



(21) 申请号 201511026225.5

(22) 申请日 2015.12.31

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

申请人 中国疾病预防控制中心传染病预防
控制所

(72) 发明人 李岩 张建中 李倩倩 赵倩倩
肖迪

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

G01N 1/34(2006.01)

G01N 27/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图4页

(54) 发明名称

一种脂多糖中寡糖的纯化及质谱鉴定方法

(57) 摘要

本发明公开了一种脂多糖中寡糖的纯化及质谱鉴定方法。本方法以可挥发性酸将脂多糖中的多糖酸解为寡糖,用表面活性剂十二烷基磺酸钠使脂多糖解聚,用甲醇萃取出反应液中的十二烷基磺酸钠。用石墨化碳或 C18 固相萃取小柱纯化反应溶液中的寡糖,最后用基质辅助激光解吸电离-离子阱-飞行时间-多级质谱仪进行糖结构分析。由于不同血清型细菌的 O 抗原糖结构不同,质谱鉴定的糖结构谱图也不一样,可以通过聚类分析鉴定细菌的血清型。本发明所用的脂多糖中寡糖的纯化及质谱鉴定方法简便易行,实验用量少,稳定性好,可以弥补目前血清学方法鉴别革兰氏阴性细菌种类的不足。

1. 一种纯化脂多糖中寡糖的方法,所述方法包括以下步骤:
 - 1) 将脂多糖溶解于易挥发的酸和十二烷基磺酸钠的混合溶液中酸解,并真空冻干;
 - 2) 将冻干产物中的十二烷基磺酸钠用甲醇萃取,混匀后离心,倒出上清,将沉淀部分溶于H₂O中;
 - 3) 提纯步骤2)获得的溶液中的寡糖。
2. 一种质谱鉴定脂多糖中寡糖方法,所述方法在权利要求1所述方法的基础上还包括以下步骤:
 - 4) 将步骤3)获得的寡糖处理后用基质辅助激光解吸附电离-离子阱-飞行时间-多级质谱仪(MALDI-IT-TOF-MSⁿ)技术进行糖结构分析。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述易挥发的酸为盐酸、甲酸或乙酸。
4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述酸解的温度为80-120℃,时间为0.5-4小时。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤3)中的提纯过程使用石墨化碳或固相萃取小柱进行。
6. 根据权利要求2所述的方法,其中步骤4)中所述处理包括:将寡糖溶液冻干,并溶于去离子水中,取该样品与2,5-二羟基苯甲酸基质混匀后点在MALDI靶板上。
7. 权利要求2-6任一项所述的方法用于鉴定细菌血清型的用途。
8. 根据权利要求7所述的用途,其通过包括以下步骤的过程实现:
 - a. 将步骤4)中获得的糖结构分析的MALDI谱图进行聚类分析;
 - b. 将未知血清型的样品与已知血清型样品比对确定未知细菌血清型。
9. 根据权利要求8所述的用途,所述过程还包括在所述聚类分析前将MALDI谱图导成TXT文件和去除噪音的步骤。

一种脂多糖中寡糖的纯化及质谱鉴定方法

技术领域

[0001] 本发明属于细菌脂多糖研究领域,具体涉及一种稳定、重现性好的脂多糖中寡糖结构的纯化及质谱鉴定方法,同时也探究了利用这种质谱方法鉴定细菌血清型的应用。

背景技术

[0002] 脂多糖是革兰氏阴性细菌外壁层中特有的结构成分,由脂质A和杂多糖两部分共价连接而成。其中,杂多糖由核心寡糖和O-特异链组成,后者由数十个相同的寡糖单元组成,具有抗原性,也称O-抗原,是借血清学方法鉴别革兰氏阴性细菌种类的根据。细菌分型是人类认识病原菌的一个策略,是区分病原菌不同致病性、流行特征、感染后免疫特征和耐药特征的重要手段,在各种病原菌研究领域和相关传染病应对领域被普遍使用,发挥了重要的作用。但是分型血清系统制备困难、质量不稳定、价格昂贵等,有很多局限性。

[0003] 质谱技术于20世纪50年代末开始用于糖的分析,它可以提供相对分子质量、多糖的单糖组成、糖苷键的连接方式以及分支状况等多种信息。与核磁共振波谱(NMR)相比,质谱技术具有灵敏度高、需样量少和高通量分析的优点,不管是纯度很高的样品还是微量的混合物只需消耗几个pmol的样品就可直接进行质谱分析,质谱技术在糖类的分析中发挥着不可替代的作用。目前还没有相关文献或专利报道用质谱分析脂多糖中寡糖的方法来鉴定细菌血清型,该方法快速简便,稳定性好,应用前景广泛。

