

## Hôtes, environnement, stress, phages

# Identification de protéines de stress chez *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* par électrophorèse bidimensionnelle

Eng Mong LIM\*, Anne LAFON, Larbi DRIDI, Samira BOUDEBBOUZE,  
S. Dusko EHRLICH, Emmanuelle MAGUIN

Génétique Microbienne, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

**Abstract — Identification of stress proteins in *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* by two-dimensional electrophoresis.** We studied *Lactobacillus bulgaricus* adaptation to an acid stress. In *L. bulgaricus*, adapted cells (30 min incubation at pH 4.75) were ~250 fold more tolerant to lethal acid stress (30 min at pH 3.6) than non adapted ones. In order to identify proteins induced during the adaptation, de novo protein synthesis was monitored by <sup>35</sup>S methionine labeling of exponentially growing cultures, under standard (pH 6) and adaptive (pH 4.75) conditions. After 2 dimensional (2-D) electrophoresis separation, the protein patterns were compared. At least 30 protein spots showed an increased radioactivity level under acidic conditions. We determined the N-terminal amino acid sequence of 3 highly induced proteins. By comparison to databases, they were identified as the heat shock proteins GroES, GroEL and DnaK. A differential induction was observed for GroES and GroEL, suggesting a post-transcriptional regulation mechanism. In this report we established a method for the study of acid stress response in *L. bulgaricus*. This method will also be useful for further studies on the adaptation of this bacterium to environmental variations.

***Lactobacillus bulgaricus* / two dimensional electrophoresis / acid stress / adaptation / heat shock protein**

**Résumé —** Nous avons étudié l'adaptation de la bactérie lactique *Lactobacillus bulgaricus* au stress acide. Nous avons montré que les bactéries cultivées en milieu « neutre » (pH 6) présentaient une forte létalité après transfert dans un milieu acide (choc acide à pH 3,6). En revanche, les bactéries préalablement adaptées dans un milieu acide non létal (pH 4,75) devenaient ~250 fois plus tolérantes au choc acide. Après marquage à la méthionine <sup>35</sup>S et séparation par électrophorèse bidimensionnelle (2-D), les profils protéiques obtenus en condition d'adaptation (pH 4,75) et en condition standard (pH 6) sont comparés. On observe une augmentation significative (>2) de l'intensité d'environ 30 spots pendant l'adaptation. La détermination des séquences peptidiques N-terminales de 3 protéines fortement induites à pH 4,75 permet d'identifier les protéines de choc thermique GroES, GroEL et

---

\* Correspondance et tirés-à-part  
Tél. : (33) 1 34 65 25 20 ; fax : (33) 1 34 65 25 21 ; e-mail : emlim@biotec.jouy.inra.fr

DnaK. Nous observons des niveaux d'induction différents pour GroES et GroEL, qui pourraient être liés à une régulation post-transcriptionnelle. Au final, nous avons établi une méthode d'étude de la réponse au stress acide chez *L. bulgaricus*. De façon plus générale, cette méthode permettra d'étudier l'adaptation de cette bactérie aux variations environnementales.

***Lactobacillus bulgaricus* / électrophorèse bidimensionnelle / stress acide / adaptation / protéine de choc thermique**

## 1. INTRODUCTION

*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* est une bactérie lactique homofermentaire utilisée comme ferment pour la production de yoghourts et de fromages de type suisse. Outre sa fonction d'acidification du lait par fermentation du lactose en acide lactique, *L. bulgaricus* participe également à l'élaboration des qualités organoleptiques du produit, notamment par la production de composés aromatiques comme l'acétoïne et l'acétaldéhyde, ainsi que par la production de polysaccharides qui interviennent dans la texture des laits fermentés [8].

Pour *L. bulgaricus*, le pH optimal de croissance est d'environ 6, alors que le pH limite de croissance se situe autour de 3,8 en MRS. L'acidification croissante du milieu impose à cette bactérie d'exprimer des mécanismes d'adaptation qui lui permettent de poursuivre sa croissance jusqu'à pH 3,8 et d'y survivre après l'arrêt de croissance. L'acidité du milieu constitue un exemple de stress rencontré par la bactérie, notamment dans le yoghourt (environ pH 4,5) et dans l'estomac (pH < 3) [3].

