

文章编号: 1674-7054(2014)01-0073-05

细菌纤维素产生菌双向凝胶电泳分析技术

杨 暄¹ 李 俊¹ 李从发¹ 郝俊冉² 许文涛² 刘四新¹

(1. 海南大学 食品学院 海南 海口 570228; 2. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘 要: 对细菌纤维素产生菌株——葡糖酸醋杆菌菌体蛋白的提取过程、等电点的分布及纯化方法等方面进行了探索和优化。结果表明: 葡糖酸醋杆菌蛋白主要分布在 pI 4~7 的范围内; 采用超滤浓缩后进行 2D Clean-up 试剂盒纯化, 可以获得更优的蛋白分离效果; 在考马斯亮蓝 G250 染色条件下, 有效分离出(1037 ± 65) 个蛋白点; 建立了高质量葡糖酸醋杆菌蛋白的双向凝胶电泳分析技术。

关键词: 细菌纤维素; 欧罗巴葡糖酸醋杆菌; 双向电泳; 蛋白质组学

中图分类号: Q 815

文献标志码: A

葡糖酸醋杆菌属(*Gluconacetobacter*) 是一类可以在细胞外合成高纯度细菌纤维素(Bacterial cellulose, BC)的微生物, 其中较常见的菌种包括 *G. xylinus*, *G. europaeus*, *G. intermedius*, *G. oboediens* 及 *G. entanii*^[1-4] 等。菌体在液体培养时, 体内合成纤维素后, 纤维素就从细胞壁的微孔道中分泌出来, 在菌体外相互缠绕结成一层致密的网状纤维素薄膜^[5], 此时, 菌体被包裹于该纤维素膜中。静态培养条件下产生的细菌纤维素具有许多优良特性, 被认为是世界上性能最好的纤维素^[6-7], 自 1976 年被工业化应用至今, 细菌纤维素在组织工程学、纳米生物材料、食品工业等领域均取得了长足发展并收获了良好的效益^[8-11]。SONG Qing Hua^[12] 和 NAOKI S^[13] 等均通过 X-ray, PCR, SDS-PAGE 等技术, 对葡糖酸醋杆菌属中纤维素合酶相关基因和蛋白质进行了研究。由于生物技术的飞速发展, 目前, 建立在传统微生物学研究方法上的形态学、生理生化特征以及代谢调控等方面的研究, 已经不能满足人们对生命活动规律深层次的思考需求。当前, 组学研究方法以其高灵敏性、高分辨率的特征而被广泛采用, 并取得许多突破性进展^[14]。如微生物蛋白质组学技术和方法的发展, 极大地推动了人们对如酵母菌属(*Saccharomyces*)、链霉菌属(*Streptomyces*) 等^[15-16] 工业发酵菌株生命活动规律和代谢调控机理的认识。因此, 在细菌纤维素研究领域, 采用蛋白质组学研究方法具有重要意义。目前, 国内外对应用双向凝胶电泳技术分析纤维素产生菌蛋白质组学的报道很少^[17], 本课题组长期致力于细菌纤维素发酵方面的研究^[18-19], 笔者通过蛋白质组学方法, 对欧罗巴葡糖酸醋杆菌(*Gluconacetobacter europaeus*) 的发酵调控规律进行探索, 旨在建立高质量的葡糖酸醋杆菌蛋白的双向凝胶电泳分析技术, 为其发酵调控规律的蛋白质组学后续研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株 供试的欧罗巴葡糖酸醋杆菌(*Gluconacetobacter europaeus*) 由海南大学食品学院提供。

1.1.2 发酵培养基 采用 HS 培养基(Hestrin and Schramm medium): 葡萄糖 20 g · L⁻¹, 蛋白胨 5 g · L⁻¹, 酵母提取物 5 g · L⁻¹, Na₂HPO₄ 2.7 g · L⁻¹, 柠檬酸 1.15 g · L⁻¹, pH5.0。

1.1.3 实验试剂 硫脲、非离子解离剂(CHAPS)、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、溴酚蓝、甘油、低

收稿日期: 2014-2-10

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(200903026-6)

