

文章编号: 1004-0374(2012)01-0100-06

元蛋白质组学在微生物功能研究中的应用

胡小丽, 王加启*, 赵圣国

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 后基因组时代, 仅依靠基因组方法来研究原位微生物群落的功能已远远不够, 在这种背景下元蛋白质组学研究逐渐兴起。应用元蛋白质组学技术可大规模研究原位微生物群落的蛋白质表达, 分析生态系统中微生物的功能, 寻找新的功能基因和代谢通路, 为微生物群体的基因和功能多样性研究提供数据。同时, 还可鉴定与微生物功能相关的蛋白质, 这些蛋白质未来可以作为生物标记物为环境可持续发展铺路。综述了元蛋白质组学的发展概况及其在微生物功能研究中的重大作用, 强调了元蛋白质组学方法在分析新功能基因及其相关基因, 揭示微生物多样性与微生物群体功能之间的关系等方面起到的作用, 并对其应用前景进行了展望。

关键词: 元蛋白质组学; 微生物群落; 功能

中图分类号: Q938; Q816 文献标志码: A

Application of metaproteomics for studying functional microbial

HU Xiao-Li, WANG Jia-Qi*, ZHAO Sheng-Guo

(Institute of Animal Science, State Key Lab of Animal Nutrition, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100193, China)

Abstract: In the postgenomic era, there is a clear recognition of the limitations of nucleic acid-based methods for getting information on functions expressed by microbial communities *in situ*. In this context, metaproteomics approaches appear to solve the limitation of metagenomics, the large-scale study of proteins expressed by indigenous microbial communities should provide information to gain insights into the functioning of the microbial component in ecosystems, track new functional genes and metabolic pathways, and provide data linking genetic and functional diversity of microbial communities. Metaproteomics is expected to identify proteins preferentially associated with specific function. These proteins are considered as functional bioindicators should contribute, in the future, to help policy makers in defining strategies for sustainable management of our environment. This review tracked the origin of metaproteomics, laid emphasis on the function of metaproteome analysis on describing new functional genes and their related genes, revealing microbial taxonomic diversity and the functionality of microbial communities in complex environments. At last the situation of application of metaproteomics in studying functional microbial was also discussed in the dissertation.

Key words: metaproteomics; microbial communities; function

微生物是地球环境的重要组成成份, 对现今环境条件的塑造起到了主要作用。它们是生物地理化学的主要驱动者, 在营养循环、污染物的降解等方面发挥着重要的作用。微生物酶在其中扮演着极为重要的角色, 大部分重要反应都由微生物酶催化产生, 这些由个体蛋白质组成、数量巨大的酶被称作催化剂, 它们维持着地球环境的动态平衡^[1]。因此,

研究生态环境中的微生物蛋白具有很重要的意义。

后基因组时代, 许多研究都将关注的重点转移

收稿日期: 2011-07-01; 修回日期: 2011-08-21

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)
(2011CB100804)

*通信作者: E-mail: wang-jia-qi@263.net; Tel: 010-62890458; Fax: 010-62897587

到功能基因表达产物上。对微生物研究来说, 由于“元基因组学”方法较难纯培养微生物, 使得其应用受到了很多限制。而纯培养技术只能培养环境中约 1% 的微生物, 多达 99% 的微生物在现有实验条件下仍不能进行纯培养^[2], 因而难以充分认识微生物生态环境。元基因组学(未培养微生物的基因组分析)的出现弥补了纯培养方法的不足, 直接推动了环境微生物测序工程的展开, 并已获得大量微生物群落的元基因组序列信息^[3]。但这种方法不能分析复杂环境条件下环境微生物的基因特异性表达及其功能, 而这种信息正是微生物研究中最重要的一部分^[4]。近几年来, 随着生物信息技术和蛋白质组学技术的发展, 人们逐渐利用元蛋白质组学方法研究微生物群体蛋白质组成, 逐步扩大了对微生物遗传和功能多样性的认知范围, 复杂生物过程的分子机制也逐渐明朗。