L'objectif de ce travail est d'étudier les mécanismes de résistance aux stress chez *L. bulgaricus* et d'en identifier les composants majeurs. Nous avons mis en évidence l'existence d'une réponse adaptative au stress acide et entrepris la caractérisation des protéines induites lors de cette adaptation par électrophorèse bidimensionnelle (2-D).

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Micro-organisme et conditions de culture

La souche bactérienne *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* VI-1010 (Rhodia Food) a été utilisée pour cette étude. Pour chaque expérience, les cultures sont inoculées à partir de colonies sur boîte de MRS et incubées à 42 °C en milieu chimiquement défini MPL (initialement appelé MFL) [2]. Les cultures sont maintenues en phase exponentielle précoce ( $DO_{600} < 0,3$ ) pendant au moins 16 h.

### 2.2. Test de survie au stress acide

Les cellules en croissance exponentielle sont diluées à  $DO_{600} = 0,08$  et cultivées dans 1,5 mL en tube Eppendorf pendant 1 h 30. Après centrifugation (3 min à 8 000 g), les culots cellulaires sont repris dans 1 mL de milieu MPL à pH 3,6 (ajusté avec du HCl). La viabilité est mesurée par étalement sur boîtes de milieu MRS, immédiatement ( $T_0$ ) et 30 min après le transfert à pH acide ( $T_{30}$ ). Le taux de survie est égal au nombre d'unités formant des colonies (ufc) à  $T_{30}$  rapporté au nombre d'ufc à  $T_0$ .

### 2.3. Marquage à la méthionine $^{35}S$

Les marquages s'effectuent avec 100  $\mu Ci$  de méthionine  $^{35}S$  (ICN, Irvine, USA) dans 1 mL de culture à  $DO_{600} = 0,2$  en tube Eppendorf, en MPL dont la concentration en méthionine est réduite à 40  $\mu mol \cdot L^{-1}$ . Après centrifugation (3 min à 8 000 g), les

culots cellulaires sont repris dans 1 mL de milieu : (i) à pH 6 en présence de méthionine  $^{35}\text{S}$  (condition standard) ; (ii) à pH 4,75 en présence de méthionine  $^{35}\text{S}$  (marquage 0–15 min) ; (iii) à pH 4,75, la méthionine  $^{35}\text{S}$  étant ajoutée après 15 min d'incubation (marquage 15–30 min). Après 15 min de marquage, les cellules sont incubées 2 min en présence d'un excès de méthionine non radioactive ( $1,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) afin d'achever la synthèse des protéines marquées. Après trois lavages dans du tampon Tris  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 8 à 4 °C, les cellules sont gardées à  $-80$  °C avant l'extraction des protéines.

## 2.4. Préparation des extraits protéiques

### 2.4.1. Extraits contenant des protéines marquées

Le culot cellulaire est séché pendant 1 h au SpeedVac, avant d'être broyé au fond du tube Eppendorf avec des billes de verre de diamètre 212–300  $\mu\text{m}$  (Sigma, St. Louis, USA) à l'aide de l'extrémité arrondie d'une pipette Pasteur. Les protéines sont solubilisées dans 20  $\mu\text{L}$  de tampon {urée  $7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , thiourée  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Triton X-100 0,5 %, « IPG buffer » 0,5 % (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède),  $\text{MgCl}_2$   $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , phénylméthanesulfonyl fluorure (PMSF)  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , dithiothréitol (DTT)  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Rnase A  $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Boehringer, Mannheim, Allemagne), « micrococcal endonuclease »  $1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Sigma)}. Après centrifugation (15 min à  $15\,000 g$ ), le surnageant protéique est conservé à  $-80$  °C.

### 2.4.2. Extraits protéiques destinés aux gels préparatifs

Le culot cellulaire provenant de 250 mL d'une culture en phase exponentielle ( $\text{DO}_{600} = 0,2$ ) est lavé 3 fois dans du tampon Tris  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 8 à 4 °C avant d'être repris dans 1 mL de tampon de lyse. Les cellules sont cassées par dépressurisation rapide dans un appareil Cell Disrupter (Constant Systems, Kenilworth, UK). Après centrifugation, le surnageant protéique est conservé à  $-80$  °C.

