

应用SELDI-TOF-MS技术分析SEB染毒小鼠血清蛋白质组学变化

张靖, 张军, 应天翼, 高川, 宋云扬, 王惠芳

张靖, 张军, 应天翼, 高川, 宋云扬, 王惠芳, 防化研究院第四研究所 北京市 102205

通讯作者: 王惠芳, 102205, 北京市, 防化研究院第四研究所. bjzhangjing@tom.com

电话: 01066758323

收稿日期: 2006-03-10 接受日期: 2006-03-24

Application of SELDI-TOF-MS technology in detection of serum proteomic changes of mice exposed to staphylococcal enterotoxin B

Jing Zhang, Jun Zhang, Tian-Yi Ying, Chuan Gao, Yun-Yang Song, Hui-Fang Wang

Jing Zhang, Hui-Fang Wang, Jun Zhang, Tian-Yi Ying, Chuan Gao, Yun-Yang Song, Research Institute of Chemical Defense, Beijing 102205, China

Correspondence to: Hui-Fang Wang, Research Institute of Chemical Defense, Beijing 102205, China. bjzhangjing@tom.com

Received: 2006-03-10 Accepted: 2006-03-24

Abstract

AIM: To study the changes of serum proteome in mice exposed to staphylococcal enterotoxin B (SEB).

METHODS: The serum proteins in mice exposed to SEB were detected by surfaced enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectroscopy (SELDI-TOF-MS) and weak cation exchange proteinchip. The data were read with PBSII-C type proteinchip reader and analyzed with Biomarker Wizard and Biomarker Patterns Software of Ciphergen Company.

RESULTS: In comparison with the control group, there were significant deviations of 11 proteins in the test group. Among them, 8 proteins were up-regulated and 3 down-regulated.

CONCLUSION: Marked serum proteomic changes exist in mice exposed to SEB, which may be related to the toxicity and pathological effect of SEB.

Key Words: SELDI-TOF-MS; Protein biochip; Staphylococcal enterotoxin B; Marker protein

Zhang J, Zhang J, Ying TY, Gao C, Song YY, Wang HF. Application of SELDI-TOF-MS technology in detection of serum proteomic changes of mice exposed to staphylococcal enterotoxin B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14(11): 1111-1114

摘要

目的: 把蛋白质芯片和SELDI质谱技术应用于金黄色葡萄球菌肠毒素B(staphylococcal enterotoxin B, SEB)染毒小鼠血清蛋白质组研究, 分析染毒小鼠血清蛋白质组的变化。

方法: 采用表面增强激光解吸电离飞行时间质谱技术和弱阳离子交换蛋白质芯片检测染毒小鼠血清蛋白质的变化, 使用PBSII-C型蛋白质芯片阅读器读取数据, 获得的结果采用Ciphergen公司的Biomarker wizard和Biomarker Patterns System软件进行分析。

结果: 实验组与对照组血清蛋白质谱相比有11个蛋白质有显著差异, 其中8个蛋白质表达上调, 3个表达下调。

结论: SEB染毒小鼠血清蛋白质组发生显著变化, 可能与SEB的毒理学与病理学作用有密切关系。

关键词: SELDI-TOF-MS; 蛋白质芯片; SEB; 标志蛋白

张靖, 张军, 应天翼, 高川, 宋云扬, 王惠芳. 应用SELDI-TOF-MS技术分析SEB染毒小鼠血清蛋白质组学变化. *世界华人消化杂志* 2006;14(11):1111-1114

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1111.asp>

0 引言

金黄色葡萄球菌肠毒素B(SEB)是一种腹泻型毒素, 可引起食物中毒且发病较急, 其中毒的第一个症状为恶心, 接着呕吐、腹部痉挛和腹泻

■背景资料

表面增强激光解吸电离(SELDI)蛋白质芯片技术是2002年提出出来的一项新兴的蛋白质组学研究技术, 已经引起了学术界的高度重视, 在生物学和临床医学等方面具有广泛的应用前景。利用蛋白质芯片具有高度并行性、高通量、微型化和自动化等其他方法无法比拟的优越性, 在病理学、药理学和毒理学等方面初步取得了卓越的研究成果。金黄色葡萄球菌肠毒素B是肠源性毒素, 到目前为止, 人们尚不清楚其作用机制。

