

细菌中蛋白质样品制备方法研究进展

厉彦鑫¹, 杨永新¹, 于忠娜², 王义坚³, 韩荣伟¹, 王军¹, 范荣波¹, 都启晶^{1*}

(1. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 青岛 266109; 2. 青岛农业大学海都学院, 莱阳 265200;
3. 青岛荷斯坦奶牛养殖有限公司, 青岛 266601)

摘要: 细菌在生长繁殖时, 细菌蛋白的表达受到环境影响而存在较大差异, 使得细菌蛋白表达具有复杂性。在食品生产加工过程中可能会受到致病菌污染, 细菌产生的内毒素和外毒素均会对人体健康构成威胁, 因此需要高灵敏度和高特异性的检测方法来定量分析和鉴定食品中的细菌毒素。蛋白质组学方法可以揭示细菌蛋白组成及其潜在的生物学功能, 感染过程中菌体蛋白表达变化和致病机制。其中, 细菌蛋白样品的前处理作为细菌蛋白组学研究的关键步骤, 直接影响鉴定的细菌蛋白质量。本文主要阐述目前细菌蛋白组学研究中菌体蛋白和胞外蛋白样品制备方法及其对蛋白鉴定和定量的影响, 将为更深入地开展细菌蛋白组学研究提供参考。

关键词: 菌体蛋白; 胞外蛋白; 样品制备方法

Research progress on preparation methods of protein samples in bacteria

LI Yan-Xin¹, YANG Yong-Xin¹, YU Zhong-Na², WANG Yi-Jian³, HAN Rong-Wei¹,
WANG Jun¹, FAN Rong-Bo¹, DU Qi-Jing^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;
2. Haidu College, Qingdao Agricultural University, Laiyang 265200, China; 3. Qingdao Holstein
Dairy Breeding Co., Ltd., Qingdao 266601, China)

ABSTRACT: The expression of bacterial protein is affected by the environment during growth and reproduction of bacteria, which makes bacterial protein expression complex. In the process of food production and processing, it may be contaminated by pathogenic bacteria. Endotoxin and exotoxin produced by bacteria pose a threat to human health. Therefore, high sensitivity and high specificity detection methods are needed to quantitatively analyze and identify bacterial toxins in food. The composition of bacteria protein and their biological functions can be revealed using proteomics. And proteomics can also be revealed the changes of bacterial protein expression and pathogenic mechanism during infection. The pretreatment of bacterial protein samples is one vital step of bacterial proteomics and it is closely associated with the quality of the identified and quantified proteins. This paper described the preparation methods of bacterial protein and extracellular protein samples, and clarified the influence of those methods on protein identification and quantification. It will provide a reference for further research on bacterial proteomics.

基金项目: 青岛市科技惠民示范引导专项(21-1-4-ny-17-nsh)、山东省重点研发计划项目(公益类科技攻关)(2019GNC106024)、烟台市校地融合发展项目(2021XDRHXMQT34)、国家农产品质量安全风险评估项目(GJFP2019027)、山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MC209)

Fund: Supported by the Qingdao Science and Technology Demonstration and Guidance Project (21-1-4-ny-17-nsh), the Shandong Province Key Research and Development Program (Public Welfare Science and Technology Research) (2019GNC106024), the Yantai City Campus Integration Development Project (2021XDRHXMQT34), the National Agricultural Product Quality and Safety Risk Assessment Project (GJFP2019027), and the Shandong Provincial Natural Fund Project (ZR2020MC209)

*通信作者: 都启晶, 博士, 讲师, 主要研究方向为乳品营养与安全。E-mail: qijingdu@163.com

*Corresponding author: DU Qi-Jing, Ph.D, Lecturer, College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China. E-mail: qijingdu@163.com

KEY WORDS: bacterial protein; extracellular protein; sample preparation method

0 引言

基因虽然是遗传信息的源头,但功能性蛋白质才是基因功能的执行体,它为认识各种生命活动提供直接的分子基础。蛋白质组学已被广泛应用于食品、医学和动植物生理等各个领域的基础研究与应用研究^[1-3]。细菌蛋白包含胞内蛋白和胞外蛋白,胞内蛋白主要指细菌细胞质内蛋白^[4];胞外蛋白则指分泌蛋白和表面蛋白^[5]。目前蛋白组学技术在细菌研究中已广泛应用,包括枯草芽孢杆菌^[6-7]、大肠杆菌^[8-9]、幽门螺杆菌^[10-11]、金黄色葡萄球菌^[12-14]、棒状杆菌^[15]、沙门氏菌^[16-17]和分枝杆菌^[18-19]等,以及假单胞菌属和弯曲杆菌属^[20]的毒力因子研究。蛋白质组学技术用于病原菌研究可分析产生的毒力因子的表达水平,鉴定细菌的胞内蛋白和胞外蛋白,明确细菌毒素可能对食品加工和存储过程中造成的污染,从而在生产加工过程中对其进行控制,提高食品品质。