## 2.5. Electrophorèse bidimensionnelle

Les protéines sont diluées dans du tampon de dépôt (urée  $7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , thiourée  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Triton X-100 0,5 %, « IPG buffer » 0,5 %,  $\text{MgCl}_2$   $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , PMSF  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , DTT 0,3 %) pour obtenir un volume final de 350  $\mu\text{L}$ .

La focalisation isoélectrique en gradient de pH immobilisé s'effectue dans des « strips » (Immobiline DryStrip 18 cm, pH 4–7 L, Amersham Pharmacia Biotech) avec un système IPGphor (Amersham Pharmacia Biotech) en voltage croissant jusqu'à 8 000 V pour atteindre un total de 38 000 V·h.

Après équilibration des « strips » dans du DTT et de l'iodoacétamide, la seconde dimension s'effectue dans un gel de polyacrylamide en gradient (12–18 %), selon la technique décrite par Laemmli [6].

## 2.6. Analyse des gels protéiques radioactifs

Après la séparation par électrophorèse 2-D des protéines radioactives (750 000 cpm), les gels sont séchés et la radioactivité est mesurée avec le système STORM 860 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA), après 5 j d'exposition. Les fichiers images des gels sont analysés à l'aide du logiciel ImageMaster 2D Elite version 3.01 (Amersham Pharmacia Biotech).

## 2.7. Analyse des protéines par microséquençage de l'extrémité N-terminale

Cinq cents microgrammes à 1 mg de protéines sont séparés par électrophorèse 2-D dans des gels préparatifs. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (ProBlott, Applied Biosystems, Foster City, USA) selon la technique décrite par Ploug et al. [11] et colorées au bleu de Coomassie. La séquence N terminale est déterminée par dégradation d'Edman.

### 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

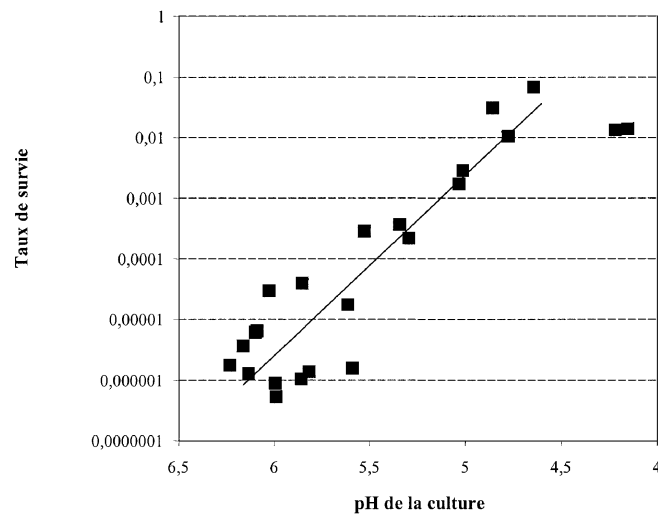
#### 3.1. Tolérance au stress acide au cours de la croissance

La croissance de *L. bulgaricus* s'accompagne d'une production d'acide lactique qui conduit à une acidification rapide du milieu jusqu'à atteindre un pH limite de croissance de 3,8 en MRS et de 4,2 en MPL. Nous avons mesuré l'incidence de l'acidification progressive du milieu sur la résistance à l'acidité de la bactérie. A différents stades de culture, la tolérance au stress acide des bactéries est évaluée par leur taux de survie à un choc acide (30 min à pH 3,6) (Fig. 1). On constate que l'acidification du milieu s'accompagne d'une augmentation progressive de la tolérance au stress acide. Au cours de la croissance, *L. bulgaricus* adapte donc sa résistance à l'acidité du milieu. Le phénomène d'adaptation au stress acide a

déjà été observé chez plusieurs bactéries [1], le plus souvent en montrant qu'une incubation à un pH acide non létal permettait de développer une tolérance à un stress létal. Nous avons appliqué ce type de test à *L. bulgaricus*.

