

细菌鉴定中表面活性剂对蛋白质 激光解吸/电离飞行时间质谱图影响的初步探讨

王正方, 仲维科, 田世民, 齐小花

(中国检验检疫科学研究院, 北京 100123)

Effects of Surfactant on the Identification of Bacteria Using MALDI-TOF MS

WANG Zheng-fang, ZHONG Wei-ke, TIAN Shi-min, QI Xiao-hua

(Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

Abstract: Mixing a Triton X-114 solution at its critical micelles concentration with an equivalent volume of bacteria sample solution was used as an effective method to enhance the quality of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight(MALDI-TOF) spectra and increased the amount of peaks. A series of experiments were also conducted to further validate the conclusion. A new method in the identification of bacterium using MALDI-TOF mass spectrometry can be made.

Key words: surfactant; Triton X-114; bacteria identification; hydrophobic protein; MALDI-TOF

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0017-03

基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 是蛋白质组学中不可或缺的工具, 被广泛应用于蛋白质的鉴定, 如今其应用已经扩展到细菌鉴定领域。

表面活性剂分子可以在水溶液中形成能够稳定存在的, 内部有一疏水空间的胶束。表面活性剂在水溶液中形成胶束的最小浓度称为临界胶束浓度 (critical micelles concentration, cmc)。非离子型表面活性剂的胶束水溶液在外界条件变化时 (如加热或冷却) 出现浊点现象; 静置一段时间或离心后, 浑浊溶液分为两相: 一相为富含胶束的表面活性剂相, 另一相为含有少量表面活性剂胶束的水相 (胶束浓度为 cmc); 若外界条件向相反方向变化, 则两相消失, 再次形成均一溶液。这时溶解在溶液中的疏水性物质与表面活性剂的疏水基团结合, 被萃取进表面活性剂相; 亲水性物质则留在水相。基于此现象将疏水性物质与亲水性物质进行分离的方法即为浊点萃取法 (cloud point extraction, CPE)。Bordier 最早将 CPE 引入生物学领域, 成功分离了细菌膜蛋白。此后 CPE 被广泛应用于蛋白质的分离与纯化。

通常, 蛋白质样品处理时残留的表面活性剂被认为是导致 MALDI 谱图质量下降的重要因素, 主要表现为信噪比和分辨率的降低; 有关表面活性剂对 MALDI 谱图影响的研究也已有报道。绝大多数实验结果表明, 蛋白质酶解后得到的肽段混合物样品中若含有浓度为 cmc 的阴离子型表面活性剂 SDS, 肽段 MALDI-TOF 质谱图的质量将会得到提高; 而浓度很低的非离子型表面活性剂 Triton X-114 会起到相反的效果, 削弱谱图信号强度。此外, 不同的上样方法之间也被进行了对比研究, 发现利用覆盖上样法可以减少残留的表面活性剂对 MALDI-TOF 质谱图的影响, 这样得到的蛋白质

肽段 MALDI-TOF 质谱图效果最佳。

本实验发现 Triton X-114 对两种不经过酶解的细菌全蛋白 MALDI-TOF 质谱图均有增加峰数、提高峰信号强度的作用, 并且这种效果是 SDS 所不能及的, 并对非离子表面活性剂 Triton X-114 增强细菌全蛋白质谱图质量的原理做了进一步探讨。

1 实验部分

1.1 试剂、材料与仪器

Triton X-114 (cmc 为 0.009% (w/v))、SDS (cmc 为 9 mmol·L⁻¹)、甲酸、 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA)、三氟乙酸 (TFA): 购自美国 Sigma 公司; 乙腈 (色谱纯): 购自韩国 SK Chemicals 公司; 乙醇 (分析纯): 购自北京化学试剂公司; 实验用水为 Milli-Q 去离子水 (美国 Millipore)。菌种: 玉米细菌性褐斑病菌株、玉米细菌性叶斑病菌株, 均由中国检验检疫科学研究院田世民博士提供。MALDI-TOF/TOF 质谱仪: 美国 Applied Biosystems 公司产品。

1.2 菌株处理方法

挑取 5~10 mg 菌苔涂至 1.5 mL 离心管中, 加入 300 μ L 水, 混匀后加入 900 μ L 乙醇。再次混匀后用 10 000 r·min⁻¹ 离心 2 min, 弃去上清液, 将离心管倒置晾干。向沉淀中加入 50 μ L 70% 甲酸、50 μ L 乙腈, 混匀后再次用 10 000 r·min⁻¹ 离心 2 min, 立刻把上清液转移到新离心管中, 置于冰上保存, 即得细菌全蛋白溶液, 弃去沉淀物。

1.3 质谱检测

采用正离子线性模式, 1500 Total Shots/Spectrum。CHCA 基质饱和液用 V (乙腈):V (水):V (0.1%TFA) = 4:5:1 溶液新鲜配制。

样品配制: 细菌全蛋白溶液, 按 1.2 菌株处理方法得到。

混合上样法: 将样品与基质等比例混合后, 直接点在靶板上, 每孔 0.5 μ L。

覆盖上样法: 将 0.5 μ L 样品溶液点在靶板上, 自然干燥后立即覆盖 0.5 μ L 基质溶液。

2 结果与讨论

2.1 上样方法及表面活性剂种类对细菌全蛋白溶液 MALDI-TOF 质谱图的影响

与之前的研究结果不同, 采用混合上样法得到的含表面活性剂的细菌全蛋白 MALDI-TOF 质谱图质量优于覆盖上样法, 而且含 Triton X-114 的细菌全蛋白样品 MALDI-TOF 质谱图质量优于与含 SDS 的对照样品 MALDI-TOF 质谱图。谱图质量的提高均表现为峰数的增加与噪音的降低。已知 Triton X-114 可用于萃取疏水性蛋白, 而 SDS 则没有这种作用。因此, Triton X-114 对 MALDI-TOF 质谱图的影响可能源自于与细菌体内蛋白质之间的相互作用。