细菌蛋白样品制备工作流程包括细菌菌体收集、细胞破碎、细胞碎片的去除和蛋白萃取 4 个主要步骤。广泛应用于细菌蛋白组学研究的细胞破碎方法主要采用裂解液裂解、物理破碎和生物酶解法等。本文主要阐述了适用于细菌蛋白组学的样品制备方法,解决蛋白样品质量差异对细菌蛋白组学研究过程造成的影响,从而为筛选和优化细菌蛋白样品制备提供有效的方法。

1 细菌菌体蛋白制备方法

1.1 化学法

化学法是使用化学试剂与细菌生物膜蛋白强烈作用后,使其变性失去相应的功能,达到破碎细胞,提取胞内蛋白的目的。化学法中裂解液具有重要的作用,通常在细菌裂解环节较常用的化学试剂主要有以下几类:(1)有助于提高细菌蛋白溶解度的尿素^[21]、硫脲、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐[3-((3-cholamidopropyl) dimethyl ammonium)-1-propanesulfonate, CHAPS]和二硫苏糖醇(rac dithiothreitol, DTT)^[22];(2)能够有效地促进蛋白的变性和溶解的表面活性剂十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)^[23];(3)防止蛋白降解的蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)^[24]。王秋萍等^[25]通过离心获得嗜酸乳杆菌,沉淀的菌体添加预冷磷酸盐缓冲液振荡裂解,离心获得蛋白沉淀,经 Sephadex G-100 凝胶柱分离纯化鉴定出该菌表达的两种主要蛋白。于海天等^[26]对比三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)/丙酮沉淀法和乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)裂解液裂解法[50 mmol Tris-HCl (pH=8.8)、2 mmol

EDTA、100 mmol NaCl、100 mg/mL 溶菌酶、0.5% Triton X-100、10% PMSF],通过电泳图谱分析得知裂解液裂解法为白叶枯病菌胞内蛋白提取和分离的最佳方法,该方法能有效缩短蛋白提取时间,提高菌体利用率,减少蛋白损失,保证胞内蛋白完整性。

1.2 物理法

物理方法以物理或机械的方法破碎菌体细胞来促进蛋白质的提取,如加热煮沸、反复冻融、超声波处理或液氮研磨^[27]。目前常规物理破碎方法中超声裂解和液氮研磨较为方便,裂解效果较好,所以学者们较多采用超声和液氮研磨的方式破碎菌体,使胞内蛋白释放,获得目的蛋白。王国勤^[28]将马链球菌马亚种细菌在磷酸盐缓冲液中加热煮沸,蛋白质印迹法(Western-blot)检测结果显示,马链球菌马亚种新疆株菌体蛋白与康复马血清可产生反应条带。谢宇舟等^[29]建立副猪嗜血杆菌菌体蛋白的提取方法,采用冰浴超声的方式破碎细菌提取菌体蛋白,随机挑选了双向电泳 14 个蛋白质点进行质谱分析,证实所提取的 14 个蛋白质均为副猪嗜血杆菌菌体蛋白。陈杰豪等^[30]采用超声的方法对嗜水气单胞菌进行裂解,提取胞内蛋白,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,条带明显,可提出可溶性蛋白。KIELKOPF 等^[31]采用液氮研磨和超声处理裂解大肠杆菌的方法,均能够裂解大肠杆菌提取蛋白。此外,超高压处理可导致细菌胞内蛋白泄露,但超高压的条件限制了提取蛋白的质量。唐禄等^[32]采用高压均质机破碎菌体,收集上清蛋白溶液进行纯化,经聚丙烯酰胺凝胶电泳可明显看到目的蛋白条带。周敏等^[33]采用超高压处理破碎副溶血弧菌提取菌体蛋白,针对不同压力下蛋白提取的质量进行了更深的研究比较,得出在 250 MPa 处理 10 min 效果最佳。

除常规物理方法外,HABERL-MEGLIĆ 等^[34]使用了电穿孔的方法提取大肠杆菌蛋白,并且提出在电穿孔后提高培养温度,细菌细胞的蛋白质泄漏会降低,表明在 4 °C 条件下采用电穿孔提取蛋白质效果最佳。该方法与其他方法相比,不会产生一些难以去除的细胞碎片,处理时间较短,但因这种方法的操作比较复杂、条件难以控制,由此限制了这种样品制备方法的使用。

1.3 生物酶解法

生物酶解法是采用溶菌酶等水解细菌细胞壁上的肽聚糖,使细菌细胞壁破裂,从而致使细菌裂解,此方法因不添加其他的化学试剂和其他因素干扰,因此所得到的蛋白能够充分释放并保证蛋白质完整性。王晓敏等^[35]采用在 35 °C 条件下添加溶菌酶裂解的方式提取芽孢杆菌菌体蛋白,所提取出的芽孢杆菌 *Bacillus* sp. DL-2 胞内蛋白酶拆分乙酸苏合香酯制备高光学纯的(R)-1-苯乙醇具有良好效

