

多维蛋白鉴别技术分析天蓝色链霉菌膜内侧蛋白质组

Analyses of *Streptomyces coelicolor* inner Membrane Proteome by Multidimensional Protein Identification Technology

石宣明^{1,2}, 罗元明¹, 张贵锋³, 苏志国³, 黄玉碧², 杨克迁^{1*}

SHI Xuan-Ming^{1,2}, LUO Yuan-Ming¹, ZHANG Gui-Feng³, SU Zhi-Guo³, HUANG Yu-Bi² and YANG Ke-Qian^{1*}

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 100080

2. 四川农业大学 玉米研究所, 雅安 625014

3. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080

1. State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

2. Institute of Maize Research, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

3. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

摘要 链霉菌是一类具有重要工业价值和复杂调控机制的微生物,天蓝色链霉菌是这个属的模式菌。已报道天蓝色链霉菌的蛋白组学的研究多采用二维聚丙烯酰胺凝胶电泳与基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱相结合的方法,但由于膜蛋白疏水性较强,天然丰度较低,此法得到的膜蛋白很少。用蛋白酶 K 保护/高 pH 蛋白酶 K 法制备链霉菌膜内侧蛋白组样品,并用多维蛋白鉴别技术进行分析,得到 154 个可能的膜内侧蛋白(包括膜内在蛋白和膜外周蛋白),其中含跨膜区的膜内在蛋白 44 个,含 3 个以上跨膜区的膜内在蛋白有 23 个。此外,还鉴定了一批膜内侧蛋白的亲水性肽段及其在膜上的拓扑位置。该结果有助于对天蓝色链霉菌的膜蛋白进行拓扑学分类和功能研究。

关键词 天蓝色链霉菌,多维蛋白鉴别技术,膜蛋白组,蛋白酶 K,质谱,拓扑学

中图分类号 Q51 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0814-06

Abstract *Streptomyces coelicolor* is the model species among streptomycetes. Until now, proteomic analyses of *S. coelicolor* have been conducted using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry method, few integral membrane proteins were identified due to the hydrophobic and low-abundance nature of these proteins. In this work, 154 possible inner membrane proteins from *S. coelicolor* were identified using high pH-proteinase K sample preparation method and multidimensional protein identification technology, among them 44 are integral membrane proteins containing at least one transmembrane domain, most peptides and their corresponding proteins were identified experimentally for the first time.

Key words *Streptomyces coelicolor*, MudPIT, membrane proteins, proteinase K, mass spectrometry, topology

Received: May 10, 2005; Accepted: June 20, 2005.

This work was supported by Knowledge Innovation Fund, Chinese Academy of Sciences.

* Corresponding author. Tel: 86-10-62653230; E-mail: yangkq@sun.im.ac.cn

中国科学院知识创新基金资助。

链霉菌(Streptomyces)是一类土壤中常见的革兰氏阳性菌,具有复杂的生活史和代谢调控网络^[1]。天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor* M145)是链霉菌属的模式菌,其基因组全序列已经于2002年完成,全长8.67 Mb,注释编码7825个蛋白质^[2],其中预测含跨膜区(transmembrane domain,TMD)的膜内在蛋白有1818个^[3]。对细胞结构而言,膜蛋白可分为两大类:即膜内在蛋白(integral membrane protein)和膜外周蛋白(peripheral membrane protein)。前者通过疏水作用与膜紧密结合,很难从膜上解离下来,根据拓扑取向可以进一步分成6类(Type I-VI),5类含有TMD,见图1,而后者以静电或氢键的弱相互作用与膜内在蛋白或膜脂的极性部分结合,较容易从膜上解离^[4];又可以分为膜内侧(inner)和外侧(outer)外周蛋白。本文描述的膜内侧蛋白质组包括膜内侧外周蛋白和内在蛋白。