1 元蛋白质组学的起源

蛋白质组学出现于 20 世纪 70 年代中期, 当时主要采用二维(2-D)电泳构建蛋白质表达谱^[5]。1994 年, Wilkins 和 Willhams 提出了蛋白质组(proteome)的概念, 并将其定义为“一个基因组、细胞、组织或机体在特定时刻所表达的全部蛋白质”^[6]。从 90 年代开始, 蛋白质组学研究取得了飞速发展, 随着高效肽电离技术和质谱技术(mass spectrometry, MS)的发展, 已经实现了高效高灵敏度蛋白质鉴定^[7]。与此同时, 生物信息技术也在 2-D 电泳和 MS 分析中得到广泛应用, 包括鉴定蛋白质(将 MS 数据与数据库进行比对)、运用反向遗传学分析相关基因特征、分析翻译后修饰过程^[8]等方面。过去 10 年中, 随着完成全基因组测序个体数目的不断增加, 蛋白质组学技术也不断发展, 目前已经可以将后基因组学技术——尤其是蛋白质组学技术应用于复杂微生物群落研究^[9]。

“元蛋白质组学”一词由 Wilmes 和 Bond^[9]首次提出, 他们将其定义为“特定时间点内, 环境微生物所有蛋白质成分的总和”。蛋白质, 尤其是酶类参与生命有机体的生物转化过程, 而元蛋白质组学是构建微生物功能动力学最恰当、最全面的方法, 也是了解代谢组学调节机制(生态系统中所有微生物的总代谢物信息)最重要的一步。

2 元蛋白质组学在微生物研究中的优势

微生物研究可依赖于元基因组学、元转录组学

和元蛋白质组学等多种途径。元基因组学以环境样品中的微生物群体基因组为研究对象, 以功能基因筛选和测序分析为研究手段, 将微生物多样性、种群遗传结构与其功能联系起来^[10]。但该技术手段在微生物功能研究方面都存在限制: 环境 DNA 的提取仍需要改善, 必须提高提取 DNA 的纯度, 进一步满足构建文库的需要; 克隆的表达效率非常低, 要提高筛选完整功能基因簇的效率, 需要构建大片段的元基因组文库^[11]。

与元基因组学方法相比, 元转录组学(生态系统中所有微生物的总 RNA 信息)和元蛋白质组学技术能分析各种环境条件下微生物的生理变化(如图 1 所示)^[11], 但 RNA 极易降解、萃取过程中产生的腐殖质难以消除、不同群落中相似基因转录动力学不同、RNA 水平与相关蛋白合成相关性低等因素阻碍了对原位微生物群落的元转录组学研究^[12]。元蛋白质组学, 其目的是分析混合微生物群体中的蛋白质, 可以对转录组学起到补充促进作用, 对于研究微生物群体的限制性较小。元蛋白质组学也可以检测复杂生物途径中的新基因, 通过非标记的方法鉴定出生物化学过程中的蛋白质, 然后通过反向遗传学推测氨基酸序列获得相应的编码基因信息, 最终用于开发 DNA/RNA 探针, 追踪复杂环境中相关微生物群体的功能^[12]。元蛋白质组学方法可以将元基因组数据、分类多样性、功能多样性和自然环境的生物过程联系在一起。元蛋白质组学的最大优点是不必预先筛选出环境中可能存在的功能基因产物, 而且随着多肽测序技术的发展, 元蛋白质组学在蛋白质鉴定、种系发生以及微生物群体的功能性分析等方面都更具优势。

3 元蛋白质组学研究策略

元蛋白质组学与经典蛋白质组学研究的思路基本相同, 涉及微生物蛋白质提取、蛋白质分离和蛋白质鉴定与分析等步骤(图 1)。

3.1 蛋白质提取技术

元蛋白质组学研究最重要的步骤是确保提取的蛋白质在质量和数量上都具有代表性。这在环境蛋白质组学研究中尤为重要, 因为原位微生物群体与自然环境都极其复杂, 尤其是土壤和一些干扰复合物(酚复合物、腐植酸等)的存在使得获取恰当的蛋白质分析样品难上加难。根据目的蛋白的不同(例如, 原核/真核、细胞外/胞内)、后续分析方法的不同(例如, 2-D 比较蛋白质图谱或测量/检测特