果。MEDINA 等^[36]采用溶葡萄球菌酶提取金黄色葡萄球菌蛋白质, 通过超高效液相色谱-串联质谱法鉴定到 2852 个金黄色葡萄球菌蛋白。

1.4 物理化学法

在提取细菌蛋白质过程中, 物理破碎结合化学法比单独使用裂解液或者超声等物理操作裂解细胞效果明显, 而且提取的蛋白质量高, 因此较多学者采用此方法提取菌体蛋白。TANCA 等^[37]在比较了 SDS 缓冲液中的样品加热裂解和 SDS 缓冲液中的样品加热联合磁珠破碎或冻融的方式提取肠道微生物蛋白, 结果发现磁珠破碎和反复冻融显著提高了细菌的蛋白质提取率, 并提出了一种结合 SDS、磁珠破碎、加热煮沸和冻融的结合进行微生物蛋白质组学研究。李贞彪等^[38]对比 TCA-丙酮法、磷酸-TCA-丙酮法、SDS 提取法、TCA/丙酮-SDS/酚抽提法提取链格孢菌菌体蛋白效果, 以上方法前处理均通过液氮研磨处理菌体, 研究中获得蛋白在 SDS-PAGE 凝胶图上表明 TCA/丙酮/SDS/酚抽提法比未添加缓冲液的裂解方法数目更多、丰度最好。

基于苯酚的方法可提高蛋白质量, 减少杂质和盐离子等对蛋白的干扰。舒灿伟等^[39]采用基于苯酚的方法提取立枯丝核菌细菌蛋白, 根据双向电泳图谱得知, 该提取方法通过双向电泳分析鉴定出 877 个蛋白质点。但此方法中苯酚萃取需经过多次抽提, 需要时间较长, 因此大部分学者都采用的物理破碎联合化学试剂裂解的方法提取细菌蛋白。

近年来, 一些学者对细菌裂解方式大多采用在菌体中添加裂解缓冲液然后超声处理, 方法比较简单方便, 并且获得的蛋白质量对蛋白的鉴定没有影响。ZHANG 等^[40]研究了肠道微生物蛋白提取, 通过添加 Tris-HCl 缓冲液进行超声裂解细菌, 鉴定并准确量化了微生物蛋白。DU 等^[41]

针对于对数期的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA) 蛋白组学分析, 在细菌悬液中加入 SDT 缓冲液悬浮后进行超声处理, 分析了植物乳杆菌素 GZ1-27 对 MRSA 的影响, 通过蛋白质组学分析, 可鉴定出 1090 个差异表达蛋白。BLANKENBURG 等^[42]探索了革兰氏阳性菌和阴性菌蛋白提取的方法, 超声处理后添加 SDS 和溶菌酶裂解细菌, 同时加入使蛋白质结合的疏水性和亲水性磁珠, 这种方法能够有效去除细胞杂质而不干扰后续的质谱鉴定。LIPPOLIS 等^[43]通过菌体添加三乙基碳酸氢铵溶液进行超声处理提取了 LB (luria bertani) 培养基和牛奶中培养的大肠杆菌菌体蛋白, 通过蛋白分析鉴定了 1000 种蛋白质及其相对表达水平, 比较了大肠杆菌在牛奶中生长和在 LB 中生长的蛋白变化。

综上所述, 结合在研究中所提取蛋白质量和检测的蛋白种类, 对比得知提取菌体蛋白效果最好的方法是物理法和化学法的联用(表 1), 物理法中液氮研磨和超声处理效果最好^[44]。因此, 提取菌体蛋白最佳方法为液氮研磨或超声处理结合裂解液裂解细菌, 然后添加 TCA/丙酮沉淀蛋白, 此方法较为简单, 蛋白浓度高。

2 细菌胞外蛋白制备方法

细菌当中的毒力因子多为分泌性的蛋白和表面蛋白。分泌蛋白在细菌生长繁殖过程中被分泌到培养基中, 这些分泌体作为毒力因子释放到宿主细胞内或表面; 表面蛋白在细胞内合成后转运到作用位点, 通过共价或非共价方式结合到细菌表面的其他受体分子^[45]。细菌的分泌蛋白和表面蛋白较多且蛋白功能复杂, 均由一些特殊功能的蛋白质、多肽组成^[46], 并且研究证明细菌分泌蛋白和表面蛋白对疫苗的发展具有重要的作用^[47]。

表 1 细菌菌体蛋白制备方法比较
Table 1 Comparison of Bacterial Protein Extraction Methods

制备方法	主要原理	优点	缺点	参考文献
化学法	通过 SDS、EDTA 等化学试剂裂解细胞	细菌中均能提取目的蛋白, 操作简单方便	裂解效果较差, 获得蛋白浓度较低, 种类较少	[25-26]
物理法	通过超声、液氮研磨等物理方法破碎细胞	细菌中均能提取目的蛋白, 操作简单方便	裂解效果较差, 获得蛋白浓度较低, 种类较少	[29,31]
生物酶解法	通过溶菌酶等溶解细菌外壁破碎细胞	此方法无化学试剂干扰, 所得到的蛋白能够充分释放并保证蛋白质完整性	针对于革兰氏阳性菌裂解效果不理想, 蛋白释放不完全	[25-26]
物理化学法	通过物理法和化学法等联合使用破碎细胞	细菌提取蛋白效果最好, 相比蛋白浓度最高, 聚丙烯酰胺凝胶电泳条带最多且清晰, 利于蛋白鉴定	与其他方法相比操作步骤较为烦琐, 需较多的试剂耗材	[37-38,40-42]