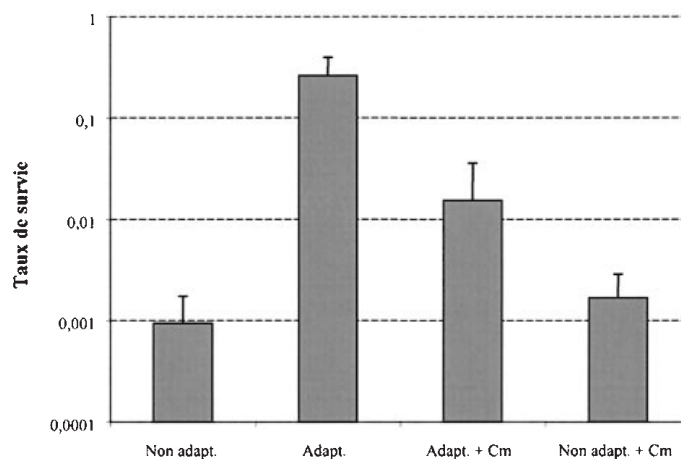
#### 3.2. Étude de l'adaptation au milieu acide

Nous avons mesuré le taux de survie au stress acide (30 min à pH 3,6) de cellules en phase de croissance exponentielle à pH 6 (non adaptées). Le même test de survie a été effectué sur des cellules en phase de croissance exponentielle adaptées à pH 4,75 pendant 30 min (stress non létal). Les bactéries adaptées sont ~250 fois plus tolérantes au stress acide que les bactéries non adaptées (Fig. 2). Afin de vérifier si la synthèse protéique était nécessaire à l'augmentation de la



**Figure 1.** Tolérance de *L. bulgaricus* au stress acide au cours de la croissance. Des prélèvements sont effectués à différents temps sur des cultures de VI-1010 à 42 °C en MPL et la tolérance des bactéries au stress acide (30 min à pH 3,6) est évaluée. Les taux de survie ( $\text{ufc à } T_{30 \text{ min}} \cdot (\text{ufc à } T_0)^{-1}$ ) sont présentés en fonction du pH de la culture lors du prélèvement.

**Figure 1.** Tolerance of *L. bulgaricus* to acid stress during growth. The tolerance of VI-1010 to acid stress (30 min at pH 3.6) was evaluated at different stages of growth in MPL at 42 °C. The survival rate ( $\text{cfu at } T_{30 \text{ min}} \cdot (\text{cfu at } T_0)^{-1}$ ) is expressed as a function of the pH of the culture.



**Figure 2.** Adaptation au stress acide chez *L. bulgaricus*. Les taux de survie ( $\text{ufc à } T_{30 \text{ min}} \cdot (\text{cfu à } T_0)^{-1}$ ) au stress acide (30 min à pH 3,6) sont mesurés sur des cellules en phase de croissance exponentielle ( $\text{OD}_{600} < 0,3$ ) ayant subi différents traitements comme indiqué ci-dessous : Non adapt. = non adaptées ; Adapt. = adaptées 30 min à pH 4,75 ; Adapt. + Cm = adaptées 30 min à pH 4,75 en présence de chloramphénicol ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ; Non adapt. + Cm = non adaptées en présence de chloramphénicol. Les valeurs moyennes (histogrammes) et les écarts types (traits) sont issus de 4 expériences indépendantes.