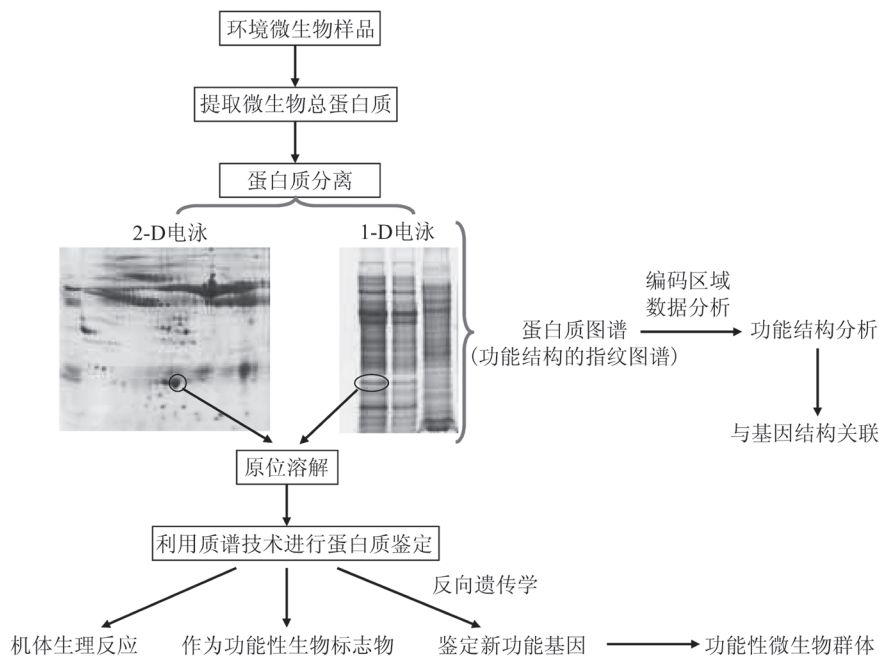


图1 元蛋白质组学研究的基本途径与预期结果

定多肽或测量/检测酶活性),其提取方法也各异^[12]。

3.1.1 直接溶解法

要完全获取环境中的蛋白质(胞内+胞外),可直接将有机质溶解在环境基质中。许多研究者采用这种方法都成功对不同环境进行了元基因组学分析,例如自然微生物的生物膜^[13]、水^[14-16]、沉淀物^[14]、土壤^[14,17]以及活性污泥^[9]等。从这些研究中可以看出,元基因组中蛋白质补体非常复杂,而且受地理环境^[14]和气候状况^[15,17]等影响。因此,可采用原位溶解法从固有细菌、酵母、原虫以及多细胞生物中完全获得其总蛋白质;但由于一些干扰复合物的存在,要将直接溶解法应用于自然环境微生物,并利用现有生物化学方法分析其蛋白质组学信息较为困难。

3.1.2 间接溶解法

首先从环境基质中萃取出有机体,再从中提取、纯化和分离蛋白质^[18-20]。这种方法可以精确地标记细菌物质,在几乎不被土壤化合物污染的条件下获得细胞物质;但细菌萃取率取决于环境基质的物理化学性质,这也决定了后续回收微生物蛋白质时采用定量还是定性方法^[21]。Ehlers和Clote^[18]利用这种方法证明了21种不同活性污泥系统在功能上相近,而这21种系统在设计 and 脱磷强度上均不同,此外汞和镉污染会引起淡水的元蛋白质组学特征发生改变。