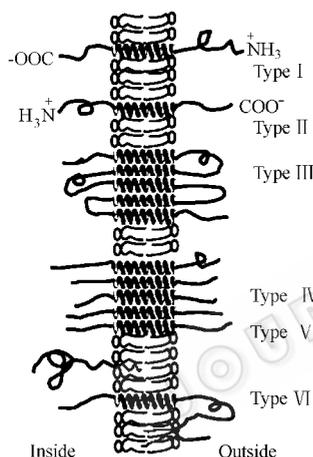


图1 参考 Lehninger《Principles of Biochemistry》分类的6类膜内在蛋白^[4]

Fig. 1 Six types of integral membrane proteins according to Lehninger Principles of Biochemistry^[4]

目前,蛋白质组研究最常用的是二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis 2D-PAGE)与基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry,MALDI-TOF-MS)相结合的方法。尽管该方法对分析可溶性蛋白十分有效,但在分析极端pI及极端分子量蛋白、低丰度蛋白和膜蛋白时,有很大局限性。为了克服上述局限性,Yates研究组首先发展了多维液质联用(LC-MS/MS)的蛋白随机肽段鉴别方法^[5],并以此为基础发展成为多维蛋白鉴别技术(multidimensional protein identification technology,MudPIT)^[6]。MudPIT法是指用特定蛋白酶酶解待分析的样品,产生长度

合适的肽段混合物,通过多维液相色谱进行分离(通常用阳离子交换柱和反相柱进行二维分离),将分离后的肽用电喷雾离子质谱仪或其它质谱仪进行串联质谱分析,将产生的MS/MS图谱进行数据库搜索,从而鉴别出样品中的蛋白质。Yates组用此法鉴别了131个含3个以上TMD的酵母膜内在蛋白,进一步表明,MudPIT可以对膜蛋白组进行较为全面的分析。该方法还有高度自动化、低劳动强度,可以进行数据依赖的翻译后修饰的鉴别等优势^[7]。

已报道链霉菌蛋白质组分析也采用了2D-PAGE/MALDI-TOF-MS法,鉴别到的膜蛋白很少^[8,9]。本文首次采用MudPIT法对链霉菌的膜内侧蛋白质组进行分析。通过蛋白酶K(proteinase K,PK)保护/高pH蛋白酶K(high pH-proteinase K,hpPK)法^[7]制备链霉菌膜内侧蛋白质组混合肽样品,用二维液质联用串联质谱(LC-MS/MS)进行分析,所得数据用SEQUEST软件对NCBI的天蓝色链霉菌蛋白质序列数据库进行搜索,鉴别出较多膜内侧蛋白,并得到了有利于描绘膜蛋白拓扑学结构的部分肽序列^[7,10],对探索链霉菌的代谢调控机理和膜蛋白的结构、功能具有重要意义。链霉菌是工业生产小分子产物,如抗生素的有工业价值的菌种,膜蛋白的研究有助于改造其功能等等。

1 材料和方法

1.1 材料

碘乙酰胺购自Sigma。PK购自Merk。二硫苏糖醇(Dithiothreitol,DTT)购自Promega。10 kD超滤离心管购自Millipore。甲醇、乙腈、固相萃取柱购自DIKMA。溶菌酶购自上海伯奥。其它试剂为国产分析纯。超纯水由Millipore纯水系统制备。离心机为Sigma 3K18型,二维液质联用质谱仪(LC-MS/MS)为美国Finnigan产品(LCQ Deca XP Plus,ThermoFinnigan, San Jose, CA),强阳离子交换柱(BioBasic SCX,颗粒大小5 μ m,孔径30nm,100 mm \times 0.32 mm)及反相柱(BioBasic-C18,颗粒大小5 μ m,孔径为30nm,100 mm \times 0.180 mm)为美国ThermoHypersil产品(ThermoHypersil, Allentown, PA, USA)。S. coelicolor M145为中国科学院微生物研究所谭华荣研究员惠赠。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将S. coelicolor M145孢子液接种至R5培养基^[1],30 $^{\circ}$ C摇床培养至OD₄₅₀ = 2.8。离心40min,收集菌体