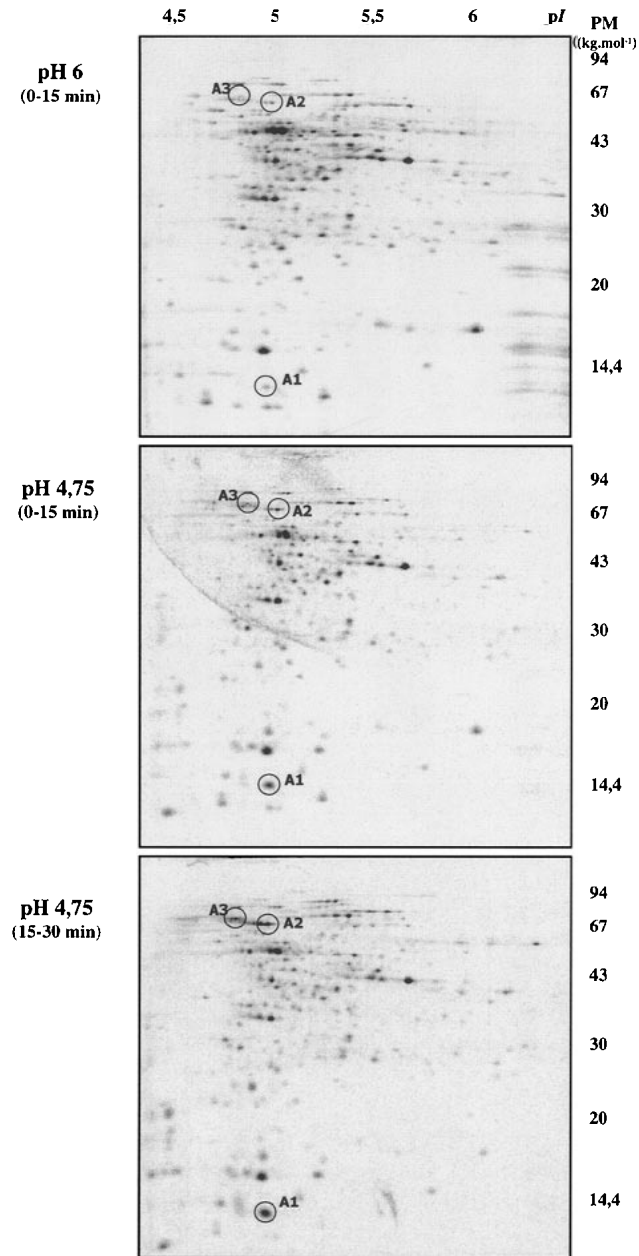
**Figure 2.** Acid stress adaptation of *L. bulgaricus*. The survival rate ( $\text{cfu at } T_{30 \text{ min}} \cdot (\text{cfu at } T_0)^{-1}$ ) of exponentially growing cells ( $\text{OD}_{600} < 0,3$ ) exposed to acid stress (30 min at pH 3,6) was measured. Adapt. = 30 min adaptation at pH 4,75; Adapt. + Cm = 30 min adaptation at pH 4,75 in the presence of chloramphenicol ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); Non Adapt. + Cm = without adaptation but with chloramphenicol. The graph represents the results (mean + standard deviation) of 4 independent experiments.

tolérance, nous avons utilisé un antibiotique qui bloque la traduction bactérienne. L'addition de chloramphénicol ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) pendant l'adaptation (30 min à pH 3,6) réduit significativement le taux de survie, alors que l'ajout de chloramphénicol n'a pas d'incidences sur le taux de survie des cellules non adaptées (Fig. 2). Ces résultats suggèrent fortement que lors de l'adaptation à pH 4,75, des synthèses protéiques sont induites et sont responsables d'une augmentation significative de la tolérance au stress acide.

### 3.3. Protéines induites pendant l'adaptation à l'acidité

Afin de repérer les protéines synthétisées lors de l'adaptation à pH 4,75, nous avons

marqué les protéines en cours de synthèse à l'aide de méthionine  $^{35}\text{S}$ . Les marquages, de 15 min, sont réalisés immédiatement ou 15 min après le transfert à pH 4,75 afin de révéler d'éventuelles différences dans la cinétique d'induction des protéines. Trois expériences indépendantes de marquage sont réalisées dans chaque condition et, après préparation des extraits protéiques, plusieurs gels 2-D sont analysés. La comparaison des intensités moyennes des protéines synthétisées à pH 6 et à pH 4,75 montre une synthèse significativement augmentée ( $>3$ ) pour environ 30 protéines. Parmi celles-ci se trouvent les protéines A1, A2 et A3 qui présentent une forte induction (Fig. 3). On observe également une synthèse réduite pour de nombreuses protéines. Nous n'avons pas analysé ce phénomène qui peut aussi bien



**Figure 3.** Gels d'électrophorèse 2-D de protéines marquées à la méthionine  $^{35}\text{S}$ , à pH 6 de 0 à 15 min et à pH 4,75 de 0 à 15 min et de 15 à 30 min. Les 3 spots fortement induits à pH 4,75 sont entourés d'un cercle.

**Figure 3.** 2-D electrophoresis gels of proteins labeled with  $^{35}\text{S}$  methionine, at pH 6 from 0 to 15 min and at pH 4.75 from 0 to 15 min and from 15 to 30 min. Three spots highly induced at pH 4.75 are encircled.

