

沙门氏菌 MALDI-TOF-MS 蛋白质 指纹图谱分析方法的研究

陈秀金^{1,2}, 尹红红¹, 匡华^{*1}, 胥传来¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 河南科技大学 食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003)

摘要:以沙门氏菌标准菌株(*Salmonella enterica* DSM 17058 T)为研究对象,用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对其进行蛋白质指纹图谱分析,进而得到正确的鉴定结果。为了获得重现性良好的质谱图,对沙门氏菌的最佳培养基、最适培养时间以及样品前处理方法进行了优化,从而确立沙门氏菌 MALDI-TOF-MS 蛋白质指纹图谱标准分析方法。结果表明:乙醇/甲酸处理法所得图谱中的特征峰多,包含更多的蛋白标志物,所得图谱基线平滑,噪音少,信噪比高,是最佳的样品处理方法。以营养丰富的哥伦比亚琼脂为培养基,在 24 h 时即可达到强峰值信号,质谱图重现性良好,鉴定结果准确,并且相比于其它 3 种培养基所需培养时间短。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 沙门氏菌; 鉴定; 影响因素

中图分类号: O 657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2012)011—1189—09

Studies on the Protein Fingerprint of *Salmonella* by MALDI-TOF-MS

CHEN Xiu-jin^{1,2}, YING Hong-hong¹, Kuang Hua^{*1}, XU Chuan-lai¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. College of Food and Biological Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: Using *Salmonella enterica* DSM 17058 T as the research model, the protein fingerprint of *Salmonella* was studied to obtain an accurate identification result based on MALDI-TOF-MS. In order to achieve a good reproducibility of the protein map and establish the standard analysis method by MALDI-TOF-MS, different mediums, culture times and sample handing methods were optimized. The results showed that more characteristic peak of protein with smooth baseline, less noise and higher signal-to-noise ratio were obtained by ethanol/formic acid treatment method. Taking Columbia Agar Base as the culture medium, the protein map with strong signal and good repeatability was acquired after 24h, which took less time compared with other mediums.

Keywords: MALDI-TOF-MS, *Salmonella*, Identification, Influencing factors

收稿日期: 2012-06-17

基金项目: 江苏省科技厅和国家质检公益行业课题资助项目(201110060, 201110016, 201110061, 201210036, 311002, BY2009113, BE2011626, BK2010001, BK2010141)。

作者简介: 陈秀金(1977—), 女, 河南洛阳人, 食品安全专业博士研究生, 主要从事食品安全研究。E-mail: chenxj9610@sohu.com

* 通信作者: 匡华(1981—), 女, 河南新乡人, 工学博士, 副教授, 主要从事食品安全研究。E-mail: kuangh@jiangnan.edu.cn

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)是近年来发展的一种新型的软电离技术,可通过检测未知微生物或生物大分子的特征性生物标志物,实现对未知微生物的快速检测、鉴定、分型、溯源以及有毒株和无毒株的区别等^[1-5]。其基本原理为:将微生物样品与基质溶液以一定比例混合或分别点加在样品板上,溶剂挥发后形成样品与基质的共结晶,利用激光作为能量来源辐射共结晶体,基质从激光中吸收能量使样品解吸,经过飞行时间检测器,基质与样品之间发生电荷转移使不同质荷比(m/z)的离子分开,以离子质荷比(m/z)为横坐标,离子峰强度为纵坐标,形成含有标志物相对分子质量信息的质谱图,将质量图谱与已知质谱图数据库中的特征性质谱图比对,得到正确的鉴定结果^[6-7]。

质谱图的重现性是微生物获得准确鉴定的重要因素,如培养基、培养时间、样品处理方法等对微生物质谱图的峰型分布都有一定的影响^[8-9]。作者以沙门氏菌标准菌株(*Salmonella enterica* DSM 17058 T)为研究对象,分析了影响微生物质谱图的实验参数,为建立MALDI-TOF-MS检测沙门氏菌的分析方法奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 标准菌株:沙门氏菌(*Salmonella enterica* DSM 17058 T),购自德国微生物菌种保藏中心DSMZ。

1.1.2 培养基 HE琼脂培养基、SS琼脂培养基、哥伦比亚琼脂培养基、亚硫酸铋琼脂培养基均购自杭州微生物试剂有限公司。

1.1.3 试剂 无水乙醇:色谱级,购自百灵威科技有限公司;甲酸(formic acid,FA)、乙腈(acetonitrile,ACN)、和三氟乙酸(trifluoroacetic acid,TFA):均为色谱纯,购于Sigma公司;基质 α -氰-4-羟基肉桂酸(α -Cyano-4-hydroxy-cinnamic acid,CHCA),校准蛋白干粉(protein calibration standard):购自德国布鲁克公司。

1.1.4 实验仪器 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(ultrafleXtreme MALDI-TOF):德国布鲁克公司产品。

1.2 方法

1.2.1 样品不同处理方法分析

1) 样品前处理 以沙门氏菌(*Salmonella enterica* DSM 17058 T)作为实验菌株,进行样品不同前处理方法的分析。

乙醇/甲酸法:取一接种环(约5~10 mg)新鲜培养菌落置于Eppendorf管中,用300 μ L纯水充分悬浮混匀,再加入900 μ L乙醇,以12 000 g 离心2 min后弃尽上清。沉淀用50 μ L体积分数70%甲酸充分悬浮,再加入50 μ L ACN混匀,以12 000 g 离心2 min。