3.2 蛋白质分离技术

获取蛋白质样品后,即可根据获取信息的不同以及研究程度的不同,采取不同的方法分离蛋白质,目前主要采用双向电泳和色谱技术^[10]。要通过非标记方法获取微生物群体的“蛋白质指纹图谱”,必须通过1-D或者2-D电泳分离蛋白质(图1)。2-D电泳对蛋白质的分离效果较好,而且有利于下一步进行MS分析,以及后续利用MS数据与数据库比对进行肽段鉴定。但是这种技术也有其局限性,例如不能检测低丰度^[22]、高疏水性、高酸性和基础蛋白的表达^[23]。基于以上原因,2-D电泳也被称为“蛋白质组学的薄弱环节”。在这种背景下,必须有选择地使用各种分离方法。蛋白质组学领域内已出现了若干新技术,例如色析法/毛细管电泳分离法^[7]以及蛋白质微阵列法^[24-25]。应用这些最新方法能够对复杂的蛋白质混合物进行高通量分析,有利于蛋白质组学在环境微生物研究中发挥作用。

3.3 蛋白质鉴定与分析

蛋白质的鉴定主要依赖于质谱技术。比较常用的质谱技术包括基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)、电喷雾质谱(electrospray ionisation mass spectrometry, ESI MS)、四级杆-飞行时间串联质谱(quadrupole time of-flight mass spectrometry, Q-TOF-MS)以及串联质谱

(MS/MS) 等^[10]。在蛋白质库中, 通过同位素标记可以检测响应某种条件而合成的蛋白质^[16,26], 方法包括在丙烯酰胺凝胶上分离后通过自动射线照相技术进行检测^[15], 或者也可以通过免疫学方法来检测, 对复杂环境(例如土壤)中的蛋白质进行量化^[19-20]。通过蛋白质定量可以窥见微生物群体的功能信息(例如某特定时刻遗传潜力表达水平)。但是, 这种方法受到不同微生物群体中特定功能蛋白质(例如异化硝酸还原酶)的抗体标记特异性的限制^[20,27], 同时还受到少数具有生物催化功能的酶(例如氮循环中的酶)影响。特定肽段可依据其代谢活性, 通过环境蛋白质免疫印迹法以及染色法来鉴定^[15,28-29]。这种方法要求保持酶的分解代谢能力, 即采用温和、非变性蛋白提取步骤, 从而精确地分离出环境中的目的蛋白^[12]。

对特定环境或受环境刺激后产生的蛋白质鉴定完毕后, 还需要将这些蛋白质与相关基因联系起来, 这也是元蛋白质组学最终目的之一。将经过质谱技术所鉴定的蛋白质序列输入数据库进行检索即可获得目的蛋白的相关信息, 但目前蛋白质数据库中的蛋白质大多来源于已培养微生物, 数据库中包含的未培养微生物蛋白质的信息非常少, 这是目前元蛋白质组学研究面临的一个重大问题^[10]。

4 元蛋白质组学的应用

4.1 元蛋白质组学在环境污染治理中的应用

元蛋白质组学也可以分析活性污泥废水处理系统的生物除磷过程中的代谢信息^[9,30]。有一项研究比较了两种不同活性污泥(其中一种 EBPR 功能较强, 另一种较弱)在厌氧和有氧阶段的元蛋白质组表达情况。结果表明, 优质污泥(由典型红环菌类 PAOs 控制)在厌氧-有氧交替循环过程中的交替次数并没有劣质污泥多^[30]。

Wilmes 和 Bond^[29]从实验室的活性污泥系统中成功地提取和纯化出其中的总蛋白。用 MALDI-TOF 质谱分析法和从头多肽测序法鉴定出高表达蛋白点。根据分析结果可以推出分离出的蛋白质中包括一种外膜蛋白、乙酰辅酶 A 乙酰转移酶和一种由 ABC-型支链氨基酸转移系统组成的蛋白质。Wilmes 等^[31]后来又采用双向电泳与质谱技术鉴定出与生物除磷过程相关的蛋白 46 个, 这些蛋白可能分别参与糖原的合成与分解、三羧酸循环、脂肪酸的合成等生化反应。

此外, 将环境蛋白质组学与功能基因组学结合

在一起, 也可应用于环境污染物质的生物治理过程中, 揭示参与芳香烃降解和重金属转化过程的新基因或蛋白质, 为环境生物治理铺路^[32]。

4.2 元蛋白质组学技术在水微生物研究中的应用

元蛋白质组学可以分析水微生物群落的组成和蛋白质功能。Kan 等^[33]应用元蛋白质组学方法首次对水生微生物——切萨皮克湾的微生物群落的蛋白表达情况进行了研究。结果表明, 该地区微生物所有蛋白点中, 中度重复蛋白约占 92%, 其中 30%~70% 与常见蛋白点相同。用液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography mass spectrography, LC-MS/MS) 测序结合 MSBLAST 搜索比对法检测出 3 种蛋白质, 均源自海洋微生物, 且与切萨皮克湾微生物、拟杆菌属和 α -变形菌高度相关。