■创新盘点

本文应用SELDI-TOF-MS技术分析SEB中毒所引起的蛋白质组学的变化,为临床治疗提供依据,同时探索SELDI技术在细菌类毒素中毒诊断方面的应用,以便深入分析毒素中毒病理学和毒理学变化。

等,也可引起肺水肿、循环衰竭;重者吐血、便血、甚至虚脱、休克,呼吸困难及发绀,脓毒血症甚至死亡^[1-4]。金黄色葡萄球菌对青霉素、磺胺等耐受,中毒后救治非常棘手。迄今为止人们对SEB的中毒机制仍不十分清楚,任何疾病在出现病理变化之前,其细胞内部的蛋白质成分和数量都会发生相应的变化。因而,可以通过动态观察病变早期蛋白质组的改变推断疾病的作用机制。目前蛋白质组学研究的主要技术是双向电泳和生物质谱技术,虽然双向电泳技术已经比较成熟,但他的实验过程复杂、样本的需求量大、低通量、重复性差且实验成本很高。为适应蛋白质组学研究的发展,一些新技术应运而生,其中表面增强激光解析电离(SELDI)蛋白质芯片技术^[5-6]。由诺贝尔化学奖获得者田中发明、Ciphergen系统生物公司制造的特殊蛋白质芯片质谱技术—表面增强的激光解析电离飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS)已开始引起学术界的重视,并在临床检测中做出卓越成果。蛋白质芯片具有高度并行性、高通量、微型化和自动化等其他方法难以比拟的优越性,蛋白质芯片采用光敏染料标记,灵敏度高,准确性好^[7-8]。同时SELDI蛋白质芯片技术的出现部分弥补了双向电泳技术的不足,使筛选低丰度小分子蛋白甚至肽成为现实。目前SELDI技术主要应用于生物医学基础研究和疾病的诊断,特别是在肿瘤的早期诊断方面用得较多,目前极少见到有关SELDI技术在病理学研究方面的报道^[9-11]。我们尝试SELDI技术应用于肠毒素SEB的蛋白质组病理学研究。实验中,采用蛋白质芯片技术检测SEB染毒小鼠血清蛋白质谱的变化,了解SEB中毒后血清蛋白质组学中敏感性高和特异性强的蛋白分子,探索SELDI技术在肠源性细菌检测、疾病诊断、预防、治疗及病理学研究中的应用。

1 材料和方法

1.1 材料 乙腈、三氟乙酸、尿素、Hepes、水(HPLC级)、Tris碱、CHAPS、DTT、SPA(Sinapinic acid)购自Sigma公司,其他为市售进口试剂。BALB/c小鼠,8周龄♀,购自芭尔比公司。WCX2芯片(弱阳离子交换芯片)和蛋白芯片飞行时间质谱仪PBSII-C,购于美国Ciphergen Biosystems公司。