**Tableau I.** Caractérisation de trois protéines induites à pH 4,75.**Table I.** Characterization of three proteins induced at pH 4.75.

Spot	pI <sup>a</sup>	PM (kg·mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Séquence N-ter.	Protéine homologue <sup>b</sup>
A1	4,9	10	MLQPIGD	GroES <i>Lactobacillus helveticus</i>
A2	4,9	57	AKDIKFSED	GroEL <i>Bacillus</i> sp.
A3	4,75	67	XXVIGIDLG	DnaK <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>

<sup>a</sup> Estimation sur gel.<sup>b</sup> Protéine 100 % identique dans la région N-terminale.<sup>a</sup> Estimated on gel.<sup>b</sup> Protein 100% identical in the N-terminal region.

résulter du ralentissement de la croissance que d'une adaptation à l'acidité.

Afin d'identifier les protéines induites, des gels 2-D préparatifs sont réalisés avec 500 µg à 1 mg d'extraits protéiques. Après transfert sur membrane PVDF, la séquence peptidique des extrémités N-terminales est déterminée par microséquençage.

Les résultats de la comparaison des séquences N-terminales avec les banques de données sont présentés dans le tableau I. Les protéines A1, A2 et A3 sont respectivement homologues aux protéines chaperons GroES, GroEL et DnaK. Ces trois protéines appartiennent à la famille hautement conservée des protéines de choc thermique (HSPs) dont l'expression est induite suite à une accumulation de protéines dénaturées [9]. Les HSPs sont impliquées dans le repliement, l'assemblage, le transport et la dégradation des protéines durant la croissance et plus particulièrement en condition de stress. La régulation des HSPs chez les bactéries fait appel à plusieurs mécanismes qui n'ont pas tous été élucidés [10]. Nos résultats montrent une induction des HSPs chez *L. bulgaricus* en milieu acide, comme c'est le cas chez *Lactococcus lactis* [4] et *Escherichia coli* [5].

### 3.4. Facteurs d'induction

L'intensité relative de chaque spot protéique est calculée comme la radioactivité

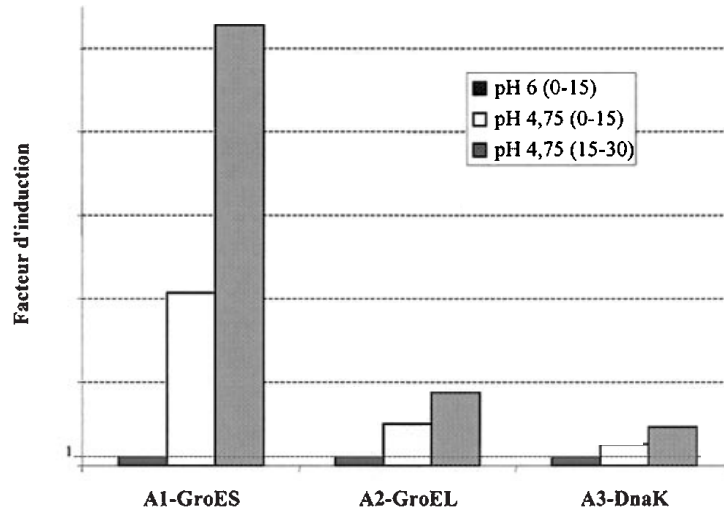
du spot considéré rapporté à la radioactivité totale présente sur le gel. Le facteur d'induction de chaque protéine est défini comme le rapport de l'intensité moyenne (d'au moins 3 expériences indépendantes) à pH 4,75 sur son intensité moyenne à pH 6.

Les résultats montrent des niveaux d'induction différents entre les protéines (Fig. 4). La protéine GroES est fortement induite, tandis que les protéines GroEL et DnaK le sont plus modérément. Chez *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus zeae*, deux bactéries lactiques phylogénétiquement proches de *L. bulgaricus*, les gènes *groES* et *groEL* sont organisés en opéron. Chez *L. bulgaricus*, où l'organisation génétique est vraisemblablement similaire, l'induction différentielle des protéines GroES et GroEL suggère l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle de leur synthèse. Une régulation au niveau des ARN messagers *groESL* été observée chez *Agrobacterium tumefaciens* [12].