OS法:取一接种环(约5~10 mg)新鲜培养菌落置于Eppendorf管中,用100 μ L纯水充分悬浮混匀,再加入100 μ L含体积分数5% TFA的ACN,充分混匀后以12 000 g 离心2 min。

TFA法:取一接种环(约5~10 mg)新鲜培养菌落置于Eppendorf管中,用50 μ L体积分数80% TFA充分悬浮反应30 min,此步可灭活高致病性病原体及其芽胞。先后加入150 μ L纯水和200 μ L ACN,充分混匀后以12 000 g 离心2 min。

2) 点样 取以上得到的上清1 μ L加至点样靶,每种处理方法得到的样品平行点3个孔,待液滴晾干后,覆盖1 μ L饱和基质CHCA,干燥后进行MALDI-TOF-MS检测。

3) MALDI-TOF-MS鉴定与数据采集分析 用ultrafleXtreme MALDI-TOF质谱仪对样品进行数据采集,加速电压24.5 kV,延迟提取电压23.15 kV,设定相对分子质量范围2 000~20 000,激光频率50 Hz,每次试验前都要在采集数据的质量范围内使用肽蛋白标准品进行校准,以保证获得数据误差小于 ± 5 数据的采集分析。

通过BiotyperTM 3.0软件对采集到的图谱进行分析鉴定,与数据库中的标准图谱进行比对,并给出相对应的分数,分数在2.300~3.000之间,表示菌种鉴定的可信度较高;在2.000~2.299之间,表示保守的菌属鉴定或可能的菌种鉴定;在1.700~1.999之间,表示可能的菌属鉴定;在0.000~1.699之间,表示不可信的鉴定。

1.2.2 适宜培养基和培养时间的选择 将沙门氏菌(*Salmonella enterica* DSM 17058 T)接种于HE琼脂培养基、SS琼脂培养基、哥伦比亚琼脂培养基、亚硫酸铋琼脂培养基,分别于37 $^{\circ}$ C培养24、36、48、60、72 h时分别取样,用乙醇/甲酸法对样品进行处

理,其余操作与以上操作步骤相同,点样后对样品进行测定并读取图谱,比较其图谱的重现性。

1.2.3 培养基对图谱峰背景信号影响 在不同培养基不同培养时间取样的同时,挑取一块未繁殖微生物的培养基,培养基的处理方法同微生物样品的处理方法相同,对其进行 MALDI-TOF-MS 分析,最终得到培养基的质谱图。

2 结果与分析

2.1 样品最适处理方法的确定

以 *Salmonella enterica* DSM 17058 T 作为实验菌株,培养 24 h 后分别用乙醇/甲酸法、OS 法和 TFA 法对样品进行处理,其 MALDI-TOF MS 图谱如图 1 所示。