1.2.2 原生质体制备 将 *S. coelicolor* 菌丝体悬浮于 10.3% 蔗糖溶液中, 振荡后, 1000 g 离心 10min, 弃上清, 将细胞重悬于适量溶菌酶溶液(1mg/mL 溶菌酶溶于改进的 P buffer^[11]) 中, 30℃ 保温 60min 后, 吸打 3 次, 继续保温 15min, 用覆盖脱脂棉的漏斗过滤, 用 10.3% 蔗糖溶液洗 2 次得到原生质体^[1]。

1.2.3 PK 保护 将原生质体重悬于 pH 6.7, 0.1mol/L K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 5mmol/L $MgCl_2$, 0.29mol/L Sucrose 缓冲液中, 使蛋白浓度为 1mg/mL(蛋白浓度用 Bradford 法测定^[12])。按 PK:膜蛋白 = 1:100(质量比) 加入 PK, 4℃ 反应 30min, 消化原生质体膜外侧亲水肽。4℃, 1000 g, 离心 7min, 收集沉淀, 用上述缓冲液洗 2 次后重悬于该缓冲液中。用 PBK(0.1 mol/L K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 6.7) 稀释 1 倍溶胀破胞, 4000g 离心 10min 去未破碎细胞和细胞残片, 收集上清, 4℃, 18000g 离心 30min 收集沉淀, 获得膜样品。同上条件用 PBK 洗膜样品 2 次^[7]。

1.2.4 hpPK 法制备膜内侧蛋白的混合肽样品 将得到的膜样品重悬于 pH 11.0, 0.2mol/L Na_2CO_3 溶液中使蛋白终浓度为 1mg/mL; 用注射器吸打 5 次, 冰浴 1h 后, 加尿素至终浓度 8mol/L, DTT 至终浓度 1mmol/L, 37℃ 保温 4h, 使蛋白质充分变性。加碘乙酰胺至终浓度 10mmol/L, 暗处反应 1h, 封闭过量的 DTT。每 1mg 膜蛋白样品加 5 μ g PK, 37℃ 保温 3h 后, 补加 5 μ g PK, 37℃ 继续保温 1.5h。加甲酸至终浓度 5% 终止 PK 反应, 然后 4℃, 18000g 离心 15min 收集上清得到混合肽样品^[7]。

1.2.5 脱盐、冻干和超滤 混合肽样品用乙酸乙酯抽提 3 次去除非极性小分子, DIKMA 固相萃取柱脱盐(参照生产商操作手册进行)。真空冷冻干燥后, 重溶于 0.1% 甲酸, 用 10kD 超滤膜过滤, 滤液用二维液质联用串联质谱进行分析。

1.2.6 液质联用串联质谱分析 将 0.1% 甲酸溶解的混合肽样品加到强阳离子交换柱上进行一维分离, 用不同浓度的 NH_4Cl 溶液洗脱, 将洗脱的肽组分用 C18 反相柱进行二维分离后进入电喷雾离子阱质谱仪进行串联质谱分析。一维分离时所用的 NH_4Cl 浓度分别为: 10, 30, 50, 70, 100, 120, 150, 180, 200 及 400 mmol/L; 二维分离时流动相为水(A)和乙腈(B), 所用洗脱梯度为: 0~31min, 2%~65% B; 31~36min, 65%~95% B; 36~41min, 95% B; 41~42min, 95%~2% B; 42~57min, 2% B。质谱

扫描方式采用数据依赖型扫描。

1.2.7 数据处理及分析 将质谱分析产生的 MS/MS 图谱, 用整合到 Biowork 3.1 软件包(ThermoFinnigan 产品)中的 SEQUEST 软件对 NCBI 的 *S. coelicolor* 蛋白质序列数据库进行搜索, 当搜索结果用如下参数进行过滤时, 所产生的肽片段被认为是阳性结果^[13], 即当肽片段为 1 个电荷时, $X_{corr} \geq 1.5$, 2 个电荷时, $X_{corr} \geq 2.0$, 三个电荷时, $X_{corr} \geq 2.5$; 同时, $\Delta C_n \geq 0.1$ 。当只有 3~4 个甚至更少的肽片段满足以上要求时, 要结合手工检查确证谱图质量, 如考虑信号峰要比噪音峰高以及 b 离子和 y 离子之间的匹配连续性等^[14]。