2.2 Triton X-114 对细菌全蛋白溶液 MALDI-TOF 质谱图的影响

向玉米细菌性叶斑病菌全蛋白溶液中添加 Triton X-114 后, 谱图发生明显变化, 表现为低、高 m/z 段新峰的出现与中部范围峰的消失。已知绝大多数低 m/z 段峰属于 CHCA 和 (或) Triton X-114 及 SDS, 而高 m/z 段新峰则有可能属于原本被掩盖的低丰度蛋白、蛋白质与表面活性剂聚合物、表面活性剂聚集体或 (和) 表面活性剂与 CHCA 聚合物。

如果新峰仅属于表面活性剂聚集体或 (和) 其与 CHCA 聚合物, 那么不同菌种样品的 MALDI-TOF 质谱图均应出现相同 m/z 值的峰, 而且随着 Triton X-114 浓度的增加, 峰的相对强度也应相应提高。对于添加了 Triton X-114 的玉米细菌性褐斑病菌全蛋白溶液样品, 其 MALDI-TOF 质谱图中虽然也出现了新峰, 但中、高 m/z 段却并没有与叶斑病菌全蛋白 MALDI-TOF 质谱图 m/z 值相同的峰; 而且提高 Triton X-114 的添加量对 MALDI-TOF 质谱图的影响不大。相反, 如果保持 Triton X-114 浓度不变, 而改变菌液浓度, 则可见菌液浓度较高时谱图峰信号较强。因此, MALDI-TOF 质谱图中新出现的峰确实与样品中所含的蛋白质有关。当达到临界胶束浓度时, Triton X-114 在溶液中以胶束形式存在, 胶束内部为一疏水的空腔。溶液中的疏水性蛋白质率先进入 Triton X-114 胶束

内部, 亲水性蛋白质仍然留在胶束外部水溶液中。菌液浓度增加后, Triton X-114 可与更多的疏水性蛋白质结合, 而水溶液中亲水性蛋白质的量也增加了。因此, 虽然峰的相对强度不变 (即细菌体内疏水性蛋白与亲水性蛋白比例固定), 但峰信号得到了整体的增强。

以往探讨 Triton X-114 对 MALDI-TOF 质谱图的影响时, 将其视为残留在样品中的杂质; 本实验则将 Triton X-114 溶液作为一种重要组分与样品溶液等比例充分混合后进行 MALDI-TOF MS 分析, 这与先前的此类研究存在显著差异。

2.3 Triton X-114 对亲水性蛋白质 MALDI-TOF 质谱图的影响

为了证明 Triton X-114 可以选择性萃取疏水性较强的蛋白质, 本实验又加入了如下环节: 小鼠眼眶取血, 静置后不凝固部分即为含有 Ig G 等亲水性蛋白质的血清。取少量血清进行 5 倍稀释, 将样品与 0.009% (w/v) Triton X-114 溶液等比例混合后按照混合上样法点靶, 自然干燥后进行 MALDI-TOF MS 分析。结果显示, Triton X-114 对富含亲水性蛋白质的样品影响不大, MALDI-TOF 质谱图中没有新峰出现, 峰信号也没有得到增强。

3 小结

尽管 Triton X-114 曾被报道会降低蛋白质肽段 MALDI-TOF 质谱图质量, 但它对细菌全蛋白 MALDI-TOF 质谱图产生了积极的作用, 增加了峰数, 提高了信号的整体强度, 并且出现了许多与疏水性蛋白质有关的新峰。这无疑为菌种鉴定工作提供了更多的信息, 并为细菌蛋白质的疏水性研究找到了重要线索, 具有实际意义。日后, 更多的实验工作还有待展开, 例如混合上样法优于覆盖上样法的原因、Triton X-114 浓度对全蛋白 MALDI-TOF 质谱图的影响、Triton X-114 胶束中低丰度疏水性蛋白的鉴定及其与 Triton X-114 胶束的分离等。

(上接第 12 页)

参考文献:

- [1] POLFER N C, OOMENS J, SUHAI S, et al. Infrared spectroscopy and theoretical studies on gas-phase protonated leu-enkephalin and its fragments: direct experimental evidence for the mobile proton[J]. J Am Chem Soc, 2007, 129: 5 887-5 897.
- [2] HU N, TU Y P, LIU Y Q, et al. J Org Chem, 2008, 73(9): 3 369-3 376.
- [3] JIANG K Z, BIAN G F, QIU H Y, et al. The pyrolytic reaction of ketonic hydrazones from S-methyl dithiocarbamate: a combined online GC-MS pyrolysis and DFT study[J]. J Phys Chem A, 2009, 113(4): 697-706.

(上接第 16 页)

3 小结

本研究在负离子模式 CID-ESI-MSⁿ 结果证明, 酶促反应产物二糖的连接方式为 Man1 → 3GlcNAc, *wbaD* 基因能够催化大肠杆菌 O77 的 O-抗原重复单位合成中二糖键 Man-β1-3GlcNAc 的形成, 这与我们已完成的二维 NMR (600 MHz) 分析结果相一致。

参考文献:

- [1] BROCKHAUSEN I, HU B, LIU B, et al. Characterization of two β-1,3-glucosyltransferases from Escherichia coli serotypes O56 and O152[J]. J Bacteriol, 2008, 190(14): 4 922-4 932.