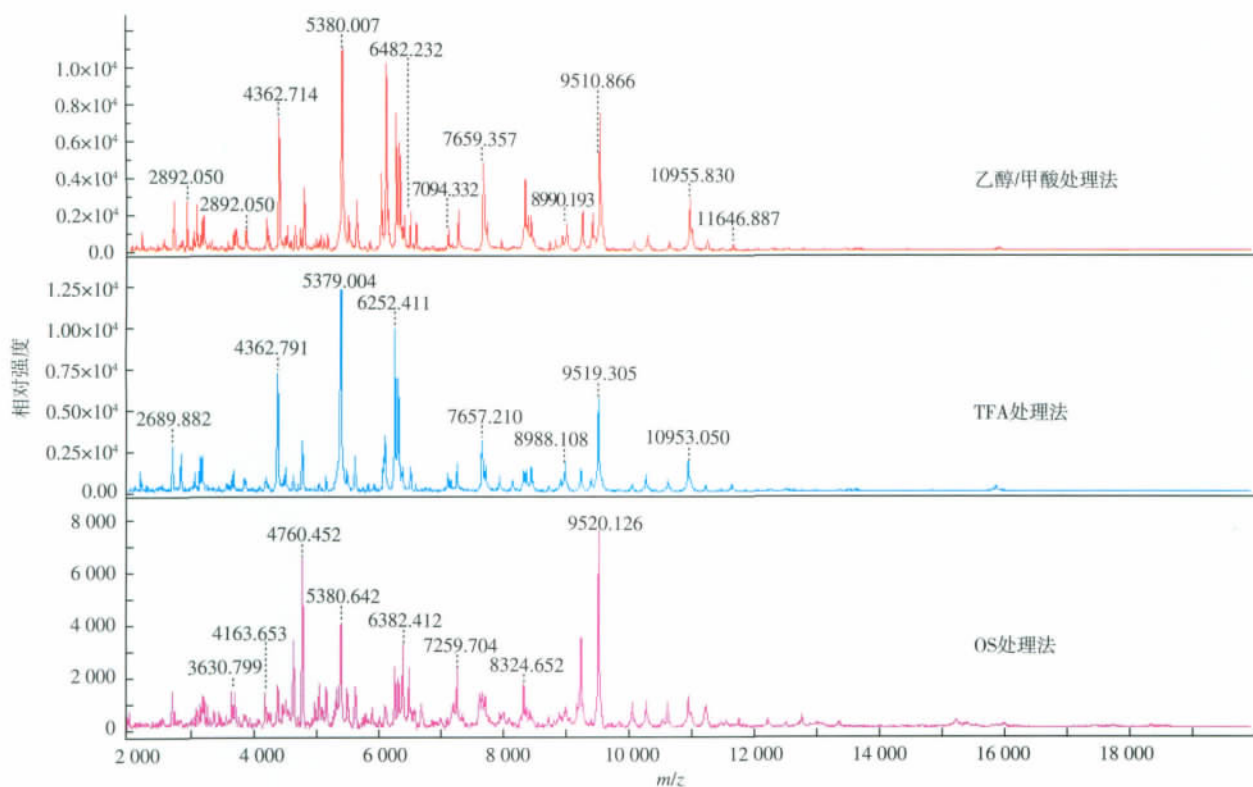


图 1 不同处理方法对细菌蛋白指纹图谱的影响

Fig.1 Effect of different pre-treatments on protein mass spectrometric profiles

图谱的横坐标表示样品离子的质量电荷比(m/z),纵坐标表示离子丰度(Intens)。由图可见,3 种样品处理方法所获得的图谱中,OS 处理法提取的蛋白特征峰最少,并且有些特征峰的位置发生了变化。乙醇/甲酸处理法所得图谱中的特征峰多,包含更多的蛋白标志物,所得图谱基线平滑,噪音少,信噪比高。而 TFA 处理法虽然获取图谱的蛋白标志物少于乙醇/甲酸处理法,但是 TFA 处理法能有效灭活高致病性病原微生物的繁殖体及其芽胞。

2.2 适宜培养基和培养时间的确定

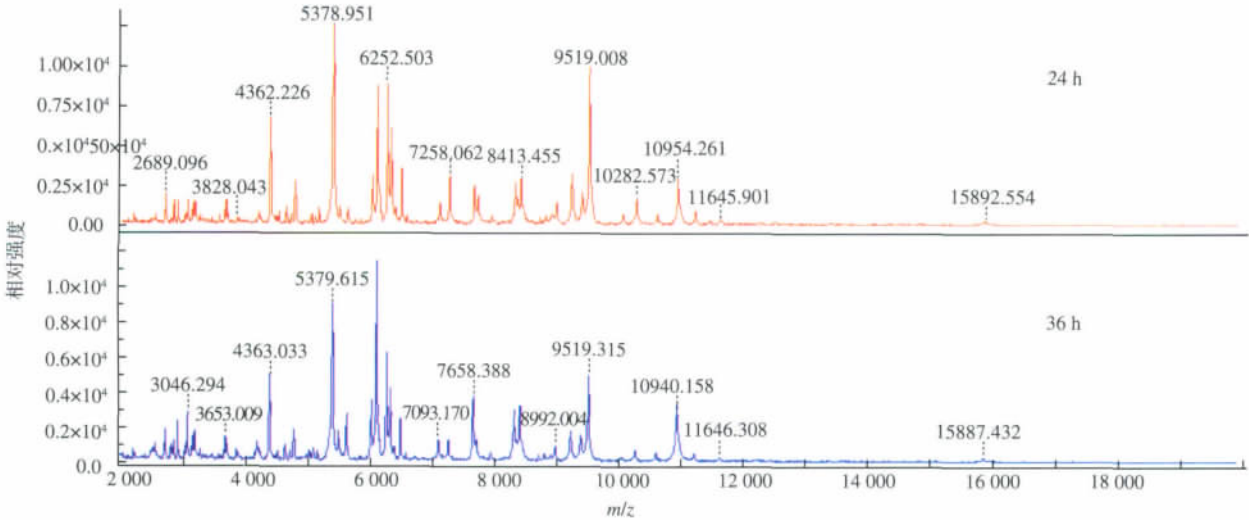
在不同培养基上生长的微生物,由于摄取的营

养成分不同,因此生长特性各异,同时,不同的培养时间微生物的生长状态,蛋白质表达的种类和含量也有所差异,反映在质谱图上可以表现为特征峰的数量、位置、强度和峰形不一。对此,分别将 *Salmonella enterica* DSM 17058 T 接种于 HE 琼脂培养基、SS 琼脂培养基、哥伦比亚琼脂培养基、亚硫酸铋琼脂培养基,分别于 37 °C 培养 24、36、48、60、72 h 时分别取样,用乙醇/甲酸法处理后读取图谱。四种培养基分别在 4 个时间的鉴定结果如表 1 所示,鉴定结果的分值均在 2.300 以上,鉴定结果可靠,同时随着培养时间的延长,在 72 h 内鉴定结果一致。

表 1 *Salmonella enterica* DSM 17058 T 的结果报告
Tab.1 Detection results of *Salmonella enterica* DSM 17058 T by MALDI-TOF-MS

匹配菌株序号(匹配程度)	匹配的数据库菌株号	可信度分数
1(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.479
2(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.489
3(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.480
4(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.400
5(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.416
6(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.509
7(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.504
8(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.429
9(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.453
10(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.362
11(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.376
12(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.502
13(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.516
14(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.536
15(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.362
16(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.349
17(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.533
18(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.494
19(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.467
20(+++)	Salmonella sp (enterica st Enterica) DSM 17058T	2.379