作者简介: 杨暄(1988-), 男, 海南大学食品学院 2011 级硕士研究生。

通信作者: 刘四新, 女, 教授, 主要从事微生物学研究。E-mail: sixin0808@163.com

熔点琼脂糖、过硫酸胺(APS)均为Sigma公司产品;干胶条、IPG缓冲液、覆盖油、考马斯亮蓝R250、2D Clean-up kit试剂盒购自GE Healthcare公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)、尿素、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、十二烷基硫酸钠(SDS)购自Amresco公司;乙醇、乙酸为国产分析纯试剂;超滤管(3KDa)、微孔滤膜(0.45 μm)为Millipore公司产品;实验用水采用去离子水。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株生长规律及纤维素产量的测定 在发酵培养基中以 $\varphi=2\%$ 的接种量接种欧罗巴葡糖酸醋杆菌种子液,进行静置培养(37 $^{\circ}\text{C}$),每隔24h取菌液进行平板计数,绘制菌体生长曲线。同时,取上层纤维素膜,于0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaOH沸水浴中洗涤,充分除去菌体,至膜无色透明后,用去离子水洗涤除去NaOH,测pH至7.0止,80 $^{\circ}\text{C}$ 干燥箱烘干,然后测其干质量^[20]。

1.2.2 菌体蛋白质样品的制备 收集HS发酵培养基表层产生的纤维素膜,弃去培养液后,以去离子水冲淋表面。吸干表层水分后,液氮速冻,将样品置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 下储藏。采用真空冷冻干燥方法除去截留在样品中的水分,并称取1.2g样品于液氮中磨粉制样。余下样品-80 $^{\circ}\text{C}$ 下冻藏。本实验通过直接提取法、超滤浓缩法、2D Clean-up Kit等方法改进,优化提取效果。蛋白质浓度定量标准曲线采用以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白、595nm处测定吸光值的方法绘制。

1.2.2.1 直接提取法 将研好的样品冻干粉按 $m_{\text{干粉}}:V_{\text{裂解液}}=1\text{g}:3\text{mL}$ 的比例溶解于裂解液(7 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的尿素,2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫脲, $\mu=4\%$ 的CHAPS,65 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DTT, $\varphi=2\%$ 的IPG buffer, $\varphi=1\%$ 的cocktail)中,二硫苏糖醇(DTT)、IPG buffer及蛋白酶抑制剂(cocktail)需新鲜加入,超声破碎参数为:功率180W,脉冲1s,间隔2s,破碎99次。破碎后样品冰浴裂解4h后,14000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心20min。弃去下层残渣,上层清液即为所得蛋白。

1.2.2.2 超滤浓缩 蛋白质浓缩采用超滤的方法,选用Millipore公司的超滤管(规格为Amicon Ultra-0.5mL,3KD)。将样品移至超滤内部套管中,13000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心45min,将蛋白质截留在内部套管,滤除小分子物质,取出套管,并翻转,5000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心2min,获得浓缩菌体蛋白质。

1.2.2.3 Clean-up kit试剂盒法 将浓缩后的蛋白质过0.45 μm 滤膜,用2D clean-up Kit试剂盒步骤纯化蛋白,用上样水化液(7 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的尿素,2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫脲, $\mu=2\%$ 的CHAPS,65 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DTT, $\varphi=1\%$ 的IPG buffer)溶解沉降后的蛋白质,得到纯化后蛋白样品。

1.2.3 菌体蛋白的质量浓度测定 蛋白质质量浓度定量采用Brandford方法,以酶标仪(Thermo公司)于595nm下测定光密度(OD)值,设3次重复,制作标准曲线, $R^2>0.99$ 时方可使用。

1.2.4 等电聚焦电泳(IEF) 采用水化上样的方式进行蛋白上样,13cm Immobiline DryStrip胶条上样蛋白含量550 μg ,水化液补齐体积至250 μL ,25 $^{\circ}\text{C}$ 水化14h。第1项等电聚焦电泳仪选用(IPG phorsystem III,GE Healthcare),设置参数为:Step 500V,500Vh; Grad 1000V,800Vh; Grad 8000V,11500Vh; Step 8000V,7500Vh; Step 500V,3500Vh。聚焦温度20 $^{\circ}\text{C}$,额定电流设定为50 μA 。