La caractérisation des niveaux d'expression de la trentaine de protéines induites pendant l'adaptation devrait permettre de les classer selon leurs profils d'induction et d'aboutir à l'identification de régulateurs.

### 4. CONCLUSION

Ce travail présente nos résultats portant sur les mécanismes de résistance au stress



**Figure 4.** Cinétique d'induction des protéines de choc thermique au cours de l'adaptation à pH 4,75. Après soustraction du bruit de fond, la radioactivité de chaque spot est rapportée à la radioactivité totale. Le facteur d'induction est calculé comme le rapport de l'intensité moyenne du spot à pH 4,75 sur sa valeur moyenne à pH 6.

**Figure 4.** Induction profile of heat shock proteins during the adaptation at pH 4.75. The radioactivity of each spot, background deduced, is normalized to the total radioactivity detected on the gel. The induction factor is calculated as the ratio of the mean intensity at pH 4.75 to its value at pH 6.

acide chez *L. bulgaricus*. Nous avons mesuré le niveau de résistance de la bactérie au stress acide pendant la croissance et observé une augmentation de cette résistance. Nous avons montré que cette adaptation de la bactérie à l'acidité du milieu, nécessitait une synthèse protéique. Afin d'identifier les protéines induites pendant l'adaptation, nous avons utilisé un protocole de marquage à la méthionine  $^{35}\text{S}$ . En adaptant les techniques d'électrophorèse 2-D à l'analyse du protéome chez *L. bulgaricus* [7], nous avons identifié, par séquençage des extrémités N-terminales, trois protéines induites lors de l'adaptation, les protéines de choc thermique GroES, GroEL et DnaK. Nous poursuivons l'étude des autres protéines induites. Par la suite, les techniques d'électrophorèse 2-D, associées à la séquence du génome, permettront une étude du protéome de *L. bulgaricus* en

réponse à divers stress. La caractérisation d'autres protéines de stress et de leur régulation devraient nous permettre d'identifier des régulateurs, ainsi que des marqueurs de stress utilisables notamment dans l'industrie laitière.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions A.-P. Teixeira-Gomes (INRA-Tours) pour l'identification des protéines par microséquençage. Ces travaux ont bénéficié du soutien financier de Danone et Rhodia Food : nous remercions L. Benbadis, A. Sépulchre et C. Frémaux de leur intérêt pour ce projet.

## RÉFÉRENCES

- [1] Bearson S., Bearson B., Foster J.W., Acid stress responses in enterobacteria, FEMS Microbiol. Lett. 147 (1997) 173–180.



- [2] Chervaux C., Ehrlich S.D., Maguin E., Physiological study of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* strains in a novel chemically defined medium, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 5306–5311.
- [3] Conway P.L., Gorbach S.L., Goldin B.R., Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells, *J. Dairy Sci.* 70 (1987) 1–12.
- [4] Hartke A., Bouché S., Giard J.C., Benachour A., Boutibonnes P., Auffray Y., The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Curr. Microbiol.* 33 (1996) 194–199.
- [5] Heyde M., Portalier R., Acid shock proteins of *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.* 57 (1990) 19–26.
- [6] Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [7] Lim E.M., Ehrlich S.D., Maguin E., Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Electrophoresis* 21 (2000) 2557–2561.
- [8] Loones A., Laits fermentés par les bactéries lactiques, in: de Roissart H., Luquet F.M. (Eds.), *Bactéries lactiques*, Loriga, Uriage, France, 1994, pp. 135–154.
- [9] Mogk A., Volker A., Engelmann S., Hecker M., Schumann W., Volker U., Nonnative proteins induce expression of the *Bacillus subtilis* CIRCE regulon, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 2895–2900.
- [10] Narberhaus F., Negative regulation of bacterial heat shock genes, *Mol. Microbiol.* 31 (1999) 1–8.
- [11] Ploug M., Jensen A.L., Barkholt V., Determination of amino acid compositions and NH<sub>2</sub>-terminal sequences of peptides electroblotted onto PVDF membranes from tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: application to peptide mapping of human complement component C3, *Anal. Biochem.* 181 (1989) 33–39.
- [12] Segal G., Ron E.Z., Regulation of heat-shock response in bacteria, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 851 (1998) 147–151.