1.2.8 跨膜区及功能分析 *S. coelicolor* 跨膜区数据从 Transmembrane Helices in Genome Sequences (THGS) 网站^[3] 下载。*S. coelicolor* 蛋白的功能分类数据从 Wellcome Trust Sanger Institute 网站^[15] 下载。

2 结果

2.1 *S. coelicolor* 膜内侧蛋白质组分析流程

菌体收集后, 用溶菌酶去细胞壁得到原生质体, PK 消化暴露原生质体膜外侧蛋白肽片段, 通过改变原生质体的渗透压破胞, 离心收集膜样品, 再用 PK 在高 pH 条件下消化, 得到随机酶切的膜内侧可溶性肽片段。通过脱盐、冻干浓缩和超滤除去 10kD 以上的大分子, 将多肽混合物样品加到阳离子柱上, 经 LC-MS/MS 分析得到质谱数据, 用 SEQUEST 和 Bioworks 进一步处理列表分析所检测的蛋白质组。分析得到 293 个肽, 对应 154 个开放阅读框。

2.2 膜内侧蛋白质组鉴别

经 Fernando 等预测, 链霉菌有 1818 个含 TMD 的可能膜内在蛋白, 其中含 3 个以上 TMD 的膜内在蛋白有 992 个^[3]。比较本文所得蛋白质组数据、理论预测 *S. coelicolor* 的蛋白质组数据^[2] 以及 Hesketh 等采用 2D-PAGE 所鉴别得到的蛋白质组数据^[9], 结果见表 1。本文鉴别所得的含 TMD 的膜内在蛋白有 44 个, 其中含 3 个以上 TMD 的膜内在蛋白有 23 个, 其余 110 个蛋白可能是膜外周蛋白或少数 Type V 膜内在蛋白(见图 1)。含不同数目 TMD 的理论预测膜内在蛋白与本文鉴别膜内侧蛋白的比较见表 2。在 44 个鉴别的膜内在蛋白中, 仅 7 是已知功能的, 其余均为未知功能的理论蛋白质。

表 1 MudPIT 法鉴别的天蓝色链霉菌膜内侧蛋白质组

Table 1 Proteins identified from inner membrane preparation of *S. coelicolor* by MudPIT

	No. of theoretical proteins	No. of proteins identified from whole cell lysate preparations by 2D-PAGE method ³	No. of proteins identified from inner membrane preparation by MudPIT ⁴
Total	7825 ¹	770	154
Integral membrane proteins with TMD	1818 ²	unknown	44
Integral membrane proteins with ≥ 3 TMDs	992	0	23

1: Total theoretical proteins predicted by Bentley *et al.*^{2,1}.

2: Theoretical integral membrane proteins predicted by Fernando *et al.*^{3,1}.

3: Proteins identified using 2D-PAGE and MALDI-TOF-MS method by Hesketh *et al.*^{9,1}.

4: Proteins identified in this work.

表 2 含不同数目 TMDs 的理论预测膜内在蛋白及本文鉴别的膜内在蛋白的比较

Table 2 Comparison of the predicted integral membrane proteins containing different number of TMDs with those identified in this work

No. of TMDs	No. of predicted integral membrane proteins ¹	No. of identified inner membrane proteins ²
1	598	15
2	228	6
3	125	1
4	155	4
5	107	1
6	188	2
7	48	0
8	51	1
9	60	2
10	68	5
11	37	0
12	89	4
13	20	0
14	38	3
≥ 15	6	0
total	1818	44

1: Predicted *S. coelicolor* integral membrane proteins by Fernando *et al.*^{3,1}.

