

两种化学表面芯片对 SELDI-TOF MS 结果的影响*

陈蓉艳¹, 林 青¹, 郑 健^{2△} (福建中医学院附属人民医院: 1. 检验科; 2. 儿科, 福建福州 350004)

【摘要】 目的 采用标准化芯片操作规程比较弱电离子交换芯片(CM10)、金属离子整合芯片(IMAC)对增强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF MS)检测结果的影响。方法 收集 1 份健康体检者血清, 每一个芯片类型都检测 8 孔。分析质谱峰的数量($S/N > 5$, $S/N > 2.5$, $S/N > 10$), 计算孔间变异系数(CV), 通过比较这两个指标来评估两种芯片对血清蛋白组的检测能力。结果 在合适的激光能量强度下, $S/N > 5$ 时, IMAC 所测得的质谱峰有 247 个, CM10 所测得的质谱峰有 167 个, 两者的质谱峰平均 CV 值相近, 均在 20% 左右。结论 IMAC 有更好的检测能力。

【关键词】 质谱分析法; 表面增强激光解析电离飞行时间质谱; 血清样本; 蛋白质组学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2010.20.002

中图分类号: R329

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)20-2179-02

Study on influence of two types of chemical surface chip to results of SELDI-TOF MS* CHEN Rong-yan¹, LIN Qing¹, ZHENG Jian^{2△}. 1. Department of Clinical Laboratory, 2. Department of Paediatrics, Affiliated People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, China

【Abstract】 Objective To compare the influences of CM10 and IMAC chips on the detection results of surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) by adopting the standardization chip operating protocols. **Methods** One serum sample taken from one healthy volunteer was applied in 8-hole detection for each chip type. To analyze the total number of detected peaks ($S/N > 5$, $S/N > 2.5$, $S/N > 10$) and to determine the inter-hole variation coefficient by calculating the average CV of peak intensities. The detection ability to serum proteomics was evaluated by comparing the two indexes. **Results** Under proper laser energy intensity, $S/N > 5$, IMAC showed 247 detected peaks, CM10 showed 167 detected peaks, the average CV of peak intensities of two chips were similar. **Conclusion** IMAC has better detecting ability.

【Key words】 mass-spectrometry; SELDI-TOF-MS; serum sample; proteomics

表面增强激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF MS)是目前较广泛使用的蛋白质组学技术。常用的化学/色谱表面有疏水芯片(SEND、H50、H4)、弱阳离子交换芯片(CM10、WCX)、阴离子交换芯片(SAX2、Q10)、金属离子整合芯片(IMAC)以及正相亲水芯片(NP20),不同的芯片能结合不同的蛋白质,降低样本复杂性,有利于检测出更多的蛋白质^[1]。血清作为最常用的检测对象,包含了大量的蛋白质和多肽,提供各种生理病理状态下的生物标志物。许多文献已报道了各种芯片用于血清 SELDI 分析,例如 Kanmura 等^[2]采用 CM10, Hedegus 等^[3]采用 H50, Yamayoshi 等^[4]则采用 CM10 及 IMAC。其中最常用的芯片类型为 CM10 及 IMAC。本文主要采用 CM10、IMAC 两种芯片类型对血清进行检测,通过获得芯片内孔间变异、检测峰数量来评估两种芯片对血清标本的检测能力。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)高效液相色谱法(HPLC):水、尿素、浓盐酸、3-[(3-胆固醇氨基丙基)二甲氨基]+丙磺酸内盐(CHAPS)、二硫苏糖醇(DTT)、NaAc 等均购自 Sigma 公司;蛋白质芯片(CM10、IMAC)购自 Ciphergen 公司;基质(SPA, 芥子酸)、三氟醋酸(TFA)、乙腈(ACN)购自 Fluka 公司;Triton-X-100 仪购自 FARCO 公司。(2)校正混合肽:均购自 Sigma 公司,浓度

为 1~20 mol/L,用于仪器校正。(3)仪器:SELDI-TOF MS 仪为美国 CBI 公司(Ciphergen Biosystems Inc.)产品。蛋白质芯片采用 PBS II C 型读取数据,采用 Ciphergen proteinchip 3.2.1 版本分析软件自动采集数据。