说明:1-5、6-10、11-15、16-20 分别为沙门氏菌在哥伦比亚琼脂、HE 琼脂、亚硫酸铋琼脂、SS 琼脂在 24-72 h 的鉴定结果。



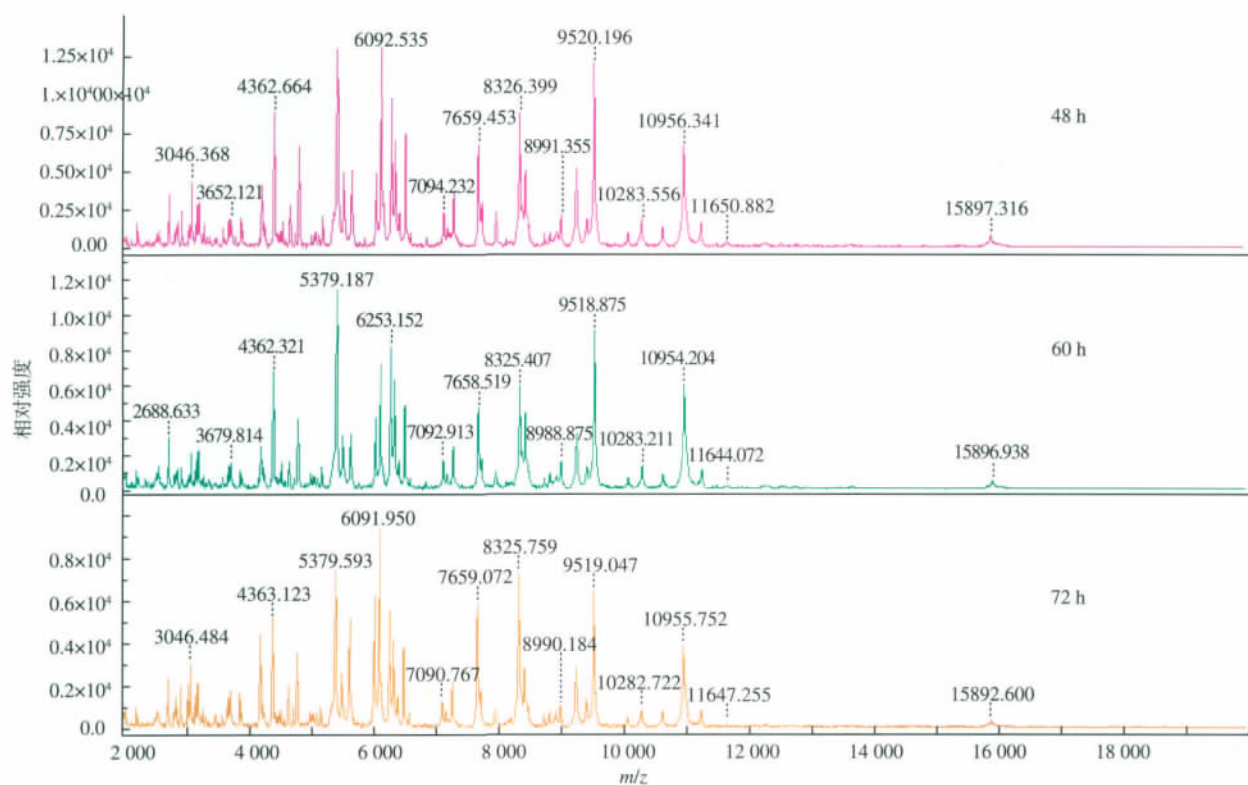
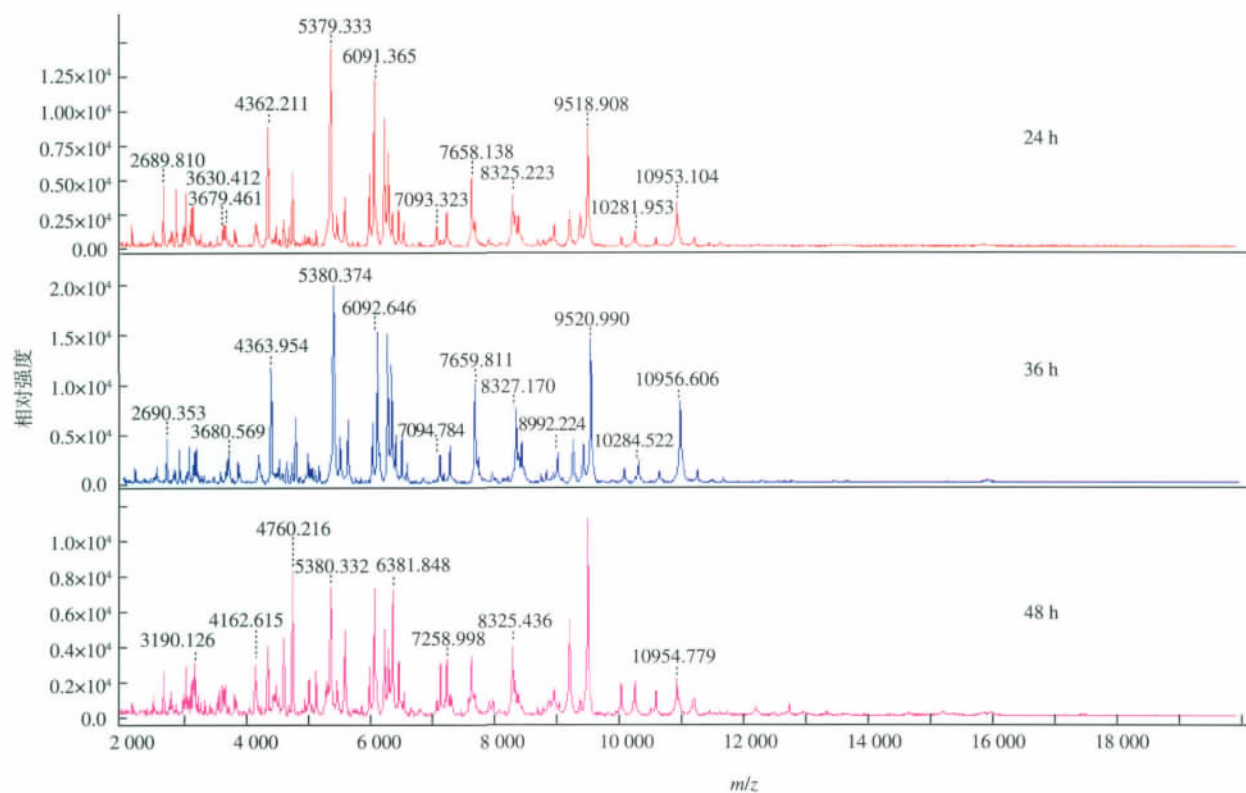