1.2.5 第2项SDS-PAGE电泳 选用 $w=1\%$ 的二硫苏糖醇, $\mu=2.5\%$ 的碘乙酰胺进行胶条平衡。第2项SDS-PAGE电泳凝胶面积采用20 $\text{cm}\times 20\text{cm}$,分离胶单体浓度 $w=12.5\%$,电泳参数设定为,浓缩:恒流20 $\text{mA}/\text{胶}$,600V,4W,40min;分离:恒流40 $\text{mA}/\text{胶}$,600V,8W,至指示线到达胶底部。蛋白显色采用考马斯亮蓝G250进行凝胶染色。

1.2.6 凝胶图像采集与分析 图像采集使用Image Scanner(GE Healthcare)扫描凝胶。获取图像后,应用软件Platinum version 7.0(GE Healthcare)对图像中蛋白点识别、分布与匹配进行分析。

2 结果与分析

2.1 菌体生长及产生纤维素的规律 为确定实验进行的时间点,便于收集更多菌体,绘制了欧罗巴葡糖酸醋杆菌静态发酵的生长曲线及纤维素产量曲线。从图1可知,3d后菌体生长量达到最大,所分泌的纤维素产量逐渐上升。结合菌株生长及菌体分泌纤维素产量的趋势,笔者选取培养6d的样本用于后续蛋白质的提取及双向凝胶电泳方法学探索。

2.2 蛋白质提取和浓缩方法的优化 样品中蛋白质提取的质量,直接决定着双向电泳技术对蛋白质分

离的效果。图 2 是牛血清白蛋白(BSA)蛋白质定量的标准曲线,图 3 是葡糖酸醋杆菌经上述 3 种提取方法获得的蛋白质质量浓度定量。经测定,采用对纤维素膜中菌体蛋白直接提取的方法所得蛋白质质量浓度为 $1.63 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,不能满足 13 cm 胶条最低的蛋白质质量浓度上样要求。本实验选用超滤的方法进行样品浓缩,3 KDa 孔径滤膜可以保证蛋白质截留同时,滤除水等小分子溶剂,达到提高浓缩的目的,同时不会造成蛋白质的降解。经超滤浓缩的处理步骤,可将菌体蛋白质质量浓度提升至 $31.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。菌体蛋白再经 2D Clean-up Kit 试剂盒沉降复溶纯化后,蛋白质质量浓度为 $29.09 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,该质量浓度下,蛋白上样时引入杂质质量较少,便于双向电泳对蛋白质进行更有效的分离。

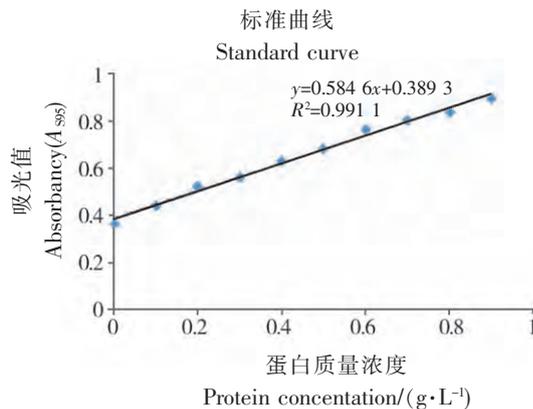


图 2 牛血清白蛋白(BSA)蛋白质定量标准曲线
Fig.2 The quantitative standard curve of BSA protein

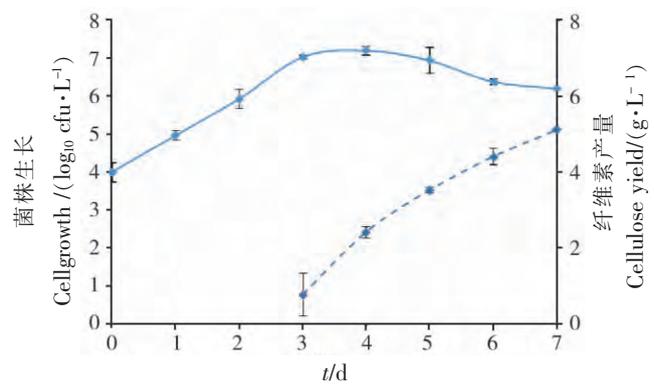


图 1 葡糖酸醋杆菌菌株生长及纤维素产量曲线
Fig. 1 The cell growth and yield of the *Gluconacetobacter* in HS medium