1.2 方法 SEB的染毒剂量为2 mg/kg, ip, 对照组

注射相同体积的生理盐水。小鼠染毒4 h后眼眶采血^[12], 4℃静置2 h, 3000 g离心5 min, 分装血清, 每管20 μL, 冻存于-70℃备用。从-70℃冰箱内取出血清, 冰上解冻, 4℃ 1000 g离心4 min。取血清10 μL加入U9处理液20 μL(9 mol/L尿素, 20 g/L CHAPS, 10 g/L DTT, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0), 充分混匀, 冰浴振荡30 min后加入100 mmol/L NaAc 360 μL, pH 4.0, 立即混匀, 静置30 min后上样。将WCX2芯片安装于bioprocessor上, 每孔加入结合缓冲液200 μL, 室温振荡洗涤2次, 每次5 min, 用力甩干。每孔分别加入样本混合液100 μL, 振荡孵育1 h, 甩去样品, 用100 mmol/L NaAc 200 μL, pH 4.0室温振荡洗涤2次, 每次5 min, 甩干, 再用超纯水洗涤1次, 立即甩干。拆开bioprocessor, 取出芯片, 待芯片表面自然晾干后, 各点加2次SPA0.5 μL, 芯片表面干燥后, 采集数据。采用蛋白芯片飞行时间质谱仪对结合在弱阳离子WCX2芯片上的血清蛋白进行读取分析, 设定最高 M_r 为50 000, 优化范围为2000-20 000, 激光强度195, 检测灵敏度为8。考虑到基质峰的存在, 将1000以下的峰滤去, 以免基质峰对结果造成干扰。采用Ciphergen Biosystems公司的Proteinchip 3.1版本的分析软件自动采集数据, 采用Biomarker Wizard软件分析实验前后血清的蛋白质指纹图谱差异。图谱标准化的参数设定: 强度范围-5-75, 质荷比范围1000-50 000, 并以6825 Da蛋白峰进行校正对齐。

统计学处理 采用Ciphergen Biosystems公司的Proteinchip 3.1软件对数据进行统计学处理, 比较两组之间蛋白质峰强度时, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 差异蛋白质峰的检测 所有原始数据先用Proteinchip软件做校正(总离子强度及分子质量的均一化)。对位于1000-50 000的质荷比峰值, 用Biomarker Wizard过滤噪音, 初始噪音过滤值为5, 第2次的噪音过滤值为2, 以10%为最小阈值进行聚类。得到初步结果后, 对筛选出来的179个质/荷比峰(为单电荷峰), 做实验组与对照组的成组数据均数比较 t 检验, 发现实验组和对照血清蛋白质图谱相比有11个明显差异蛋白峰, 其中8个蛋白质上调, 3个下调(表1)。

2.2 差异蛋白质峰图和模拟胶图的比较 11个差

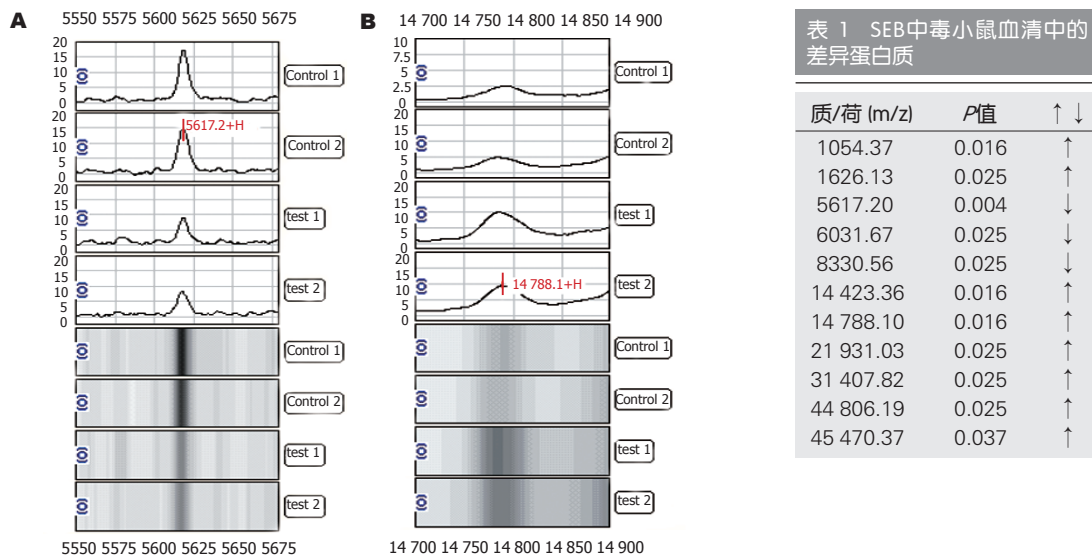


图 1 蛋白质峰差异图.