Schulze 等^[27]采用质谱技术分析不同来源水(沼泽、落叶林土壤、云杉林土壤和云杉林下层酸性土壤)的元蛋白质组, 表明沼泽水中 78% 的蛋白质是细菌性的; 而在落叶林土壤滤液中, 植物、真菌和脊椎动物来源的蛋白质数量大约是沼泽中的两倍。将检测到的所有酶类与已知酶进行比较, 发现沼泽中的蛋白质与落叶林中存在差异。

Baker 等^[34]运用比较元蛋白质组学方法, 对南大西洋 10 个不同区域样品表层水膜蛋白进行研究分析, 探究海洋微生物群落在营养物质利用和能量转换上的变化, 发现不同蛋白质在沿海水域与公海水域含量存在差异, 从中分离出的优势膜蛋白 (19%) 为 TonB 依赖性转运蛋白 (TBDTs)。此外, 还从各样品中鉴定出一些病毒蛋白质, 从上升流区域鉴定出古细菌氢氧化酶蛋白, 表明古细菌在富含养分的表层水域中是重要的硝化细菌。

4.3 元蛋白质组学在胃肠道微生物研究中的应用

元蛋白质组学在人体和动物胃肠道微生物功能研究中应用也较多。Klaassens 等^[35]首次将元蛋白质组学研究方法, 包括 2-D 电泳和 MALDI-TOF-MS 法, 应用于分析大量未培养的婴儿粪便微生物。该研究表明, 随着时间的变化, 粪便微生物元蛋白质组图谱随之变化, 蛋白质点中包含一段与双歧杆菌转酰酶高度相似的肽序列。Verberkmoes 等^[36]利用元蛋白质组学技术研究幼儿双胞胎各自排泄物中蛋白质的表达情况, 并以此推测人体肠道微生物的代谢情况, 结果发现元蛋白质组学相对于元基因组学呈非正态分布。Rudney 等^[37]应用三维肽段分离技术与串联质谱技术对分别取自口腔癌患者与正常人群的唾液样品微生物进行元蛋白质组分析, 并根

据蛋白质理化性质差异分离鉴定出 7 000 个多肽, 其中 357 个多肽与微生物起源相关。研究通过系统进化方法分析这些多肽, 发现其主要属细菌类群。

4.4 提供生物标志物

目前, 人们已越来越关注人类活动对环境造成的影响。在这种背景下, 亟需一种能够描述环境动力学特征和可持续性特征的生物标志物 (biomaker), 而元蛋白质组学即可作为鉴定功能性微生物行之有效的办法。Singleton 等^[38]曾采用整体法对土壤总蛋白进行定量, 证明镉污染会导致土壤蛋白质含量显著下降。由此可以推测对蛋白质进行定性分析有利于寻找更灵敏的更具特异性的生物标志物。

2-D 凝胶电泳技术可以分析固有微生物群落的总蛋白库, 并绘制蛋白质指纹图谱^[12]。根据环境条件的不同, 蛋白质指纹图谱也会随之发生一些变化, 环境条件的小变异会促进或抑制特定蛋白的表达, 据此可将这些蛋白质作为生物标志物, 分析其灵敏度、特异性 (环境条件发生小变异时) 及在不同环境中的普遍性, 将其应用于一些简易、快速、高灵敏度的试验, 通过免疫学方法和 (或) 蛋白质芯片技术来评估环境条件变化对生态系统功能的影响^[39]。