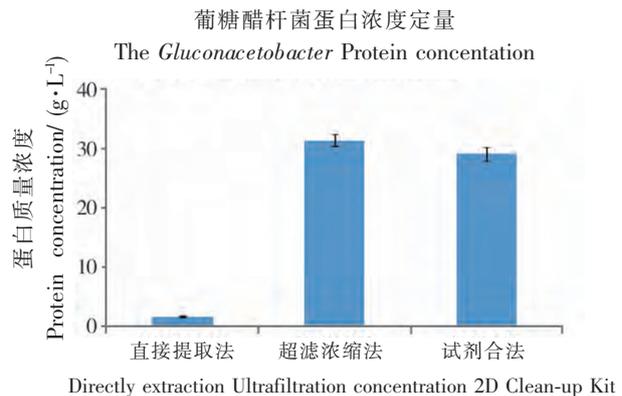


图 3 不同蛋白提取方法的比较
Fig.3 The *Gluconacetobacter* protein concentration from different extraction methods

2.3 欧罗巴葡糖酸醋杆菌蛋白等电点的测定 提取的菌体蛋白经超滤浓缩后,选用 13cm pI 3 ~ 10 NL Immobiline DryStrip 胶条进行实验,初次实验的样本,一般先选用更广的覆盖区域以获得不同等电点蛋白的分布信息,再根据蛋白点的分布情况进行胶条的选择。从图 4A 可知,蛋白点多集中在等电点 pI4 ~ 7 的区域内,蛋白点间存在弥散,分离效果不好。图 4B 是换用 13 cm pI 4 ~ 7 Immobiline DryStrip 胶条的实验结果,可以证实葡糖酸醋杆菌菌体蛋白质大多集中在这一范围内。超滤浓缩后,虽菌体浓度满足实验需求,但菌体蛋白点仍分离不清晰存在局部聚集,蛋白横向拖尾严重,蛋白点边缘发生弥散,很可能是由于胶条水化吸涨过程中纤维素碎屑的存在,造成蛋白在迁移过程堵塞了胶孔,形成了局部区域的蛋白聚集。等电聚焦过程中覆盖油产生波动,电压不能达到 8 000 V,表明提取蛋白的纯度不能满足有效分离的要求,还需进一步改进提取条件。

2.4 蛋白质的纯化 盐类及离子型杂质的存在,增加了溶液的导电性,使等电聚焦过程中上层覆盖油产生波动。通常蛋白需要在 8 000 V 左右的电压下才能发生较快迁移,并按等电点不同实现聚焦。低电压下蛋白迁移速率较慢或不产生迁移,无法实现聚焦,从而造成蛋白点大范围横向拖尾现象,不能达到良好的分离效果。直接提取法获得的菌体蛋白,过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜,经超滤浓缩步骤后,采用 2D Clean-up Kit 冲洗去除非蛋白污染物。从图 5 所示的 3 次重复实验结果来看,说明采用本方法纯化的样品进行双向电泳的结果重现性和稳定性都较好,完全能满足实验的要求,聚焦过程顺利,蛋白点边缘清晰,未出现水平拖