2.1 细菌表面黏附蛋白制备方法

细菌会存在少量蛋白共价结合到细胞壁上,表面黏附蛋白参与细菌致病过程,表面黏附蛋白的研究对了解细菌毒力因子种类和表达有重要的作用,在报道中,学者较多采用 LiCl 处理,破坏菌体的聚合能力以达到表面黏附蛋白的分离提取,戴甜^[48]利用此方法阐明了乳酸杆菌表面蛋白三磷酸甘油醛脱氢酶在细胞表面发挥粘附肠道表层粘液素的作用。孙艳菲等^[49]提出戊糖片球菌表面蛋白提取的优化方法,结果在 37 °C 下使用 5 mol/L LiCl 处理得到的表面蛋白具有一定的抑菌能力。目前,表面黏附蛋白提取最佳方法为菌体添加 LiCl 处理后再充分振荡,该处理方式简单方便。

2.2 细菌膜蛋白制备方法

外膜蛋白是细菌外膜的重要组成部分,作为重要的候选抗原,开发针对于细菌病原体的疫苗具有重要的作用^[50]。由于已证明用普通增溶剂如尿素、硫脲、CHAPS 和 DTT 很难溶解膜蛋白,BOUSSAMBE 等^[51]发现了分别带有丁基、己基和辛基全氟链的 3 种衍生物 F₄H₂-DigluM、F₆H₂-DigluM 和 F₈H₂-DigluM 形成的致密球状胶束,提出这 3 种表面活性剂都能溶解脂质囊泡,并从大肠杆菌膜中提取多种蛋白质。这些发现表明,非离子氟化表面活性剂可进一步用于膜蛋白的直接提取和增溶。LIPPOLIS 等^[43]采用的大肠杆菌膜蛋白提取方法均适用于其他细菌,将细菌破碎后获得的上清液超速离心后得到的沉淀即为粗膜蛋白,通过胰蛋白酶消化,从膜蛋白样品中鉴定了与乳腺炎相关的补体 C3b。此类膜蛋白提取方法主要是提取含有菌体蛋白的粗蛋白进行超速离心,无其他复杂操作,比较简单方便。另外,李德龙等^[52]采用试剂盒的操作步骤提取鸭疫里默氏菌外膜蛋白,通过鉴定筛选出外膜蛋白 ECE-1 与鸭 C4 结合蛋白发生相互作用。在较多研究当中,对菌体蛋白粗蛋白进行碳酸盐萃取也可以提取膜蛋白沉淀。LAI 等^[53]采用在碳酸钠浓度增加的情况下连续提取大肠杆菌膜蛋白,鉴定了 200 多种大肠杆菌膜蛋白。

2.3 细菌分泌蛋白制备方法

细菌在生长和繁殖过程中会分泌大量蛋白,这些分泌体释放到环境中作为毒性因子。分泌蛋白提取方法首先从菌液中分离菌体,上清液通过 TCA/丙酮沉淀、硫酸铵沉淀等方法获得分泌蛋白。KOIKE 等^[54]对牛奶中的金黄色葡萄球菌肠毒素进行定量检测,研究中采用调节 pH 至酸性使牛奶中的酪蛋白沉淀,调节 pH 至中性后添加 TCA 沉淀肠毒素,通过超高效液相色谱-串联质谱法对牛奶中的肠毒素 A 明确鉴定和量化。朱平川等^[55]对水稻细菌性条斑病菌采用超滤管收集过滤后样品,通过超高效液相色谱-串联质谱法共鉴定了 661 个蛋白质。徐久翔等^[56]对比 TCA 沉淀法、冷丙酮沉淀法、平衡酚-丙酮法和超滤法提取短乳杆菌分泌蛋白,结果发现最佳提取方法为 TCA 沉淀法。胡古月^[57]论述了差速离心与微孔滤膜过滤相结合的方式提取分泌蛋白方法,利用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳和非标记定量蛋白质组学分离、鉴定了牛支原体分泌蛋白 548 个。POCSFALVI 等^[58]对指数生长期的金黄色葡萄球菌肠毒素的鉴定,上清液经滤膜过滤后加入预冷丙酮沉淀肠毒素,双向电泳图谱分析了金黄色葡萄球菌肠毒素,证明了金黄色葡萄球菌(ATCC 14458)的肠毒素 SEIK 和 SEIQ,金黄色葡萄球菌(RIMD 31092)的肠毒素 SEIL 和金黄色葡萄球菌(A900322)的肠毒素 SEIP 4 种预测肠毒素的表达。