表 2 SWISS-PROT蛋白质数据库分析

理论 M_r	在SWISS-PROT小鼠蛋白质数据库中的检索结果
1054.37	Angiotensinogen
5617.20	TGF- α
6031.67	Granulins(PC cell-derived growth factor)
8330.56	Cytochrome C oxidase polypeptide Vic, Small inducible cytokine B5
14 423.36	Cystatin F, Leptin receptor overlapping transcript-like1, Profilin, Ribonuclease K6
14 788.49	Bone morphogenetic protein 6(BMP-6)(VGR-1), Fatty acid-binding protein, Ribulose biphosphate carboxylase small chain 1B
21 931.01	α -1-acid glycoprotein 1, SERTA domain-containing protein3, Tumor necrosis factor ligand superfamily member 7, Uracil phosphoribosyltransferase
31 407.82	Killer cell lectin-like receptor 8, Ras suppressor protein 1, Erythrocyte band 7 integral membrane protein
44 806.19	Aspartate a minotransferase, 47kDa heat shock protein, LAG1 longevity assurance homolog 6, Phosphorylase b kinase gamma catalytic chain, 3-ketoacyl-CoA thiolase 2
45 470.37	Synaptotag min7, Transcription factor 7(T-cell-specific transcription factor1), TNF receptor-associated factor 1

异蛋白质的峰图和模拟胶图都有明显的差异, 以质/荷比为5617.20和从14 788.10的2个蛋白质为例, 比较其峰图和胶图的差异(图1). 采用CIPHERGEN公司Biomarker Pattern System软件对来源于Biomarker Wizard的数据进行处理, 结果显示, 实验组与对照组血清相比有11个标志蛋白有显著的差异. 为确定这11种差异蛋白的类别, 在ExPASy的SWISS-PROT蛋白质数据库中利用TagIdent tool根据分子量在小鼠蛋白质数据库中模糊检索血清蛋白. 检索时以测定的质/荷比为理论分子质量, 同时按照所用质谱仪的检测误差 $\pm 0.1\%$ 设定分子质量的误差, 检索与分析的结果见表2.

3 讨论

每年都会有SEB引起的食物中毒事件暴发, 欧洲某些国家由金葡菌肠毒素引起的食物中毒占细菌性中毒的50%以上, 加拿大为45%, 美国为33%. 在我国的细菌性食物中毒病例中有20%-25%系由金黄色葡萄球菌肠毒素所引起. 另外, 肠毒素也是引起医院和公共场所出现获得性感染的主要原因. 其致病的主要原因在于引发脓毒症和创伤感染. SEB产生菌在烧伤、创伤感染中占80%以上的比例, 且对青霉素、磺胺等耐受, 常引发死亡, 是创伤外科和烧伤科非常棘手的问题^[13-14]. 此外, SEB还可能随细菌入侵皮肤和黏膜的微小裂口, 进入血液, 引起心

内膜炎、脓肿广泛转移等疾病。在SEB中毒的检测方面主要采取的是病原菌的分离和ELISA检测等。SELDI-TOF-MS技术是一项全新的蛋白质组学研究方法,同时具有快速、简单、样本用量极少、灵敏、高通量等优点,可检测到 $\text{fmol}(10^{-15} \text{ mol})$ 数量级的微量蛋白质,且一次获得成千上万的蛋白质数据,在临床检验中具有广泛的应用前景。血清是机体在宏观水平上对组织细胞调控的重要介质,SEB中毒后血清成分发生的变化是SEB对多种组织器官损伤的结果。采用SELDI技术分析实验组与对照组BALB/c小鼠血清蛋白质组的变化,主要是从蛋白质组水平研究SEB中毒的分子机制。通过对SEB染毒小鼠血清进行SELDI检测分析,确定的标志蛋白可用于食物中毒诊治和SEB中毒临床诊断。