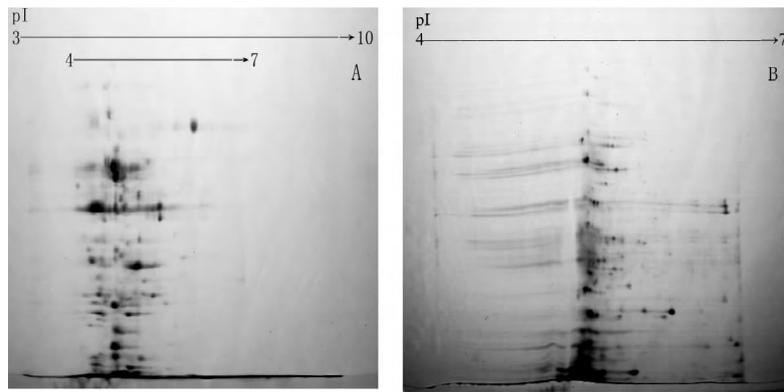


图4 不同等电点范围的双向电泳图谱

A. pI3 ~ 10; B. pI4 ~ 7

Fig. 4 The 2D gel electrophoresis of different pI using Immobiline DryStrip Gel

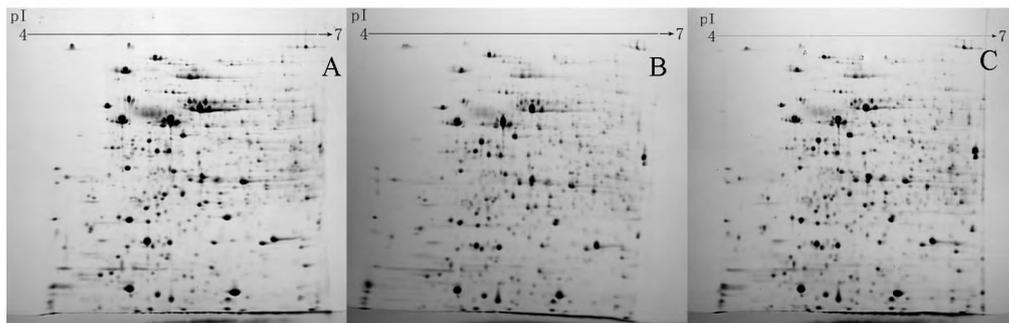


图5 样品纯化后3次重复的双向电泳图谱

Fig. 5 2D gel electrophoresis maps of 3 replications of purified protein of *Gluconacetobacter*

尾,与图4相比,显著改善了蛋白点检出的分辨率。Platinum version 7.0 软件分析结果表明,本方法可分离获得 (1037 ± 65) 个蛋白点,能获得较高的匹配率和稳定的技术重复,能实现葡糖醋酸杆菌蛋白的有效分离。

3 讨论

3.1 葡糖酸醋杆菌蛋白提取 葡糖酸醋杆菌分泌纤维素后,菌体本身被包裹在纤维素中。纤维素酶可以有效水解细菌纤维素^[21],暴露菌体,但纤维素酶最适温度通常超过 20 °C。通常为了抑制菌体的生物活性,防止蛋白质表达产生变化,实验需在 4 °C 环境中进行,但在前期探索中,该温度下纤维素酶并不能产生良好的分解效果。真空冷冻干燥技术可以在低温下,去除纤维素中截留的水分,提高菌体的相对比重,同时保证蛋白质的完整性^[22]。本研究发现,真空冷冻干燥后直接提取获得的蛋白质质量浓度,无法达到双向电泳分离样品时的最低蛋白质量浓度要求。通过超滤浓缩的方法可以提高蛋白质质量浓度,但所获菌体蛋白还需进行纯化。2D Clean-up Kit 试剂盒可以起到一定浓缩蛋白质的效果,但样品质量浓度过低时,如果对蛋白样品直接应用该法,则试剂消耗过大,同时无法有效去除具有较强亲水能力的纤维素碎屑,不具有可行性。超滤浓缩与 2D Clean-up Kit 试剂盒结合使用的方法,可以获得更好的分辨效果。

3.2 胶条的选择 由于蛋白质表面离子化侧链的存在,使得蛋白质分子带有静电荷。Immobiline DryStrip 凝胶采用酸性和碱性缓冲基团按梯度共价结合进入聚丙烯酰胺凝胶,电场作用下可以实现蛋白质按电负性不同进行重排,起到分离效果。pI 3 ~ 10 的胶条可以收集覆盖区域更广的蛋白,pI 4 ~ 7 的胶条则能获得等电点范围更高的蛋白分辨率。实验发现,葡糖酸醋杆菌蛋白基本集中在等电点为 pI 4 ~ 7 的偏酸性区域。采用 pI 4 ~ 7 的胶条可以实现更好的分离效果。