4.5 追踪新功能基因和复杂代谢途径

元蛋白质组学也可以检测复杂生物途径中的新基因。绝大部分功能基因编码的酶都可以催化一些简单反应, 例如氮循环中的一些反应, 可将这些基因作为遗传标记分析特定微生物群体的结构; 但是这种方法仅限于少数功能基因, 不利于分析复杂生物途径中繁杂多样的基因, 尤其是复杂生物化学循环 (例如碳循环) 中涉及的基因。在这种背景下, 元蛋白质组学就表现出一定优势, 首先通过非标记的方法鉴定出某些生物化学过程中涉及的蛋白质, 然后通过反向遗传学推测氨基酸序列获得相应的编码基因信息, 最终用于开发 DNA/RNA 探针, 将分子生物学、生物化学、目标功能基因以及相关蛋白结合在一起, 追踪复杂环境中相关微生物群体的功能^[12]。

5 面临挑战与展望

与其他生物大分子不同, 蛋白质存在不同生物结构和物理构象, 因此不存在通用蛋白质提取技术。RNA 半衰期短以及萃取过程中产生的腐殖质难以消除, 决定了要从复杂环境 (例如从海水和土壤) 中完全提取蛋白质仍相当困难^[40]。根据现有数据对不同环境中原核生物多样性进行粗略计算, 发现现

行的元蛋白质组学方法仅能分析复杂环境 (例如海水和土壤) 中一小部分信息 (<1%)。而且, 除样品中的微生物呈现动态波动外, 同一细胞内的蛋白质表达水平可能出现 6 个数量级的差异^[39]。因此, 尽管元蛋白质组在微生物群落功能研究中发挥了重要作用, 但仍然存在很多有待解决的关键技术问题。

微生物群落对环境、医疗和工业都有着非常重要的意义, 而元蛋白质组学具有研究微生物群落功能信息的潜力^[40]。元蛋白质组学尚处于萌芽阶段, 尽管目前进行的元蛋白质组学研究较少, 但通过对生物化学循环中功能成分的深入探索, 元蛋白质组学必将为环境微生物功能研究开创新局面^[41]。

[参 考 文 献]

- [1] Wilmes P, Bond PL. Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends Microbiol*, 2006, 14(2): 92-7
- [2] Daniel R. The metagenomics of soil. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(6): 470-8
- [3] Schmeisser C, Stöckigt C, Raasch C, et al. Metagenome survey of biofilms in drinking water. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(12): 7298-309
- [4] 郝纯, 刘庆华, 杨俊仕, 等. 宏蛋白质组学: 探索环境微生物生态系统的功能. *应用与环境生物学报*, 2008, 14(2): 270-5
- [5] O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975, 250(10): 4007-21
- [6] Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Mol Biol Rev*, 2002, 66(1): 39-63
- [7] Yates JR 3rd, Speicher S, Griffin PR, et al. Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Anal Biochem*, 1993, 214(2): 397-408
- [8] Anderson LB, Maderia M, Ouellette AJ, et al. Post translational modifications in the CP43 subunit of photosystem II. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(23): 14676-81
- [9] Wilmes P, Bond PL. The application of 2D electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. *Environ Microbiol*, 2004, 6(9): 911-20
- [10] 刘虎虎, 田云, 卢向阳, 等. 宏蛋白质组学: 研究微生物群落的一种新策略. *微生物学杂志*, 2010, 30(5): 88-92
- [11] 魏力, 杨成运, 李友潮. 环境微生物群落功能研究的新方法和新策略. *生态学报*, 2008, 28(9): 4424-29
- [12] Maron PA, Ranjard L, Mougel C, et al. Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology. *Microb Ecol*, 2007, 53(3): 486-93
- [13] Ram RJ, Verberkmoes NC, Thelen MP, et al. Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science*, 2005, 308(5730): 1915-20
- [14] Ogunseitian OA. Direct extraction of proteins from environmental samples. *J Microbiol Methods*, 1993, 17(4):