图2 哥伦比亚培养基对细菌全细胞蛋白指纹图谱的影响

Fig.2 Effect of Columbia Agar Base on protein mass spectrometric profiles



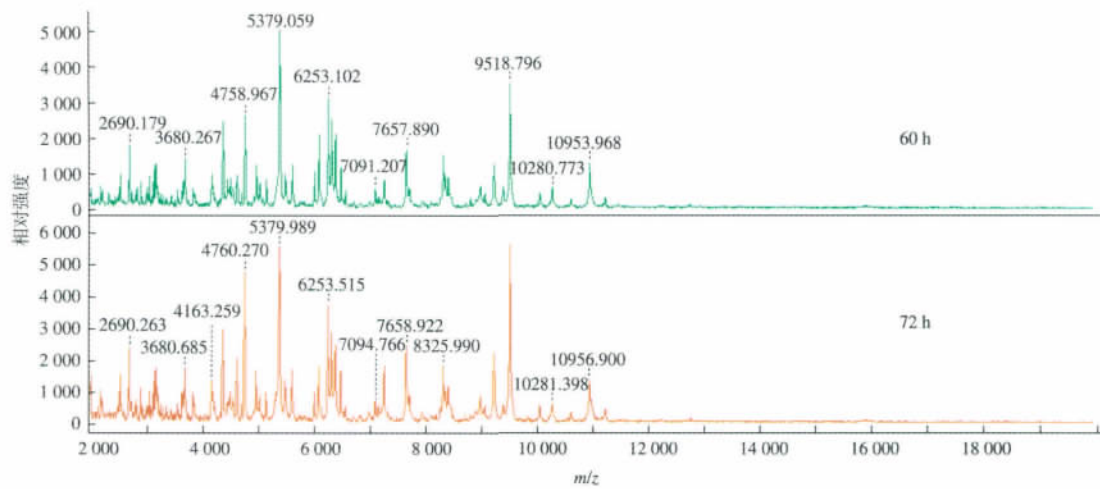
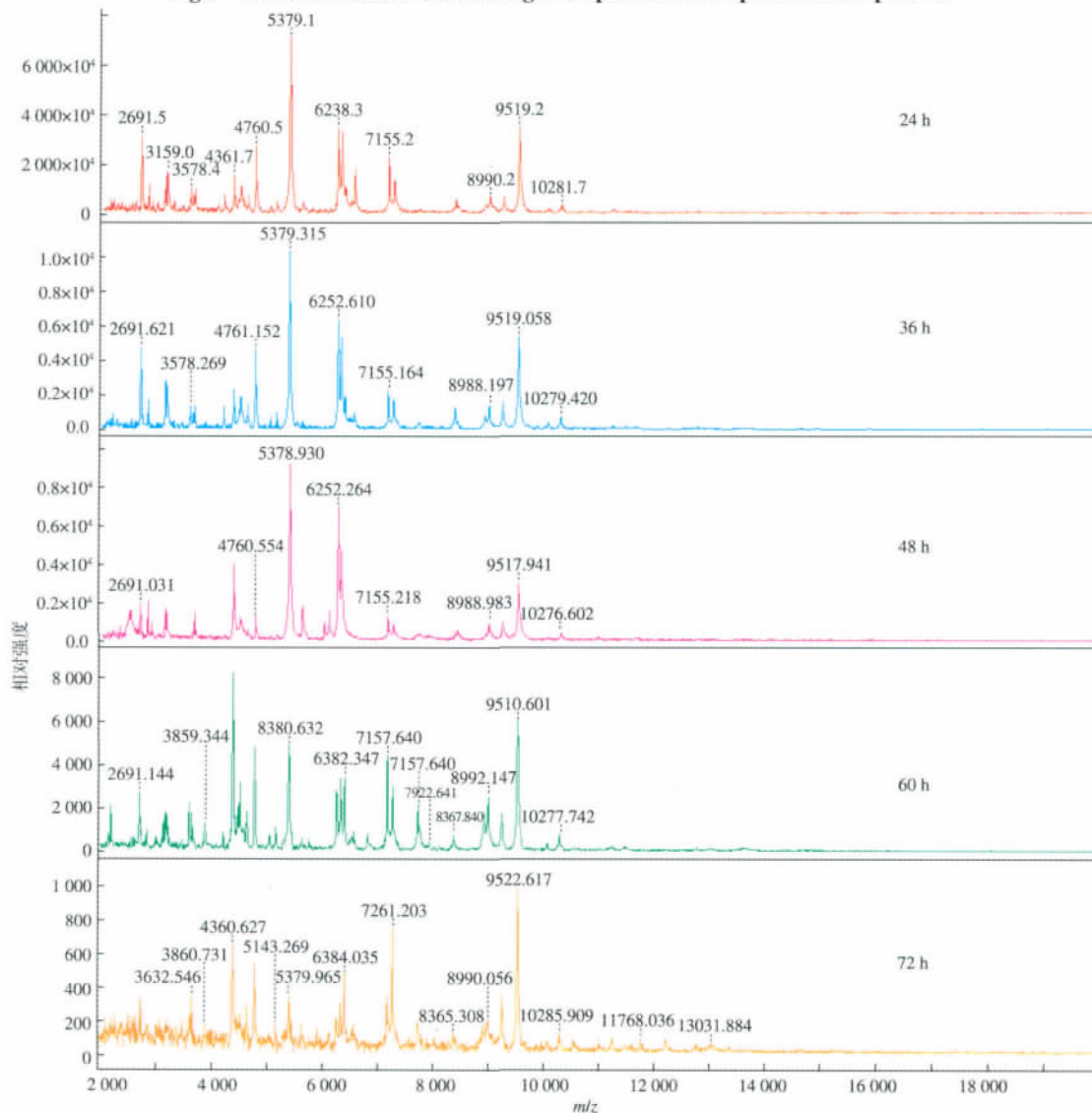