3.3 非蛋白污染物的影响 微生物样本中成分复杂,超滤浓缩后,菌体蛋白质质量浓度得到了显著提升,但样品中仍含有如核酸、金属离子、研磨及超声破碎过程会产生纤维素碎屑等非蛋白污染物。样品经微孔滤膜过滤,以沉降蛋白质的方法滤除上层非蛋白污染物后,污染现象得到了有效缓解。在比对几种提取方法后,笔者最终采用超滤浓缩接合 Clean-up 试剂盒的方法,在提高葡糖酸醋杆菌蛋白提取质量浓度的同时,纯化蛋白,保证了样品提取的质量。实验未产生纵向拖尾,去除污染物后,蛋白质能实现有效分离,电泳仪参数 8 000 V,19 000 Vh 的聚焦时间可以满足本实验的需求。

葡糖酸醋杆菌与人类的活动有着密切的联系,丰富着多领域内的工业生产^[23]。运用基因工程和蛋白质工程技术对工业微生物的研究可以提高生产与产业化水平。本研究从解决细菌纤维素产生菌株蛋白质组研究的方法学问题入手,探索出一套基于双向凝胶电泳技术对葡糖酸醋杆菌蛋白质进行有效分离的方法,为今后揭示该菌株发酵调控中蛋白质表达的生物途径和菌株的改良打下了基础。

参考文献:

- [1] BOESCH C, RCEK J, SIEVERS M, et al. *Acetobacter intermedius*, sp. nov. [J]. *Syst Appl Microbiol*, 1998, 21(2): 220 - 229.
- [2] SOKOLLEK S, HERTEL C, HAMMES W. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations [J]. *Int. J. Syst Bacteriol*, 1998, 48(3): 935 - 940.
- [3] SIEVERS M, TEUBER M. The microbiology and taxonomy of *Acetobacter europaeus* in commercial vinegar production [J]. *J. Appl. Bacteriol*, 1995, 79: 84 - 95.
- [4] SON H J, KIM H G, KIM K K, et al. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. [J]. *Bioresource Technol*, 2003, 86(3): 215 - 219.
- [5] IGUCHI M, YAMANAKA S, BUDHIONO A. Bacterial cellulose—A masterpiece of nature's arts [J]. *Journal of Materials Science*, 2000, 35(2): 261 - 270.
- [6] NOVOSJOLOV N P, ELENA S, CHINA S A. Cellulose structural peculiarities and the mechanism of its dissolution in tertiary amine N-oxides [J]. *Cellulose Chemistry and Technology*, 1999(33): 361 - 380.
- [7] 汪全伟, 刘四新, 高世龙, 等. 细菌纤维素生产与应用研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2007, 18(1): 152 - 154.
- [8] CHARPENTIER P A, MAGUIRE A, WAN W K. Surface modification of polyester to produce a bacterial cellulose-based vascular prosthetic device [J]. *Appl. Surf. Sci.*, 2005, 252(18): 6360.
- [9] 刘四新, 李枚秋. 椰子纳塔发酵条件研究 [J]. *食品与发酵工业*, 1998, 25(1): 36.
- [10] 邵伟, 黄斌, 胡潘. 细菌纤维素在发酵香肠生产中的应用 [J]. *肉类工业*, 2006(6): 10.
- [11] SVENSSON A, NICKLASSON E, HARRAH T. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(4): 419.
- [12] SONG Q H, YONG G G, KENJI T J, et al. Structure of bacterial cellulose synthase subunit D octamer with four inner passage-ways [J]. *PNAS*, 2010, 107(42): 17957 - 17961.
- [14] NAOKI S, TAKAOKI F, TAKANORI Y, et al. Cellulose complementing factor (CCF) is a new member of the cellulose synthase complex (terminal complex) in *Acetobacter xylinum* [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 115(6): 607 - 612.
- [15] FUCHS D, WINKELMANN I, JOHNSON I T, et al. Proteomics innutrition research: principles, technologies and applications. [J]. *British journal of nutrition*, 2005, 94(3): 302 - 314.
- [16] PENG YIN, YOU-YUAN LI, JIN ZHOU, et al. Direct proteomic mapping of streptomyces avermitilis wild and industrial strain and insights into avermectin production. [J]. *Journal of Proteomics*, 2013, 79(21): 1 - 12.
- [17] RASMUS H, STEPHEN Y, PEARSON, et al. Proteomic analysis of a distilling strain of *Saccharomyces cerevisiae* during industrial grain fermentation [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(1): 116 - 125.
- [18] NGUYEN Vu Tuan, FLANAGAN Bernadine, MIKKELSEN Deirdre, et al. Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 80(2): 337 - 343.
- [19] 刘四新, 汪全伟, 李从发. 振荡发酵生产球形细菌纤维素 [J]. *热带作物学报*, 2009(6): 885 - 889.
- [20] 余敏华, 龙映均, 刘四新, 等. 振荡条件对发酵生产颗粒状细菌纤维素的影响 [J]. *中国酿造*, 2012, 6: 98 - 101.
- [21] ROSS P, MAYER R, BENZIMAN M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria [J]. *Microbiol Rev.*, 1991, 55(1): 35 - 58.
- [22] 孙毅, 金湘, 毛培宏. 细菌纤维素酶的结构和功能及菌种改良研究 [J]. *生物技术*, 2005(3): 87.
- [23] 李华, 骆艳娥, 刘延琳. 真空冷冻干燥微生物的研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2002, 29(3): 78.
- [24] 冯静, 施庆珊, 欧阳友生. 葡糖醋杆菌的研究进展 [J]. *化学与生物工程*, 2009, 26(5): 10 - 13. (下转第 91 页)