目前,国内外对于血清相关的生物活性的研究主要是采取传统的生化方法,SELDI-TOF-MS技术的应用必将促进疾病诊断检测方法的发展^[15-16]。SELDI-TOF-MS可确定疾病的标志蛋白,同时检测的结果可在SWISS-PROT蛋白质数据库查询确定可能的标志蛋白分子,但该技术也存在一些不足之处,例如不能精确地推断蛋白,不过检测出的蛋白中 M_r 为1054.37, 5617.20和6031.67的蛋白检索到的结果是唯一的蛋白,且与SEB的作用密切相关。其中 M_r 为5617.20的蛋白可能是TGF- α ,他是肿瘤患者高表达的蛋白,而在本实验中SEB染毒的小鼠则表现为该蛋白表达水平下调,从而证实SEB对肿瘤治疗有一定的效果,且SEB降低TGF- α 的表达水平是其中原因之一。对其他差异蛋白的判定考虑到蛋白质数据库提供的只是根据氨基酸序列计算的理论 M_r ,而大多数真核生物蛋白质存在一定的修饰,故所得结果仍需根据SEB的生物活性相关的因素推断,或进一步通过肽指纹图谱鉴定来研究。尽管如此,研究结果还是清楚地表明,SELDI技术在消化系统的基础研究和临床研究中有着广泛的应用前景。

4 参考文献

- 1 Madsen JM. Toxins as weapons of mass destruction.

- A comparison and contrast with biological-warfare and chemical-warfare agents. *Clin Lab Med* 2001; 21: 593-605
- 2 Yuan L, Lowell GH, Hoover DL, Colleton CA, Hammack CA Sr, Young LD, Fischer R, Patchen ML, Cross AS. Kinetics of cellular and cytokine responses in a chimeric mouse model for the study of staphylococcal enterotoxin B pathogenesis. *Immunol Lett* 2000; 71: 19-26
- 3 Lavoie PM, Thibodeau J, Erard F, Sekaly RP. Understanding the mechanism of action of bacterial superantigens from a decade of research. *Immunol Rev* 1999; 168: 257-269
- 4 姚咏明, 盛志勇. 金黄色葡萄球菌肠毒素与多器官功能障碍综合症. *中国危重病急救医学* 2001; 13: 517-519
- 5 Merchant M, Weinberger SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000; 21: 1164-1177
- 6 Petricoin EF, Liotta LA. SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 24-30
- 7 费嘉, 马文丽, 郑文岭. 蛋白质芯片在蛋白质组学研究中的作用. *生命科学* 2005; 17: 132-136
- 8 Aldred S, Grant MM, Griffiths HR. The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. *Clin Biochem* 2004; 37: 943-952
- 9 Henderson NA, Steele RJ. SELDI-TOF proteomic analysis and cancer detection. *Surgeon* 2005; 3: 383-390
- 10 Bons JA, Wodzig WK, van Dieijen-Visser MP. Protein profiling as a diagnostic tool in clinical chemistry: a review. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1281-1290
- 11 Clarke CH, Buckley JA, Fung ET. SELDI-TOF-MS proteomics of breast cancer. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1314-1320
- 12 Pacheco-Lopez G, Niemi MB, Kou W, Harting M, Del Rey A, Besedovsky HO, Schedlowski M. Behavioural endocrine immune-conditioned response is induced by taste and superantigen pairing. *Neuroscience* 2004; 129: 555-562
- 13 Do Carmo LS, Cummings C, Linardi VR, Dias RS, De Souza JM, De Sena MJ, Dos Santos DA, Shupp JW, Pereira RK, Jett M. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. *Foodborne Pathog Dis* 2004; 1: 241-246
- 14 van Gessel YA, Mani S, Bi S, Hammamieh R, Shupp JW, Das R, Coleman GD, Jett M. Functional piglet model for the clinical syndrome and postmortem findings induced by staphylococcal enterotoxin B. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229: 1061-1071
- 15 Vitzthum F, Behrens F, Anderson NL, Shaw JH. Proteomics: from basic research to diagnostic application. A review of requirements & needs. *J Proteome Res* 2005; 4: 1086-1097
- 16 Hu J, Coombes KR, Morris JS, Baggerly KA. The importance of experimental design in proteomic mass spectrometry experiments: some cautionary tales. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2005; 3: 322-331

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