图3 HE培养基对细菌全细胞蛋白指纹图谱的影响

Fig.3 Effect of Hektoen Enteric Agar on protein mass spectrometric profiles



· 图4 亚硫酸铋培养基对细菌全细胞蛋白指纹图谱的影响

Fig.4 Effect of Bismuth Sulfite Agar on protein mass spectrometric profiles

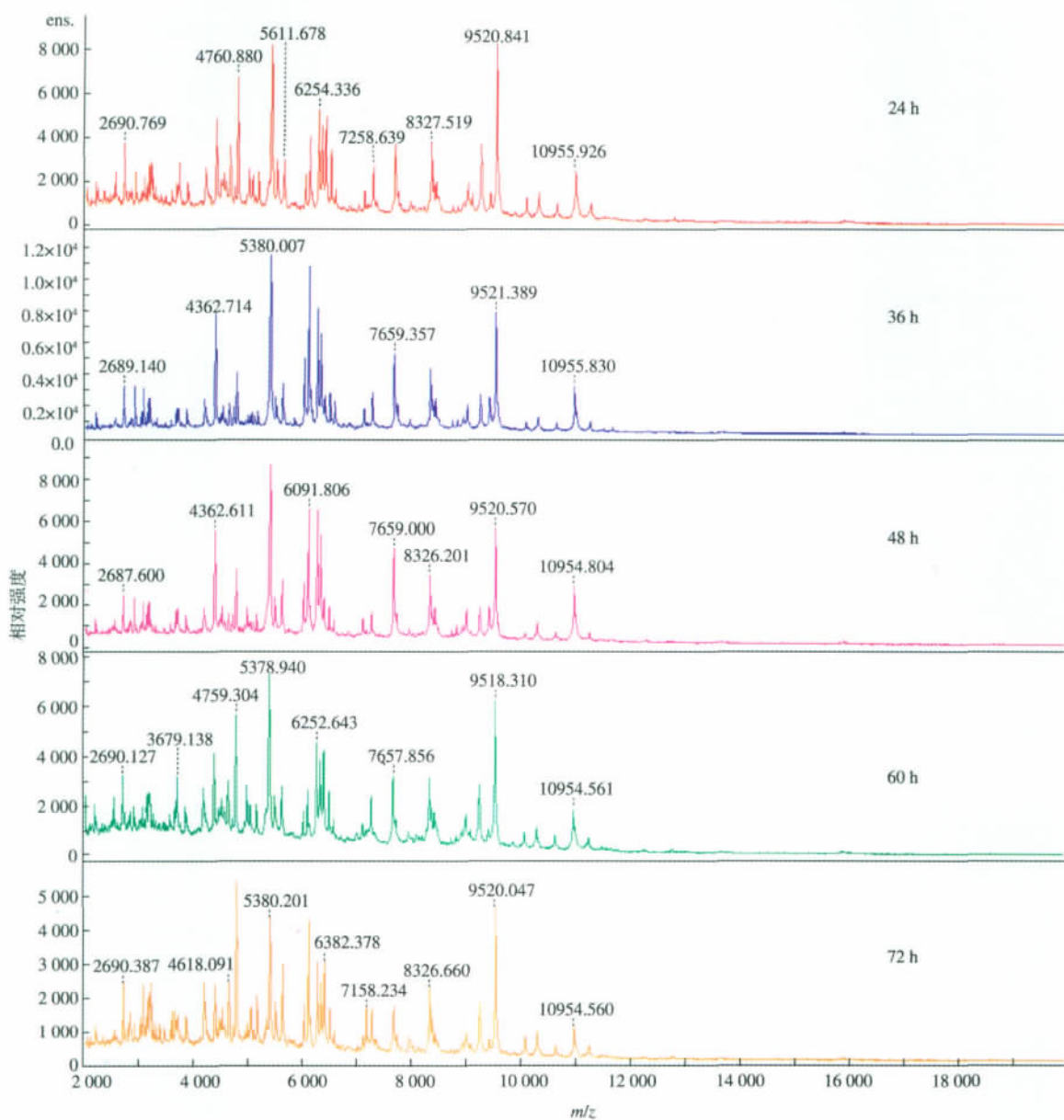


图5 SS培养基对细菌全细胞蛋白指纹图谱的影响

Fig.5 Effect of Salmonella Shigella Agar on protein mass spectrometric profiles

图2~5分别为4种培养基不同培养时间的质谱图。从质谱图得出,哥伦比亚培养基中,当达到48 h时峰值信号强度达到最大,继续培养,所有特征峰的强度都逐渐降低;而在HE培养基、亚硫酸铋培养基、SS培养基中,当达到36 h时,峰信号强度达到最大,随后所有特征峰的强度都逐渐降低。对于相同时间内不同培养基来说,特征峰的位置没有变化,而相同时间不同培养基的峰信号强度有所差异。对于哥伦比亚培养基,所有时间内的峰信号强度都强于其他培养基对应时间内的峰值信号强度,而其他3种培养基,在36 h时,3种培养基中的峰

信号都达到最大值,强度基本一致,48~60 h,峰值信号都有同等程度的下降,峰值基本相同,达到72 h时,亚硫酸铋琼脂中的峰值信号强度最低,HE琼脂峰值信号强度稍高于亚硫酸铋琼脂峰值信号强度,因此在72 h后峰信号强度差异明显。从鉴定结果和质谱图的质量来看,哥伦比亚琼脂是适于沙门氏菌培养和鉴定的最适培养基,24 h时即可达到强峰值信号并且正确的鉴定结果。