除常用的 TCA 和丙酮沉淀蛋白以外,一些学者使用硫酸铵也可以提取分泌蛋白,但是操作比较复杂,需要经过多次的萃取操作。ALSAHAG 等^[59]将对数后期的结核分枝杆菌 H37Rv(ATCC-27294)离心,分离菌体的上清液在 4 °C 条件下添加 80% 的硫酸铵沉淀分泌蛋白(CFP29),结果分离、纯化和鉴定的结核分枝杆菌胞外 CFP29 具有作为 T 细胞抗原的潜力。综上所述,硫酸铵沉淀法相比 TCA/丙酮沉淀蛋白操作较复杂,而且沉淀蛋白的效果相差不大,所以在分泌蛋白的提取方法中较常用并且简单方便的还是使用 TCA 或者丙酮沉淀蛋白(表 2)。

表 2 细菌胞外蛋白制备方法比较
Table 2 Comparison of bacterial extracellular protein preparation methods

蛋白类型	常用方法比较	最佳方法	参考文献
表面黏附蛋白	采用 LiCl 处理可破坏表面黏附蛋白和菌体的聚合能力,振荡的方式使分离蛋白效果更好	LiCl 处理后摇床振荡	[48-49]
膜蛋白	超速离心法处理菌体粗蛋白,操作简单方便;碳酸盐萃取需经过多次萃取,操作较为复杂	超速离心法	[43,52-53]
分泌蛋白	超滤法耗材较多、提取蛋白效果差、蛋白浓度低、条带不清晰;平衡酚-丙酮法操作复杂、获得蛋白肽段数量少;TCA-丙酮法提取分泌蛋白浓度高、操作简单方便、获得蛋白质组和蛋白肽段数量较多;碳酸铵萃取提取效果较好但操作复杂	TCA-丙酮法	[55-56,58]

3 结论与展望

菌体蛋白制备是通过裂解细胞使蛋白质释放, 通过添加三氯乙酸或者丙酮沉淀蛋白质, 将获得的蛋白进行蛋白组学分析。提取细菌蛋白裂解细菌的方式主要有添加裂解液、物理破碎(煮沸、超声、液氮研磨、磁珠破碎、反复冻融)、生物酶解、物理破碎结合裂解液裂解。文献表明物理破碎结合裂解液裂解的方式分离提取蛋白效果比单独物理或化学方式裂解效果好^[33-34]; 表面黏附蛋白分离提取通过 LiCl 处理后再振荡的方式效果最好, 而且处理方式简单方便; 外膜蛋白提取方法为细菌粗蛋白进行碳酸盐萃取或超速离心等操作获得膜蛋白, 碳酸盐萃取方法相比较为复杂, 所以超速离心法在膜蛋白提取中较为常用; 分泌蛋白制备将过滤或者离心后分离菌体的菌液添加三氯乙酸或者丙酮来沉淀蛋白, 此方法简单方便、处理时间较短、蛋白提取质量与碳酸盐萃取相似。

本文综述了细菌蛋白质组样品制备的方法及对其鉴定结果的影响, 虽然现在蛋白制备方法众多, 但因样品的复杂性仍需要探究、筛选和优化蛋白制备方法, 从而为揭示细菌蛋白组成和表达提供了科学基础。