1.2 方法 (1)检测样本的采集和处理:本院健康体检者,处于平静与空腹状态,用普通灭菌注射器采集血液标本,血标本采集后即送达实验室(不抗凝)。血液经冷冻离心机 4℃、3500 r/min 离心 15 min 后,立即分离血清用于检测。CM10 样本经 U9 变性处理,于 4℃下摇育 30 min。(2)CM10、IMAC 芯片标准化操作规程:根据 Ciphergen Biosystems 公司提供的芯片操作规程优化条件后进行,IMAC 需先活化芯片表面,加入 100 m MCuSO₄,置振荡器按 600 r/min 震荡 5 min,并重复一次,而后用 HPLC 水清洗 2 次,再用 NaAc (pH 4.0)和 HPLC 水各清洗 1 次。其次,CM10、IMAC 均加入结合缓冲液,CM10 的结合缓冲液为 NaAc (pH 4.0),IMAC 的结合缓冲液为 0.5 mol/L NaCl/0.01 mol/L PBS/0.1% Triton (pH 7.4),震荡 5 min,甩去后重复 1 次。而后,变性处理后的样本,与 CM10 结合缓冲液混匀后,加样于 CM10 芯片孔中;未变性样本,与 IMAC 结合缓冲液混匀后,加样于 IMAC 芯片孔中,震荡 1 h,甩出样品后,每孔加入缓冲液,400 r/min 震荡 5 min,重复 2 次。最后每孔加入高效液相色谱法(HPLC)水,甩

* 基金项目:福建省自然科学基金项目(2007J0307,2008J0093)。

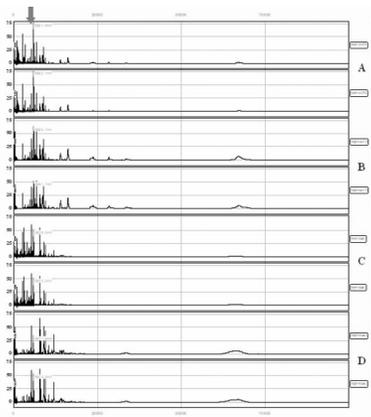
△ 通讯作者。

干后从芯片处理器上取出芯片后,风干 20 min 后,在每个孔上加饱和 SPA,15 min 后,上机测定。(3)数据获取和处理:SELDI-TOF MS 检测芯片的参数设置,本次试验采用两种激光强度,较低激光强度 185,优化分子质量范围为 3 000~15 000,最高分子质量为 100 000;较高激光强度 205,优化分子质量范围为 10 000~50 000,最高分子质量为 200 000。检测灵敏度为 7,质量偏转为 900 000,检测器电压为 2 750。用两种不同的激光强度分别在同一芯片孔的不同位点上各轰击一次。仪器用 ALL-IN-ONE 校准混合肽进行校准。

1.3 统计学方法 采用 Biomarker Wizard(BMW)软件进行数据分析,对图谱进行扣基线、总离子流标准化之后,用软件获取信噪比(S/N)大于 5 的峰数量以及孔间变异数据。

2 结 果

比较 CM10 和 IMAC 血清图谱可以看出,IMAC 峰个数明显多于 CM10(图 1),特别是在小分子质量范围内。通过 BMW 软件计算,在 1~100KD 相对分子质量范围内,S/N>5,低能量激光强度条件下 CM10 峰个数为 167 个,IMAC 峰个数为 246 个,高能量激光强度条件下 CM10 峰个数为 191 个,IMAC 峰个数为 97 个;S/N>2.5,低能量激光强度条件下 CM10 峰个数为 328 个,IMAC 峰个数为 445 个,高能量激光强度条件下 CM10 峰个数为 404 个,IMAC 峰个数为 125 个;S/N>10,低能量激光强度条件下 CM10 峰个数为 78 个,IMAC 峰个数为 119 个,高能量激光强度条件下 CM10 峰个数为 65 个,IMAC 峰个数为 49 个。另外,高信噪比的峰数量越多,峰之间的变异越小,相对来说,芯片检测结果就越可靠和稳定,在一定信噪比参数设定下(设为 S/N>5),在重复检测同一样本的 8 个质谱中都能检测出质谱峰,信噪比都较高,通过 BMW 软件,可以分别测算两种芯片在 8 个质谱中全部出现的质谱峰数量占测得的所有质谱峰数量的百分数来评价两种芯片检测结果的可靠性,通过简单的 Excel 表格函数运算,计算出这些质谱峰的平均 CV 值来评估孔间变异,见图 1。