- [11] WANG W , WU N , ZU Y G. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components [J]. Food Chemistry , 2008 , 108(3) : 1019 – 1022.
- [12] 李宁, 熊勇, 张海涛, 等. 高良姜挥发油对不同肿瘤细胞株增殖的影响 [J]. 山东医药 , 2012 , 52(11) : 19 – 21.
- [13] 张书锋, 郝勇, 胡聪, 等. 白豆蔻、望春花和高良姜挥发油驱蚊活性的评价 [J]. 白求恩医学院学报 , 2011 , 9(1) : 8 – 9.

GC-MS Fingerprinting Analysis of Volatile Oil from Rhizome of *Alpinia Officinarum* in Hainan

WANG Hui¹ , ZHAI Hongli¹ , MEI Wenli¹ , YI Bo² , CAI Caihong¹ , ZENG Yanbo¹ ,
DONG Wenhua¹ , DAI Haofu¹

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology/Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops/Hainan Key Laboratory for Research and Development of Natural Products from Li Folk Medicine , CATAS , Haikou 571101 , China; 2. Department of Pharmacy , the 187th Hospital of PLA , Haikou 571159 , China)

Abstract: Volatile oil extracted from rhizome of *Alpinia officinarum* in Hainan was analyzed by using GC-MS fingerprinting , and 110 constituents from the volatile oil was determined , of which 20 constituents were detected accurate and stable with good repeatability. This fingerprinting method can be applied in the evaluation of *A. officinarum* as it is simple and reliable.

Key words: *Alpinia officinarum*; volatile oil; GC-MS fingerprinting

(上接第 77 页)

Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis Techniques for Proteomic Research of *Gluconacetobacter*

YANG Xuan¹ , LI Jun¹ , LI Congfa¹ , HAO Junran² , XU Wentao² , LIU Sixin¹

(1. College of Food Sciences , Hainan University , Haikou 570228 , China;
2. College of Food Science and Nutritional Engineering , China Agricultural University , Beijing 100083 , China)

Abstract: The protein extraction , isoelectric point of distribution and protein purification of the proteins of *Gluconacetobacter* , a stain produced bacterial cellulose , were tried and optimized to establish a set of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2DE) techniques for proteomic analysis of *Gluconacetobacter*. The results showed that *Gluconacetobacter* proteins were mainly distributed in the range of pI 4 – 7. The 2D Clean-up kit purification after ultrafiltration concentration gave better protein separation effect. Under Coomassie brilliant blue G250 condition , (1037 ± 65) protein points were isolated.

Key words: *Gluconacetobacter*; two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; proteomics