2: Identified *S. coelicolor* inner membrane protein in this work.

2.3 膜内在蛋白的拓扑位置

本文得到的具有 ≥ 10 TMD 的膜内在蛋白 12 个, 对应 16 个被检测到的蛋白酶 K 的酶切肽段, 其中 5 个肽段是部分为预测的膜内在蛋白内侧可溶性肽, 1 个肽段完全为内侧可溶性肽, 6 个肽段完全为预测的膜内在蛋白外侧可溶性肽, 4 个肽段完全为预测的膜内在蛋白跨膜疏水 α -螺旋部分, 5 个肽段为部分跨膜的疏水 α -螺旋部分。详细分布见表 3。

表 3 部分鉴别的含有 ≥ 10 TMDs 的膜内在蛋白的拓扑学分析Table 3 Topological analyses of integral membrane proteins identified with ≥ 10 predicted TMDs

Gene bank accession number	No. of TMDs	No. of identified peptides	Peptide hits within TMDs	Peptide hits to soluble domain
NP-626592.1	14	2	N	2CO
NP-626023.1	14	1	1P	1PI
NP-627842.1	14	1	1P	1PI
NP-627140.1	12	2	1C1P	1PI
NP-626411.1	12	1	N	CI
NP-626759.1	12	2	1C	1CO
NP-625740.1	12	1	C	N
NP-626907.1	10	1	P	PI
NP-630877.1	10	1	N	CO
NP-628968.1	10	1	P	PI
NP-627938.1	10	1	C	N
NP-627740.1	10	2	N	2CO

Abbreviations: N, none; P, partially covers a domain; C, completely covers a domain; O, predicted to locate outside the cell; I, predicted to locate inside the cell. The analyses are based on data from Transmembrane Helices in Genome Sequences (THGS)^{3,1}.

3 讨论

3.1 PK 保护/hpPK 法制备样品

与革兰氏阴性菌不同的是, 链霉菌(革兰氏阳性菌)又有类似于革兰氏阴性菌的内膜的单层膜^{16,1}。本文的膜内侧蛋白是指膜内侧的膜外周蛋白和膜内在蛋白。PK 保护/hpPK 法的优点是用 PK 切去原生质体膜外侧蛋白亲水性部分, 而膜内侧蛋白因封闭的质膜而得到保护。在渗透压改变后, 原生质体吸水溶胀破裂, 分离得到的膜样品溶解于高 pH 的 Na_2CO_3 溶液中, 此时细胞膜不能形成脂质体或微囊而保持片状结构, 并且膜蛋白的亲水性肽变性易被

减弱活性的 PK 随机酶切成不同的肽段。PK 是一种活性很强的蛋白酶,在高 pH 下,其酶解能力有所下降,因此可用它,在高 pH 下酶解蛋白质形成适合质谱分析的随机肽段。Yates 组用此法鉴别鼠膜蛋白组,由于随机肽段的产生,更加准确地鉴别了一些膜蛋白^[7]。

3.2 MudPIT 法鉴别 *S. coelicolor* 膜内侧蛋白质组

有关链霉菌的蛋白质组学的研究,如 Hesketh 等^[9,17],Langlois 等^[18],Novotna 等^[19]都采用了 2D-PAGE/MALDI-TOF 法。该法比较直观,能检测出翻译后 pI 和分子量发生改变的不同形式的蛋白质^[17];但鉴别的范围较小,如 Hesketh 等利用该法鉴别了 *S. coelicolor* 中 770 个 ORF,分子量范围为 8 ~ 140kD,等电点范围为 4 ~ 11,且没有得到含 3 个 TMD 以上的膜内在蛋白和丰度较小的蛋白质,如 σ 因子^[9]。此法除引言所述缺点外,还存在样品需要量大,而且要实现高通量也有困难,因为每个斑点都需要切下单独进行分析。