发明内容

[0004] 本发明优化了脂多糖的酸解和纯化方法,并用基质辅助激光解吸电离质谱法(MALDI-MS)鉴定脂多糖中O抗原的寡糖结构,建立以糖类作为分型物质的通用分型策略问题,使细菌分型中的O抗原等复杂分型体系得以简化,并能快速、准确的实际应用于传染病防控工作。在本发明中,提供了一种脂多糖中寡糖的纯化及质谱鉴定方法,以可挥发性酸将脂多糖中的多糖酸解为寡糖,用表面活性剂十二烷基磺酸钠使脂多糖解聚,用甲醇萃取出十二烷基磺酸钠并使寡糖沉淀。用石墨化碳或C18固相萃取小柱纯化反应溶液中的寡糖,最后用基质辅助激光解吸电离-离子阱-飞行时间-多级质谱仪进行糖结构分析。

[0005] 具体地,本发明涉及以下各项:

[0006] 1.一种纯化脂多糖中寡糖的方法,所述方法包括以下步骤:

[0007] 1)将脂多糖溶解于易挥发的酸和十二烷基磺酸钠的混合溶液中酸解,并真空冻干;

[0008] 2)将冻干产物中的十二烷基磺酸钠用甲醇萃取,混匀后离心,倒出上清,将沉淀部分溶于H₂O中;

[0009] 3)提纯步骤2)获得的溶液中的寡糖。

[0010] 2.一种质谱鉴定脂多糖中寡糖方法,所述方法在第1项所述方法的基础上还包括以下步骤:

[0011] 4)将步骤3)获得的寡糖处理用基质辅助激光解吸电离-离子阱-飞行时间-多

级质谱仪(MALDI-IT-TOF-MSⁿ)技术进行糖结构分析。

[0012] 3. 根据第1或2项所述的方法,其中所述易挥发的酸为盐酸、甲酸或乙酸。

[0013] 4. 根据第1或2项所述的方法,其中所述酸解的温度为80-120℃,时间为0.5-4小时。

[0014] 5. 根据第1项所述的方法,其中步骤3)中的提纯过程使用石墨化碳或固相萃取小柱进行。

[0015] 6. 根据第2项所述的方法,其中步骤4)中所述处理包括:将寡糖溶液冻干,并溶于去离子水中,取该样品与2,5-二羟基苯甲酸基质混匀后点在MALDI靶板上。

[0016] 7. 第2-6任一项所述的方法用于鉴定细菌血清型的用途。

[0017] 8. 根据第7项所述的用途,其通过包括以下步骤的过程实现:

[0018] a. 将步骤4)中获得的糖结构分析的MALDI谱图进行聚类分析;

[0019] b. 将未知血清型的样品与已知血清型样品比对确定未知细菌血清型。

[0020] 9. 根据第8项所述的用途,所述过程还包括在所述聚类分析前将MALDI谱图导成TXT文件和去除噪音的步骤。

[0021] 在优选的实施方案中,本发明具体步骤如下:

[0022] A. 称取一定质量脂多糖(0.1-10mg),溶解于1%-5%易挥发的酸和1%-5%十二烷基磺酸钠的混合溶液(0.1-10mL)中。

[0023] B. 将上述混合溶液在80-120℃条件下酸解0.5-4小时,然后真空冻干。

[0024] C. 冻干后的样品中加入0.1-10mL 96%甲醇萃取,混匀后在2000-10000r/min离心2-10分钟,倒出上清,将沉淀(寡糖)部分溶于200μL H₂O中。

[0025] D. 用石墨化碳(Carbograph extract clean columns,厂家GRACE)或C18(SEP-PAK C18columns,厂家Waters)固相萃取小柱提纯上述溶液中的寡糖。

[0026] E. 将洗脱液合并后分别真空冻干。

[0027] F. 将冻干的样品溶于0.01-1mL去离子水中,取1μL样品加1μL 2,5-二羟基苯甲酸基质(DHB,5mg/mL,溶于50%乙腈和0.1%三氟乙酸中)混匀点在靶板上。

[0028] G. 将干燥后的样品点用基质辅助激光解吸电离-离子阱-飞行时间-多级质谱仪(MALDI-IT-TOF-MSⁿ)技术进行糖结构分析。

[0029] 本发明所用的脂多糖中寡糖的纯化及质谱鉴定方法及相应鉴定细菌血清型的方法简便易行,实验用量少,稳定性好,可以弥补目前血清学方法鉴别革兰氏阴性细菌种类的不足。

附图说明

[0030] 图1是从幽门螺杆菌43504和700392菌株分别提取的3个不同质量脂多糖经酸解、纯化后的MALDI图,图a是43504菌株,图b是700392菌株,从上至下分别是0.2mg、1mg和10mg。

[0031] 图2是从大肠杆菌O157和O55血清型提取的脂多糖经3次平行的酸解、纯化实验后的MALDI图,图a是O157血清型,图b是O55血清型,从上至下分别是第一次、第二次和第三次。