由此得出,不同培养基不同培养时间微生物的指纹图谱峰值强度有所差别,但是特征峰的分布相同,所获取的图谱均可以得到正确的鉴定结果,即

不同的培养基对于细菌的鉴定结果没有影响。

2.2 培养基对微生物图谱峰信号的影响

对不同培养基不同培养时间挑取的一块未繁

殖微生物的培养基进行 MALDI-TOF-MS 数据采集,结果见图 6。

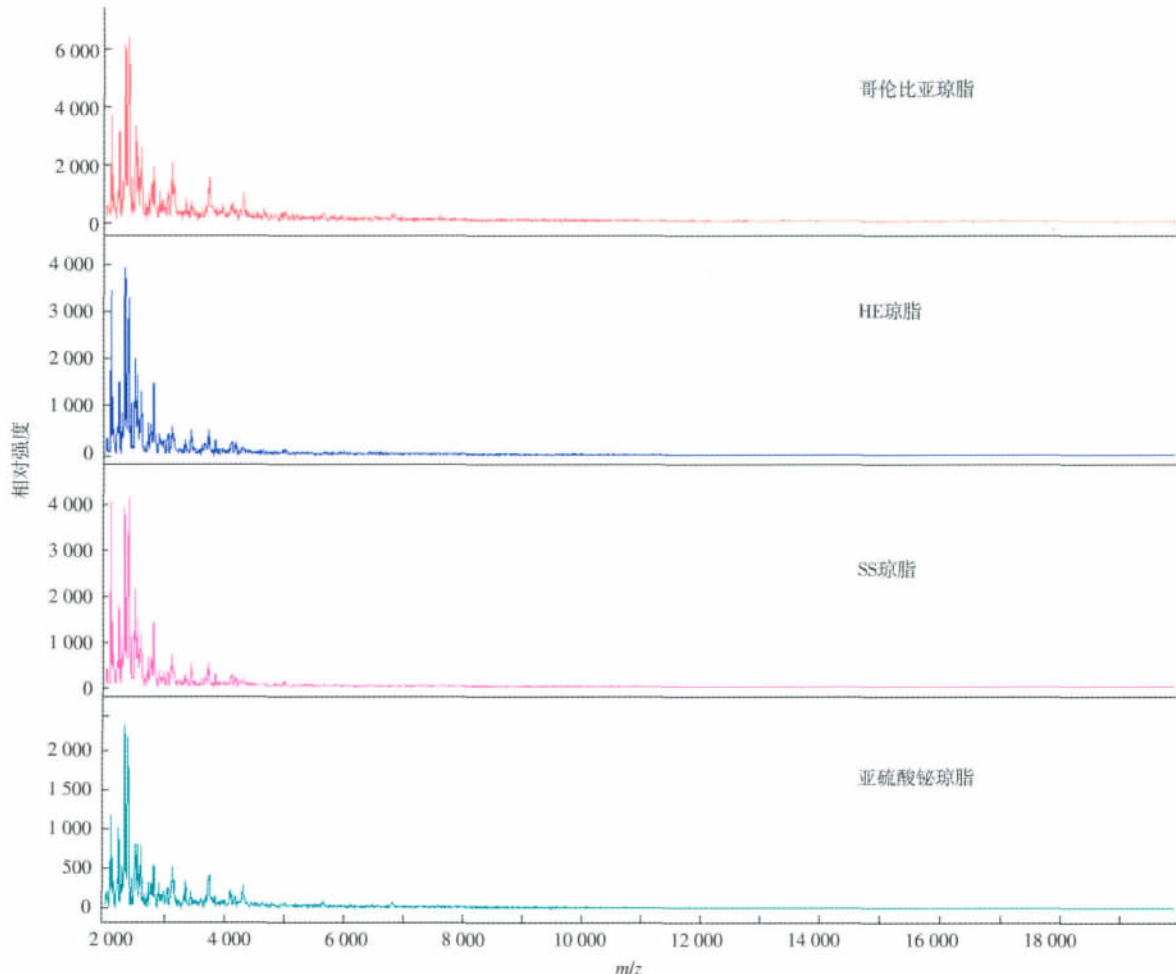


图 6 培养基背景信号对细菌全细胞蛋白指纹图谱的影响

Fig.6 Effect of different mediums on protein mass spectrometric profiles

图 6 为以培养 24 h 的 4 种培养基图谱为例,从图中可以看出,单纯培养基的峰信号集中在相对分子质量为 2 000~4 000 之间,将这些信号与培养 24 h 的微生物峰信号相比,培养基的峰信号不包含在微生物的特征峰中,所以仅以微生物取样的过程中,几乎没有培养基的干扰,可以不考虑培养基对微生物质谱图带来的影响。同时,36、48、60、72 h 的培养基图谱与 24 h 的图谱相同,随着培养时间的延长培养基的峰形没有发生任何变化。

3 结 语

近年来,MALDI-TOF-MS 技术已经越来越多地用于食源性致病菌的快速鉴定^[10-12]。基于 MALDI-

TOF MS 的细菌全细胞蛋白指纹图分析方法是根据细菌的蛋白质组表达的比较来进行的,因此更为准确和直接。在很宽的条件范围内,MALDI-TOF MS 全细胞蛋白指纹图分析方法都被证明是很稳定的。这种稳定性是建立在对稳定表达的高丰度的蛋白质测量基础上的,如核糖体蛋白。在很少出现代谢物的 2 000~20 000 质量范围内,这些高丰度蛋白的谱峰可被观察到。然而获得良好的质谱图是进行正确鉴定的前提,只有优化影响质谱图重现性的各种因素,才能建立标准的 MALDI-TOF-MS 蛋白质指纹图谱分析方法^[13]。

通过对沙门氏菌 (*Salmonella enterica* DSM 17058 T) 的 MALDI-TOF 质谱分析结果表明,样品

处理方法对 MALDI-TOF 质谱分析结果有一定影响。对于毒性较小的微生物,乙醇/甲酸处理法是最好的样品处理方法,分析得到的图谱提供的信息量多、离子峰的个数和强度均较好,从而得到较好的实验结果。对于高致病性病原微生物,则用 TFA 处理法以保证对微生物进行最大强度的灭活。

MALDI-TOF-MS 技术在国内尚处于探索阶段。它所具有的样品预处理过程简便快捷、操作简便、

检测范围广、测定速度快、仪器自动化程度高等优势,对食源性致病菌的检测、鉴定、分型、溯源等领域都具有重要意义^[14-15]。影响 MALDI-TOF-MS 分析的问题一旦解决,建立起 MALDI-TOF-MS 蛋白质指纹图谱分析的标准方法,该技术的潜能将在食源性致病菌检测鉴定领域得到极大发挥,为人类生命健康及安全造福^[16]。

参考文献:

- [1] Maier T, Klepel S, Renner U, et al. The MALDI BioTyper: Identification and Classification of microorganisms by MALDI-TOF MS fingerprints.
- [2] Elssner T, Kostrzewa M, Maier T, et al. Microorganism Identification Based On MALDI-TOF-MS Fingerprints [J]. **Detection of Biological Agents for the Prevention of Bioterrorism**, 2011: 99-113.
- [3] Mazzeo M F, Sorrentino A, Gaita M, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms[J]. **Appl Environ Microb**, 2006, 72(2): 1180-1189.
- [4] Madonna A J, Cuyk S V, Voorhees K J. Detection of Escherichia coli using immunomagnetic separation and bacteriophage amplification coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. **Rapid Commun Mass Sp**, 2003, 17(3): 257-263.