参考文献

- [1] CARVALHO VPD, GRASSI ML, PALMA CDS, *et al.* The contribution and perspectives of proteomics to uncover ovarian cancer tumor markers [J]. *Transl Res*, 2019, 206: 71–90.
- [2] ZHONG W, EDFORS F, GUMMESSON A, *et al.* Next generation plasma proteome profiling to monitor health and disease [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1–12.
- [3] SHI X, WANG X, CHENG F, *et al.* iTRAQ-based quantitative proteomics analysis of cold stress-induced mechanisms in grafted watermelon seedlings [J]. *J Proteomics*, 2019, 192: 311–320.
- [4] 周盈, 魏文静, 江宝怡, 等. START 家族 Rv0164 蛋白在耻垢分枝杆菌中的表达及垂钩互作蛋白[J]. *微生物学报*, 2020, 60(3): 464–475.
ZHOU Y, WEI WJ, JIANG BY, *et al.* Expression of START family Rv0164 protein in *Mycobacterium smegmatis* and its angling interaction protein [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2020, 60(3): 464–475.
- [5] COELHO C, BROWN L, MARYAM M, *et al.* *Listeria monocytogenes* virulence factors, including listeriolysin O, are secreted in biologically active extracellular vesicles [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(4): 1202–1217.
- [6] SWARGE B, ABHYANKAR W, JONKER M, *et al.* Integrative analysis of proteome and transcriptome dynamics during *Bacillus subtilis* spore revival [J]. *Mosphere*, 2020, 5(4): e00463–20.
- [7] YANG Q, DUAN S, CHENG L, *et al.* Proteomic characterization of *Bacillus subtilis* on bio-degumming of ramie bast [J]. *J Nat Fibers*, 2021: 1–18.
- [8] SULAIMAN JE, LAM H. Proteomic investigation of tolerant *Escherichia coli* populations from cyclic antibiotic treatment [J]. *J Proteome Res*, 2020, 19(2): 900–913.
- [9] MORI M, ZHANG Z, BANAEI-ESFAHANI A, *et al.* From coarse to fine: The absolute *Escherichia coli* proteome under diverse growth conditions [J]. *Mol Syst Biol*, 2021, 17(5): e9536.
- [10] UDDIN R, KHALIL W. A comparative proteomic approach using metabolic pathways for the identification of potential drug targets against *Helicobacter pylori* [J]. *Genes Genom*, 2020, 42(5): 519–541.
- [11] LU Y, PANG J, WANG G, *et al.* Quantitative proteomics approach to investigate the antibacterial response of *Helicobacter pylori* to daphnetin, a traditional Chinese medicine monomer [J]. *RSC Adv*, 2021, 11(4): 2185–2193.
- [12] PISANU S, CACCIOTTO C, PAGNOZZI D, *et al.* Impact of *Staphylococcus aureus* infection on the late lactation goat milk proteome: New perspectives for monitoring and understanding mastitis in dairy goats [J]. *J Proteom*, 2020, 221: 103763.
- [13] MUHAMMAD TUQ, AHMAD S, FATIMA I, *et al.* Designing multi-epitope vaccine against *Staphylococcus aureus* by employing subtractive proteomics, reverse vaccinology and immuno-informatics approaches [J]. *Comput Biol Med*, 2021, 132: 104389.
- [14] BEZRUKOV F, PRADOS J, RENZONI A, *et al.* MazF toxin causes alterations in *Staphylococcus aureus* transcriptome, translome and proteome that underlie bacterial dormancy [J]. *Nucl Acid Res*, 2021, 49(4): 2085–2101.
- [15] MÖLLER J, NOSRATABADI F, MUSELLA L, *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* proteome adaptation to cell culture medium and serum [J]. *Proteomes*, 2021, 9(1): 14.
- [16] QIN X, HE S, ZHOU X, *et al.* Quantitative proteomics reveals the crucial role of YbgC for *Salmonella enterica* serovar enteritidis survival in egg white [J]. *Int J Food Microbiol*, 2019, 289: 115–126.
- [17] CHEN SH, PARKER CH, CROLEY TR, *et al.* Genus, species, and subspecies classification of *Salmonella* isolates by proteomics [J]. *Appl Sci*, 2021, 11(9): 4264.
- [18] BRZOSTEK A, PLOCINSKI P, MINIAS A, *et al.* Dissecting the RecA-(In) dependent response to mitomycin C in *Mycobacterium tuberculosis* using transcriptional profiling and proteomics analyses [J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1168.
- [19] GAUTAM S, SHARMA D, GOEL A, *et al.* Insights into *Mycobacterium leprae* proteomics and biomarkers—An overview [J]. *Proteomes*, 2021, 9(1): 7.
- [20] 金星, 贺禹丰, 周永华, 等. 具有高细胞黏附性及高生物膜形成能力的植物乳杆菌有效抑制小鼠体内空肠弯曲杆菌毒力因子的转录活性 [J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(14): 12–18.
JIN X, HE YF, ZHOU YH, *et al.* *Lactobacillus plantarum* with high cell adhesion and high biofilm formation ability effectively inhibits the transcriptional activity of *Campylobacter jejuni* virulence factors in mice [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(14): 12–18.
- [21] RAGHUNATHAN S, JAGANADE T, PRIYAKUMAR UD. Urea-aromatic interactions in biology [J]. *Biophys Rev*, 2020, 12(1): 65–84.
- [22] 牟永莹, 王道平, 陈明, 等. 大豆种子蛋白质组样品制备与数据分析方法[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(12): 247.
MOU YY, WANG DP, CHEN M, *et al.* Sample preparation and data analysis method of soybean seed proteome [J]. *Bio Bull*, 2020, 36(12): 247.
- [23] 周春霞, 冯瑞, 李婷, 等. 低盐条件下 SDS 对罗非鱼肌球蛋白热聚集的抑制及其机理[J]. *广东海洋大学学报*, 2020, 40(4): 82–89.