本文用 MudPIT 法对链霉菌膜内侧蛋白质组进行分析,成功鉴别了 154 个可能的膜内侧蛋白,其中含 TMD 的膜内在蛋白 44 个,占总鉴别可能膜内侧蛋白的 28.5%。含 3 个以上 TMD 的膜内在蛋白有 23 个(Hesketh 等没有鉴别到这类膜蛋白),见表 1。还有 5 个 TMD 为 0 的蛋白质,由序列分析推测为脂蛋白,应属 Type V 的膜内在蛋白。其余许多 TMD 为 0 的蛋白质,如调控因子、核糖体蛋白及热激蛋白等均可能为膜外周蛋白,通过与膜或膜内在蛋白的相对弱相互作用出现在制备的样品中。

3.3 鉴别的膜内在蛋白的拓扑学分析

本实验得到的含 TMD 的膜内侧蛋白,鉴别的肽序列与理论推测的位置不完全一致,除了膜内侧肽段和膜内疏水部分外,还检测到膜外侧亲水部分。而从样品制备的原理分析,所有检出肽段应为膜内侧亲水性肽或膜内疏水部分。例如,表 3 中具有 14 个 TMD 的可能编码 putative peptidoglycan-binding 蛋白(NP-626592.1)^[3]。本文检测到的两个肽段均覆盖膜外侧亲水部分。

为全面描述如引言所述膜内在蛋白在膜上的拓扑学结构(见图 1),本研究也尝试了用甲醇和加热法^[20]处理膜样品,并用超声波加速膜内在蛋白的疏水部分的溶解而制备膜内在蛋白的疏水性肽样品,经酶切位点较少的胰蛋白酶酶解,检测及数据库分析后得到 16 种蛋白质,含 TMD 的蛋白质为 6 个,3 个以上 TMD 的蛋白质为 4 个,检测到的膜内在蛋白

较少(数据未发表),检测的肽段也不完全覆盖膜内疏水 α -螺旋部分。也曾设想获得膜外侧蛋白亲水性肽段以鉴别膜外侧蛋白组。由于革兰氏阳性菌的膜磷壁酸从膜贯穿细胞壁,采用的 French Press 法破碎细胞后,膜磷壁酸可能使细胞壁仍保留在细胞膜外侧,由鉴别的蛋白质组数据分析表明,没有分开内侧和外侧蛋白(数据未发表)。因为细胞破碎后,在中性条件下质膜随机形成脂质体或微囊结构,不能获得专一外侧膜蛋白亲水性肽样品^[2]。本实验中出现膜蛋白拓扑学的理论预测值和实验值不一致的现象值得继续探讨。

3.4 鉴别的膜内侧蛋白的功能分析

Sanger 中心根据序列的相似性预测了天蓝色链霉菌蛋白质的功能,并按功能分类^[15]。本文鉴别的可能膜蛋白按功能分类,见表 4。统计表明,鉴别的蛋白质 51%是与细胞的 envelope 组成和物质代谢相关。与细胞生物学过程(cell processes)相关蛋白质占 16%,如与分子伴侣、细胞保护、细胞增殖与分化、染色体复制等相关功能的蛋白质属这一类。调控因子占 8%。其余为未知功能或没有进行分类的蛋白质。

本文鉴别的 7 个脂蛋白(数据未发表),2 个含有 TMD,可能为 Type VI 的膜内在蛋白,分别是可能的寡肽结合脂蛋白和酰基转移酶。其余 5 个不含 TMD 应属 Type V 膜内在蛋白,分别是可能的 ATP 结合组件转运系统脂蛋白(BldKB, putative ABC transport system lipoprotein),物质运输蛋白(solute binding transporter),铁转运结合脂蛋白(putative iron-siderophore binding lipoprotein)及两个未知功能的脂蛋白。

表 4 实验鉴别的内侧膜蛋白的功能分析

Table 4 Functional analyses of identified inner membrane associated proteins in this work

Predicted functions ¹	No. of proteins
Unknown function	31
Cell processes	25
Metabolism	47
Cell envelope	31
Regulation	13
Not classified	7
All	154

¹Functional predictions are based on data downloaded from the website of the Wellcome Trust Sanger Institute^[15].