- [5] Madonna AJ, Basile F, Furlong E, et al. Detection of bacteria from biological mixtures using immunomagnetic separation combined with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. **Rapid Commun Mass Sp**, 2001, 15(13): 1068-1074.
- [6] Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry [J]. **Mass Spectrom Rev**, 2001, 20(4): 157-171.
- [7] Ryzhov V, Fenselau C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells [J]. **Anal Chem**, 2001, 73(4): 746-750.
- [8] Williams T L, Andrzejewski D, Lay J O, et al. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells [J]. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 2003, 14 (4): 342-351.
- [9] Hsieh SY, Chen RK, Pan YH, et al. Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling[J]. **Proteomics**, 2006, 6(10): 3189-3198.
- [10] Du Z, Yang R, Guo Z, et al. Identification of staphylococcus aureus and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. **Anal Chem**, 2002, 74(21): 5487-5491.
- [11] Barbuddhe S B, Maier T, Schwarz G, et al. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. **Appl Environ Microb**, 2008, 74(17): 5402-5407.
- [12] Fagerquist C K, Garbus B R, Miller W G, et al. Rapid identification of protein biomarkers of escherichia coli O157:H7 by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight time-of-flight mass spectrometry and top-down proteomics [J]. **Anal Chem**, 2010, 82(7): 2717-2725.
- [13] Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, et al. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry[J]. **Appl Environ Microb**, 2005, 71(1): 58-64.
- [14] Lay Jr J. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy [J]. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 2000, 19(8): 507-516.
- [15] Maier T, Klepel S, Renner U, et al. Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification [J]. **Nature Methods Application Notes**, 2006.
- [16] Giebel R, Worden C, Rust S, et al. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): applications and challenges[J]. **Advances in applied microbiology**, 2010, 71: 149-184.