- ZHOU CX, FENG R, LI T, *et al.* Inhibition of SDS on tilapia myosin thermal accumulation and its mechanism under low salt conditions [J]. *J Guangdong Ocean Univ*, 2020, 40(4): 82–89.
- [24] SUSILA H, NASIM Z, JIN S, *et al.* Profiling protein–DNA interactions by chromatin immunoprecipitation in arabidopsis [J]. *Prot Prof*, 2021. DOI: 10.1007/978-1-0716-1186-9_21
- [25] 王秋萍, 臧凯丽, 赵林森, 等. 三种植物源增殖性底物对嗜酸乳杆菌发酵及蛋白表达的影响[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(7): 144–149.
- WANG QP, ZANG KL, ZHAO LS, *et al.* Effects of three plant-derived proliferative substrates on fermentation and protein expression of *Lactobacillus acidophilus* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2019, 40(7): 144–149.
- [26] 于海天, 阿新祥, 刘自单, 等. 白叶枯病菌胞内蛋白的提取及电泳分离方法的构建[J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, (1): 195–202.
- YU HT, A XX, LIU ZD, *et al.* Extraction of intracellular proteins from bacterial blight and construction of electrophoretic separation method [J]. *Genom Appl Biol*, 2015, (1): 195–202.
- [27] 聂丽, 游思远, 樊聪静, 等. 高效诱导子的制备方法及其诱导成分研究[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(4): 90–93.
- NIE L, YOU SY, FAN CJ, *et al.* Study on the preparation method and inducing components of high-efficiency elicitor [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2018, 46(4): 90–93.
- [28] 王国勤. 马链球菌马亚种新疆分离株菌体蛋白的粗提取及免疫效果初步评估[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015.
- WANG GQ. Crude extraction of bacterial protein of *Streptococcus equi* subsp. equine Xinjiang isolate and preliminary evaluation of its immune effect [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2015.
- [29] 谢宇舟, 李军, 冯世文, 等. 副猪嗜血杆菌菌体蛋白的提取及蛋白质双向电泳方法建立[J]. *中国兽医杂志*, 2017, 53(6): 46–49.
- XIE YZ, LI J, FENG SW, *et al.* Extraction of *Haemophilus parasuis* bacterial protein and establishment of two-dimensional gel electrophoresis method [J]. *Chin J Vet Med*, 2017, 53(6): 46–49.
- [30] 陈杰豪, 缪玉佳, 梁超, 等. 山姜素对鱼源耐药性嗜水气单胞菌体外抗菌作用的研究[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(2): 103.
- CHEN JH, MIAO YJ, LIANG C, *et al.* Study on the antibacterial mechanism of alpinetin against fish-derived drug-resistant *Aeromonas hydrophila in vitro* [J]. *Bio Bull*, 2021, 37(2): 103.
- [31] KIELKOPF CL, BAUER W, URBATSCH IL. Preparation of cell extracts for purification of soluble proteins expressed in *E. coli* [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2021, 2021(2): 102178.
- [32] 唐禄, 董丽平, 尹茉莉, 等. 成纤维细胞生长因子 20 单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(10): 179.
- TANG L, DONG LP, YIN ML, *et al.* Preparation and identification of monoclonal antibodies against fibroblast growth factor 20 [J]. *Bio Bull*, 2021, 37(10): 179.
- [33] 周敏, 陆维克, 陆金山, 等. 超高压处理对副溶血性弧菌胞内蛋白质的影响[J]. *食品科学*, 2017, 38(1): 99–104.
- ZHOU M, LU WK, LU JJ, *et al.* Effects of ultra-high pressure treatment on intracellular proteins of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Food Sci*, 2017, 38(1): 99–104.
- [34] HABERL-MEGLIĆ S, LEVIČNIK E, LUENGO E, *et al.* The effect of temperature and bacterial growth phase on protein extraction by means of electroporation [J]. *Bioelectrochemistry*, 2016, 112: 77–82.
- [35] 王晓敏, 董璐, 张继福, 等. 细胞破碎方法对 *Bacillus* sp. DL-2 胞内蛋白酶拆分乙酸苏合香酯的影响[J]. *热带海洋学报*, 2021, 40(2): 39–48.
- WANG XM, DONG L, ZHANG JF, *et al.* The effects of different cell breaking methods on the asymmetrical hydrolysis of phenylethyl acetate using intracellular proteases of *Bacillus* sp. DL-2 [J]. *J Trop Oceanogr*, 2021, 40(2): 39–48.
- [36] MEDINA LMP, BECKER AK, MICHALIK S, *et al.* Metabolic cross-talk between human bronchial epithelial cells and internalized *Staphylococcus aureus* as a driver for infection [J]. *Mol Cell Proteom*, 2019, 18(5): 892–908.
- [37] TANCA A, PALOMBA A, PISANU S, *et al.* A straightforward and efficient analytical pipeline for metaproteome characterization [J]. *Microbiome*, 2014, 2(1): 1–16.
- [38] 李贞彪, 王军节, 王鹏. 适用于双向电泳分析的格酪孢菌体蛋白提取方法的筛选[J]. *植物保护*, 2019, 45(3): 138–144.
- LI ZB, WANG JJ, WANG P. Screening of *Alternaria spore* protein extraction methods suitable for two-dimensional electrophoresis analysis [J]. *Plant Prot*, 2019, 45(3): 138–144.
- [39] 舒灿伟, 陈健仪, 赵美, 等. 一种优化的适用于双向电泳的水稻纹枯病菌蛋白质提取方法[J]. *华中农业大学学报*, 2017, (5): 15–19.
- SHU CW, CHEN JY, ZHAO M, *et al.* An optimized two-dimensional electrophoresis method for protein extraction of *Rhizoctonia solani* [J]. *J Agric Univ China*, 2017, (5): 15–19.
- [40] ZHANG X, NING Z, MAYNE J, *et al.* MetaPro-IQ: A universal metaproteomic approach to studying human and mouse gut microbiota [J]. *Microbiome*, 2016, 4(1): 1–12.
- [41] DU H, ZHOU L, LU Z, *et al.* Transcriptomic and proteomic profiling response of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to a novel bacteriocin, plantaricin GZ1-27 and its inhibition of biofilm formation [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(18): 7957–7970.
- [42] BLANKENBURG S, HENTSCHKER C, NAGEL A, *et al.* Improving proteome coverage for small sample amounts: An advanced method for proteomics approaches with low bacterial cell numbers [J]. *Proteomics*, 2019, 19(23): 190–192.
- [43] LIPPOLIS JD, BAYLES DO, REINHARDT TA. Proteomic changes in *Escherichia coli* when grown in fresh milk versus laboratory media [J]. *J Proteom Res*, 2009, 8(1): 149–158.
- [44] 杨加亮, 田云恒, 马爱民. 虎奶菇 Mn-SOD 提取, 鉴定及基因的克隆[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(15): 150–157.
- YANG JL, TIAN YH, MA AIM. Extraction, identification and gene cloning of Mn-SOD from *Pleurotus ostreatus* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(15): 150–157.
- [45] SATALA D, KARKOWSKA-KULETA J, ZELAZNA A, *et al.* Moonlighting proteins at the candidal cell surface [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(7): 1046.
- [46] GORASIA DG, VEITH PD, REYNOLDS EC. The type IX secretion system: Advances in structure, function and organisation [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(8): 1173.
- [47] FERESHTEH S, ABDOLI S, SHAHCHERAGHI F, *et al.* New putative vaccine candidates against *Acinetobacter baumannii* using the reverse vaccinology method [J]. *Microb Pathog*, 2020, 143: 104114.
- [48] 戴甜. 乳酸杆菌表面蛋白 GAPDH 粘附粘液素介导肠道定植的研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2019.