- 273-81
- [15] Ogunseitan OA. Protein profile variation in cultivated and native freshwater microorganisms exposed to chemical environmental pollutants. *Microb Ecol*, 1996, 31(3): 291-304
- [16] Ogunseitan OA. Direct extraction of catalytic proteins from natural microbial communities. *J Microbiol Methods*, 1997, 28(1): 55-63
- [17] Singleton I, Merrington G, Colvan S, et al. The potential of soil protein-based methods to indicate metal contamination. *Appl Soil Ecol*, 2003, 23(1): 25-32
- [18] Ehler MM, Cloete TE. Comparing the protein profiles of 21 different activated sludge systems after SDS-PAGE. *Water Res*, 1999, 33(5): 1181-6
- [19] Maron PA, Coeur C, Pink C, et al. Use of polyclonal antibodies to detect and quantify the NOR protein of nitrite oxidizers in complex environments. *J Microbiol Methods*, 2003, 53(1): 87-95
- [20] Maron PA, Richaume A, Potier P, et al. Immunological method for direct assessment of the functionality of a denitrifying strain of *Pseudomonas fluorescens* in soil. *J Microbiol Methods*, 2004, 58(1): 13-21
- [21] Maron PA, Schimann H, Brothier E, et al. Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation. *Eur J Soil Biol*, 2006, 42(2): 65-73
- [22] Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, et al. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(17): 9390-5
- [23] Lee KH. Proteomics: a technology-driven and technology limited discovery science. *Trends Biotechnol*, 2001, 19(6): 217-22
- [24] Espina V, Woodhouse EC, Wulkuhle J, et al. Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies. *J Immunol Methods*, 2004, 290(1-2): 121-33
- [25] Ramachandran N, Hainsworth E, Bhullar B, et al. Self-assembling protein microarrays. *Science*, 2004, 305(5680): 86-90
- [26] Goodlett DR, Yi EC. Stable isotopic labeling and mass spectrometry as a means to determine differences in protein expression. *Trends Anal Chem*, 2003, 22(5): 282-90
- [27] Schulze WX, Gleixner G, Kaiser K, et al. A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and of soil particles. *Oecologia*, 2005, 142(2): 335-43
- [28] Ogunseitan OA. Protein method for investigating mercuric reductase gene expression in aquatic environments. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(2): 695-702
- [29] Wilmes P, Bond PL. Towards exposure of elusive metabolic mixed-culture processes: the application of metaproteomic analyses to activated sludge. *Water Sci Technol*, 2006, 54(1): 217-26
- [30] Park C, Helm RF. Application of metaproteomic analysis for studying extracellular polymeric substances (EPS) in activated sludge flocs and their fate in sludge digestion. *Water Sci Technol*, 2008, 57(12): 2009-15
- [31] Wilmes P, Wexler M, Bond PL. Metaproteomics provides functional insight into activated sludge wastewater treatment. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1778
- [32] Zhao B, Poh CL. Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. *Proteomics*, 2008, 8(4): 874-81
- [33] Kan J, Hanson TE, Ginter JM, et al. Metaproteomic analysis of Chesapeake Bay microbial communities. *Saline Syst*, 2005, 1: 7
- [34] Baker BJ, Banfield JF. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 44(2): 139-52
- [35] Klaassens ES, de Vos WM, Vaughan EE. A metaproteomics approach to study the functionality of the microbiota in the human infant gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(4): 1388-92
- [36] Verberkmoes NC, Russell AL, Shah M, et al. Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiome. *ISME J*, 2009, 3(2): 179-89
- [37] Rudney JD, Xie H, Rhodus NL, et al. A metaproteomic analysis of the human salivary microbiota by three-dimensional peptide fractionation and tandem mass spectrometry. *Mol Oral Microbiol*, 2010, 25(1): 38-49
- [38] Singleton I, Merrington G, Colvan S, Delahunty JS. The potential of soil protein-based methods to indicate metal contamination. *Appl Soil Ecol*, 2003, 23(1): 25-32
- [39] Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*, 2003, 422(6928): 193-7
- [40] Ogunseitan OA, LeBlanc JF. Environmental proteomics: methods and applications for aquatic ecosystems. *Mol Microbiol Ecol Manual*, 2004, 1-2: 1027-44
- [41] 成妮妮, 郭春雷, 彭谦. 宏蛋白质组学——研究微生物群落基因表达的新技术. *微生物学通报*, 2007, 34(2): 347-9