综上所述,与 2D-PAGE/MALDI-TOF 法相比,用 PK 法结合 MudPIT 鉴别链霉菌膜蛋白组是可行

的。此外,还可以利用 MudPIT 法鉴别膜蛋白的翻译后修饰(如磷酸化、甲基化、乙酰基化和糖基化)以及进行定量蛋白组的研究。为综合分析链霉菌膜蛋白组,在样品制备及分析鉴别方法上还需要进一步探索。需改进的方面包括:1)随机产生的膜蛋白亲水性肽种类太多,分析鉴别需要更强的系统能力;2)多维分离液相层析柱的柱效与分辨率也对鉴别结果有影响,需要在灵敏度上作进一步探索;3)从 LC-MS/MS 获得的数据分析结果看,检出的肽较少,膜蛋白肽的重叠性低,需要在样品制备上改进。这些工作的改进对全面鉴别膜蛋白组、膜蛋白的拓扑学结构及膜蛋白的翻译后修饰^[5],乃至揭示链霉菌形态分化及代谢的调控机理具有重要意义。

致 谢 感谢范可强老师在样品的冻干和在实验数据的分析上给予的帮助,感谢汪志军博士对实验设计的讨论。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Kieser T, Chater KF, Hopwood DA *et al.* Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich: John Innes Foundation, 2000
- [2] Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM *et al.* Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 2002, **417**: 141 - 147
- [3] <http://144.16.71.10/cgi-bin/thgs/tproteintest.pl>
- [4] Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed, New York: Worth Publishers, 2000
- [5] Link AJ, Eng J, Schiellz DM *et al.* Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 676 - 682
- [6] Washburn MP, Wolters D, Yates III JR. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 242 - 247
- [7] Wu CC, MacCoss MJ, Howell KE *et al.* A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 532 - 538
- [8] Vohradsky J, Li XM, Tompson CJ. Identification of prokaryotic developmental stages by statistical analysis of two-dimensional gel patterns. *Electrophoresis*, 1997, **18**: 1418 - 1428
- [9] Hesketh AR, Chandra G, Shaw AD *et al.* Primary and secondary metabolism and post-translational protein modifications as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 2003, **46**: 917 - 932
- [10] Wu CC, Yates JR. The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 262 - 267
- [11] Yang KQ, Han L, Ayer SW *et al.* Accumulation of the angucycline antibiotic rabelomycin after disruption of an oxygenase gene in the jadomycin B biosynthetic gene cluster of *Streptomyces venezuelae*. *Microbiology*, 1996, **142**: 123 - 132
- [12] Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem*, 1985, **151**: 369 - 374
- [13] Sadygov RG, Eng J, Durr E *et al.* Code development to improve the efficiency of automated MS/MS spectra interpretation. *J Proteome Res*, 2002, **1**: 211 - 215
- [14] Wolter DA, Washburn MP, Yates JR. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem*, 2001, **73**: 5683 - 5690
- [15] http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor
- [16] Alberts B, Johnson A, Lewis J *et al.* Molecular Biology of the Cell, 4th ed, New York: Garland Science, 2001
- [17] Hesketh A, Chater KF. Evidence from proteomics that some of the enzymes of actinorhodin biosynthesis have more than one form and may occupy distinctive cellular locations. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, **30**: 523 - 529
- [18] Langlois P, Bourassa S, Poirier GG. Identification of *Streptomyces coelicolor* proteins that are differentially expressed in presence of plant material. *Appl and Environ Microbiol*, 2003, **69**: 1884 - 1888
- [19] Novotna J, Li XM, Berndt P *et al.* Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. *Mol Microbiol*, 2003, **48**: 1289 - 1303
- [20] Blonder J, Goshe MB, Moore RJ *et al.* Enrichment of integral membrane proteins for proteomic analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Prot Res*, 2002, **1**: 351 - 360