Electrophor*, 1989, 1(3): 147–153.
- [2] Soppa J. From genomes to function: haloarchaea as model organisms. *Microbiology*, 2006, 152(3): 585–590.
- [3] Cho CW, Lee SH, Choi J, et al. Improvement of the two-dimensional gel electrophoresis analysis for the proteome study of *Halobacterium salinarum*. *Proteomics*, 2003, 3(12): 2325–2329.
- [4] Kirkland PA, Busby J, Stevens S Jr, et al. Trizol-based method for sample preparation and isoelectric focusing of halophilic proteins. *Anal Biochem*, 2006, 351(2): 254–259.
- [5] Blonder J, Conrads TP, Yu LR, et al. A detergent- and cyanogen bromide-free method for integral membrane proteomics: application to *Halobacterium* purple membranes and the human epidermal membrane proteome. *Proteomics*, 2004, 4(1): 31–45.
- [6] Klein C, Garcia-Rizo C, Bisle B, et al. The membrane proteome of *Halobacterium salinarum*. *Proteomics*, 2005, 5(1): 180–197.
- [7] Klein C, Aivaliotis M, Olsen JV, et al. The low molecular weight proteome of *Halobacterium salinarum*. *J Proteome Res*. 2007, 6(4): 1510–1518.
- [8] Choi J, Joo WA, Park SJ, et al. An efficient proteomics based strategy for the functional characterization of a novel halophilic enzyme from *Halobacterium salinarum*. *Proteomics*, 2005, 5(4): 907–917.
- [9] Goo YA, Yi EC, Baliga NS, et al. Proteomic analysis of an extreme halophilic archaeon, *Halobacterium* sp. NRC-1. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2(8): 506–524.
- [10] Tebbe A, Klein C, Bisle B, et al. Analysis of the cytosolic proteome of *Halobacterium salinarum* and its implication for genome annotation. *Proteomics*, 2005, 5(1): 168–179.
- [11] Gade D, Gobom J, Rabus R. Proteomic analysis of carbohydrate catabolism and regulation in the marine bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Proteomics*, 2005, 5: 3672–3683.
- [12] Xu CX, Wang SaY, Ren HX, et al. Proteomic analysis on the expression of outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* at different sodium concentrations. *Proteomics*, 2005, 5: 3142–3152.
- [13] Feng DQ, Yang LF, Lu WD, et al. Analysis of protein expression profiles of *Halobacillus dabanensis* D-8^T under different salinity conditions. *Curr Micro*, 2007, 54: 20–26.
- [14] Feng DQ, Zhang B, Lu WD, et al. A protein expression analysis of moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8^T under salt stress conditions. *J Microbiol*, 2006, 44(4): 369–374.
- [15] 冯德芹, 解利石, 李小红, 等. 达坂喜盐芽孢杆菌 D-8^T 在低渗透冲击下的双向凝胶电泳分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46(5): 740–744.
- [16] Matis M, Zakelj-Mavric M, Peter-Katalinic J. Global Analysis of the *Hortaea werneckii* proteome: studying steroid response in yeast. *J Proteome Res*, 2005, 4(6): 2043–2051.
- [17] Takai K, Nunoura T, Sako Y, et al. Acquired thermotolerance and temperature-Induced protein accumulation in the extremely thermophilic bacterium *Rhodothermus obamensis*. *J Bacteriology*, 1998, 180(10): 2770–2774.
- [18] Giometti CS, Reich C, Tollaksena S, et al. Global analysis of a “simple” proteome: *Methanococcus jannaschii*. *Journal of Chromatography B*, 2002, 782: 227–243.
- [19] Feng L, Wang W, Cheng J, et al. Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proc Natl Acad Sc*, 2007, 104(13): 5602–5607.
- [20] Wang J, Xue Y, Feng X, et al. An analysis of the proteomic profile for *Thermoanaerobacter tengcongensis* under optimal culture conditions. *Proteomics*, 2004, 4(1): 136–150.
- [21] Wang J, Zhao C, Meng B, et al. The proteomic alterations of *Thermoanaerobacter tengcongensis* cultured at different temperatures. *Proteomics*, 2007, 7(9): 1409–1419.
- [22] Zeldovich KB, Berezovsky IN, Shakhnovich EI. Protein and DNA sequence determinants of thermophilic adaptation. *PLoS Comput Biol*, 2007, 3(1): e5.
- [23] Oberson J, Rawlyer A, Brandle R, et al. Analysis of the heat-shock response displayed by two *Chaetomium* species originating from different thermal environments. *Fungal Genet Biol*, 1999, 26(3): 178–189.
- [24] Sinchaikul S, Sookkheo B, Phutrakul S, et al. Proteomic study of cold shock protein in *Bacillus stearothermophilus* P1: Comparison of temperature downshifts. *Proteomics*, 2002, 2(9): 1316–1324.
- [25] Topanurak S, Sinchaikul S, Sookkheo B, et al. Functional proteomics and correlated signaling pathway of the thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus* TLS33 under cold-shock stress. *Proteomics*, 2005, 5(17): 4456–4471.
- [26] Jaenicke R, Bernhardt G, Ludemann HD, et al. Pressure-Induced Alterations in the Protein Pattern of the Thermophilic Archaeobacterium *Methanococcus thermolithotrophicus*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(10): 2375–2380.
- [27] Topanurak S, Sinchaikul S, Phutrakul S, et al. Proteomics viewed on stress response of thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Proteomics*, 2005, 5(14): 3722–3730.
- [28] Williams TI, Combs JC, Lynn BC, et al. Proteomic profile changes in membranes of ethanol-tolerant *Clostridium thermocellum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007, 74(2): 422–432.
- [29] Methe BA, Nelson KE, Deming JW, et al. The psychrophilic

- lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psycherythraea* 34H through genomic and proteomic analyses. *PNAS*, 2005, 102(31): 10913–10918.
- [30] Strocchi M, Ferrer M, Timmis KN, *et al.* Low temperature-induced systems failure in *Escherichia coli*: Insights from rescue by cold-adapted chaperones. *Proteomics*, 2005, 6(1): 193–206.
- [31] Valenzuela L, Chi A, Beard S, *et al.* Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol Adv*, 2006, 24: 197–121.
- [32] Dopson M, Baker-Austin C, Bond PL. Analysis of differential protein expression during growth states of *Ferroplasma* strains and insights into electron transport for iron oxidation. *Microbiology*, 2005, 151(12): 4127–4137.
- [33] Novo MT, da Silva AC, Moreto R, *et al.* *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, 77(2): 187–195.
- [34] Baker-Austin C, Dopson M, Wexler M, *et al.* Molecular insight into extreme copper resistance in the extremophilic archaeon *Ferroplasma acidarmanus* Fer1. *Microbiology*, 2005, 151(8): 2637–2646.
- [35] Barry RC, Alsaker BL, Robison-Cox JF, *et al.* Quantitative evaluation of sample application methods for semipreparative separations of basic proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 2003, 24(19-20): 3390–3404.
- [36] Padan E, Bibi E, Ito M, Krulwich TA. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1717(2): 67–88.
- [37] Gilmour R, Messner P, Guffanti AA, *et al.* Two-dimensional gel electrophoresis analyses of pH-dependent protein expression in facultatively alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 lead to characterization of an S-layer protein with a role in alkaliphily. *J Bacteriol*, 2000, 182(21): 5969–5981.

Current status on proteomics of extremophilic microorganisms —A review

Deqin Feng¹, Susheng Yang^{2*}

(¹Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(²Department of Microbiology and Immunology, College of Biological Sciences, China Agricultural University and Key Laboratory of Agro-Microbial Resources and Application, Ministry of Agriculture, Beijing 100094, China)

Abstract: We summarized the key handicap and troubleshooting when proteomic techniques were used to investigate extremophilic microorganisms, and the actual state of their proteomes research in recent years. Up to now, proteomics techniques keep developing and improving rapidly, but they has not been widely used to explore proteome of extremophilic microorganisms including halophiles, thermophiles, psychophiles, acidophiles and alkaliphiles due to specific problems including incomplete dissociation of protein–protein complexes of extremophiles, and a lot of proteins synthesized by extremophiles are resistant to the conditions which dissociated and denatured proteins synthesized by mesophilic organisms. However, the foreground of potential application of the techniques draws people on attempting zealously multifarious methods. At the present time, several technical problems for separating halophilic proteins, integral membrane proteins and predicting the function of new proteins have been solved availably. Proteomics data have validated some conclusions of genome predictions, and revealed many novel proteins and a few properties of extremophiles can not be resolved fully by genome data. The investigation of extremophiles proteomes indicated that a comprehensive view of protein expression profiles should rely on more than one proteomic method. In addition, the mutual verification of conclusions on the basis of genome and proteome and combination of these two techniques must accelerate the study of extremophilic microorganisms, and redound to uncover deeply and wholly the unique mechanisms of microorganisms adaptation to extreme environments. Moreover, it would clarify the mechanisms of their survival, and point out new direction of survey for improving damage result from stresses, finally contribute to human survival and healthy.

Keywords: extremophilic microorganisms; proteomics; two-dimensional gel electrophoresis

Supported by the China International Cooperation Program for Science and Technology (2006DFA31060)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62732674; Fax: +86-10-62731332; E-mail: yangssh@cau.edu.cn

Received: 17 July 2008/Revised: 24 September 2008