- DAI T. Study on intestinal colonization mediated by the adhesion of *Lactobacillus* surface protein GAPDH to mucin [D]. Hangzhou: Zhejiang Agriculture and Forestry University, 2019.
- [49] 孙艳菲, 陈瑞, 王露, 等. 戊糖片球菌表面蛋白性质及抑菌作用研究[J]. 食品科学技术学报, 2019, 37(1): 54–61.
- SUN YF, CHEN R, WANG L, *et al.* Surface protein properties and antibacterial effects of *Pediococcus pentosaceus* [J]. J Food Sci Technol, 2019, 37(1): 54–61.
- [50] 徐晨静, 吴瑶, 蒋建霞, 等. 幽门螺杆菌外膜蛋白及其毒力的研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2020, 24(9): 127–132.
- XU CJ, WU Y, JIANG JX, *et al.* Research progress of *Helicobacter pylori* outer membrane protein and its virulence [J]. J Clin Med Pract, 2020, 24(9): 127–132.
- [51] BOUSSAMBE GNM, GUILLET P, MAHLER F, *et al.* Fluorinated diglucose detergents for membrane-protein extraction [J]. Methods, 2018, 147: 84–94.
- [52] 李德龙, 谷九龙, 徐兴胜, 等. 与鸭 C4 结合蛋白互作的鸭疫里默菌外膜蛋白的筛选及鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(11): 2825–2835.
- LI DL, GU JL, XU XS, *et al.* Screening and identification of R. anatipestifer outer membrane protein that interacts with duck C4 binding protein [J]. Acta Vet et Zootech Sin, 2020, 51(11): 2825–2835.
- [53] LAI EM, NAIR U, PHADKE ND, *et al.* Proteomic screening and identification of differentially distributed membrane proteins in *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 2004, 52(4): 1029–1044.
- [54] KOIKE H, KANDA M, HAYASHI H, *et al.* Quantification of *Staphylococcal* enterotoxin type A in cow milk by using a stable isotope-labelled peptide via liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. Food Addit Contam A, 2019, 36(7): 1098–1108.
- [55] 朱平川, 李康佳, 东昱汝, 等. 水稻细菌性条斑病菌中分泌蛋白质组表达谱的研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(8): 3394–3400.
- ZHU PC, LI KJ, DONG YR, *et al.* Study on the expression profile of the secreted proteome of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* [J]. Genomics Appl Biol, 2018, 37(8): 3394–3400.
- [56] 徐久翔, 郭斯宇, 钱衍宽, 等. 短乳杆菌 49 蛋白提取及酶解条件优化[J]. 质谱学报, 2019, 40(4): 325–334.
- XU JX, GUO SY, QIAN YN, *et al.* Optimization of *Lactobacillus brevis* 49 protein extraction and enzymatic hydrolysis conditions [J]. J Chin Mass Spectrom Soc, 2019, 40(4): 325–334.
- [57] 胡古月. 牛支原体强弱菌株分泌蛋白的分离和初步鉴定研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- HU GY. Isolation and preliminary identification of secreted proteins of *Mycoplasma bovis* strong and weak strains [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018.
- [58] POCSFALVI G, CACACE G, CUCCURULLO M, *et al.* Proteomic analysis of exoproteins expressed by enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains [J]. Proteomics, 2008, 8(12): 2462–2476.
- [59] ALSAHAG M. Isolation, purification and identification of CFP29 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv culture filtrate proteins [J]. Egypt Acad J Biol Sci, 2021, 13(2): 189–198.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



厉彦鑫, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物蛋白组学。

E-mail: liyanxin98@163.com



都启晶, 博士, 讲师, 主要研究方向为乳品营养与安全。

E-mail: qijingdu@163.com