注:(A)低能量激光强度时 CM10 芯片血清质谱图;(B)低能量激光强度时 IMAC 芯片血清质谱图;(C)高能量激光强度时 CM10 芯片血清质谱图;(D)高能量激光强度时 IMAC 芯片血清质谱图。

图 1 CM10、IMAC 芯片类型在相对分子质量为 1 000~100 000 的血清图谱。

3 讨 论

在本次研究中,IMAC 在低能量激光强度所得到的峰个数最多,以下依次为 CM10 与高能量激光强度的组合、CM10 与低能量激光强度的组合、IMAC 与高能量激光强度的组合。进一步分析图谱发现,高能量激光强度所获得的图谱中,低质

荷比范围的质谱峰明显少于低能量激光强度,但高质荷比范围不论在峰个数以及峰高上都优于低能量激光强度,可见激光强度能激发高分子质量蛋白质或多肽在电压场中飞行,而低分子质量蛋白质或多肽则有可能被高能量的激光破坏而不能到达检测器,由于许多有意义的差异性蛋白都在较小的分子质量范围内,激光强度高不利于这些有意义的标志物的发现,当然,高分子质量范围内也不能排除有意义的标志物的存在,因而,高能量激光强度应作为补充进一步完善操作流程^[5]。

在低能量激光强度下,IMAC 所得质谱峰个数明显多于 CM10,分析其原因,CM10 几乎让所有的多肽和蛋白质带上正电荷,质谱中所得的高丰度多肽及蛋白质多,低丰度蛋白质容易被高丰度蛋白所掩盖,而 IMAC 捕获的是金属螯合的多肽及蛋白质,螯合在芯片上的高丰度的多肽和蛋白质很少,对低丰度蛋白质的掩盖效应低,检测出的低丰度的多肽和蛋白质就多。如图 1 所示,相对分子质量为 5 921±10 的峰(箭头所示)在 CM10 中峰值达 71.3,这种蛋白质在人群中高表达,而在 IMAC 芯片上捕获获得相对少,峰值只有 60,减少了其对低丰度蛋白的掩盖效应,因而在这方面 IMAC 优于 CM10。另一方面,IMAC 在重复检测同一样本的 8 个质谱图中有 60.6% 的峰的信噪比均大于设定参数 5,与 CM10 的 56.2% 相比,也有优势,提示 IMAC 所测得峰的信噪比孔间变异较小,所得出的检测结果更稳定、可靠。由这些峰得出的峰值平均 CV 值,IMAC 略高于 CM10,显示孔间峰值平均 CV 相差不大,均在 20% 之间,与相关文献报道一致^[6-7]。综合以上,作者认为 IMAC 对血清蛋白组有更好的检测能力。

从质谱图中本研究还发现,IMAC 与 CM10 有互补的检测峰。比如,IMAC 在相对分子质量 3 000~6 000 范围内,质谱峰多且峰值高,而 CM10 缺如或峰值低;在有些质量范围内则相反。因此,实验条件有限时,首选检测能力高的 IMAC,而在条件许可的情况下,芯片的组合无疑更有利于生物标志物的发现。

参考文献

[1] Merchant M, Weinberger S. Recent advancements in surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry[J]. Electrophoresis, 2000, 21:1164-1177.

[2] Kanmura S, Uto H, Kusumoto K. Early Diagnostic Potential for Hepatocellular Carcinoma Using the SELDI ProteinChip System[J]. Hepatology, 2007, 4(45):948-956.

[3] Scarlett CJ, Saxby AJ, Nielsen A. Proteomic profiling of cholangiocarcinoma: diagnostic potential of SELDI-TOF MS in malignant bile duct stricture[J]. Hepatology, 44 (3):658-666.

[4] Yamayoshi Y, Watanabe T, Tanabe M, et al. Novel application of protein chip technology exploring acute rejection markers of rat small bowel transplantation[J]. Transplantation, 82(3):320-326.

[5] Fung ET, Enderwick C. ProteinChip clinical proteomics: computational challenges and solutions[J]. Biotechniques 2002, Suppl:34-38.

[6] Semmes OJ, Feng Z, Adam BL, et al. Evaluation of serum protein profiling by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry(下转第 2182 页)