[0032] 图3是小肠结肠炎耶尔森菌O3和O9血清型的3个不同菌株经培养提取的脂多糖酸解、纯化实验后的MALDI图,图a是O3血清型,图b是O9血清型,从上至下分别是菌株编号HA2013-F18,HA2013-F21,HA2013-F23,NX1997-SA-1085,NX1997-SA-1098,NX1997-SA-1105。

[0033] 图4实施例1-3中的3个细菌(每个细菌2个血清型,每个血清型3个MALDI图)的实验数据经MarkerView和Heatmap Illustrator软件处理后得到的聚类分析图。其中横坐标是每个样品,纵坐标是m/z,信号强度用图例的黑白颜色深浅代表。

具体实施方式

[0034] 实施例1

[0035] 分别称取幽门螺杆菌43504和700392[1](中国疾病预防控制中心传染病预防控制所制备并提供)提取的脂多糖0.2mg、1mg和10mg,分别溶解于0.2mL、1mL和10mL 1.5%乙酸(甲酸、盐酸可达到同样效果)和2%十二烷基磺酸钠的混合溶液中。将上述混合溶液在100℃条件下酸解1小时,然后真空冻干。冻干后的样品分别加入0.2mL、1mL和10mL 96%甲醇萃取,混匀后在5000r/min离心2分钟,倒出上清,将沉淀(寡糖)部分溶于200μL H₂O中。用石墨化碳固相萃取小柱(Carbograph extract clean columns,厂家GRACE)提纯上述溶液中的寡糖并真空冻干。冻干的样品溶于0.02mL、0.1mL和1mL去离子水中,取1μL样品加1μL 2,5-二羟基苯甲酸基质混匀点在靶板上。将干燥后的样品点做MALDI质谱进行糖结构分析,得到的6个MALDI图(见图1a和b)。从上至下分别是43504-0.2mg、43504-1mg、43504-10mg、700392-0.2mg、700392-1mg和700392-10mg的MALDI图,由图可见,相同菌种得到的MALDI基本一致,证明该实验的稳定性较高,不会受到样品质量多少的影响。

[0036] 实施例2

[0037] 分别称取大肠杆菌0157[2](由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所制备并提供)和055血清型(购于sigma,货号L2880)提取的脂多糖1mg,溶解于1mL 1.5%乙酸和2%十二烷基磺酸钠的混合溶液中。将上述混合溶液在80℃条件下酸解2小时,然后真空冻干。冻干后的样品加入1mL 96%甲醇萃取,混匀后在10000r/min离心2分钟,倒出上清,将沉淀(寡糖)部分溶于200μL H₂O中。用石墨化碳固相萃取小柱(Carbograph extract clean columns,厂家GRACE)提纯上述溶液中的寡糖并真空冻干。为了验证人为操作和实验时间对该实验稳定性的影响,我们分别让3个人,在不同的时间做了重复实验,最后得到3个寡糖样品。3个样品分别溶于0.1mL去离子水中,分别取1μL样品加1μL 2,5-二羟基苯甲酸基质混匀点在靶板上。将干燥后的样品点做MALDI质谱进行糖结构分析,每个血清型得到3个MALDI图(见图2a和b)。由图可见,3个人在不同时间得到的实验结果稳定性较高,不会受到人为操作和时间的影响。

[0038] 实施例3

[0039] 培养小肠结肠炎耶尔森菌O3血清型的3个不同菌株(菌株编号HA2013-F18, HA2013-F21, HA2013-F23,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所制备并提供)和O9血清型的3个不同菌株(菌株编号NX1997-SA-1085, NX1997-SA-1098, NX1997-SA-1105,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所制备并提供)[3],提取脂多糖,分别称取1mg,溶解于1mL 2%乙酸和2%十二烷基磺酸钠的混合溶液中。将上述混合溶液在100℃条件下酸解3小时,然后真空冻干。冻干后的样品加入1mL 96%甲醇萃取,混匀后在10000r/min离心2分钟,倒出上清,将沉淀(寡糖)部分溶于200μL H₂O中。用石墨化碳固相萃取小柱(Carbograph extract clean columns,厂家GRACE)提纯上述溶液中的寡糖并真空冻干。3个样品分别溶于0.02mL去离子水中,分别取1μL样品加1μL 2,5-二羟基苯甲酸基质混匀点在靶板上。将干

干燥后的样品点做MALDI质谱进行糖结构分析,每个血清型的3个不同菌株的MALDI图(见图3a和b)。由图可见,相同血清型不同菌株提取的脂多糖经酸解、纯化后得到的寡糖质谱图基本一致,而不同血清型的质谱图差别较大,可以将未知血清型的样品与已知血清型样品的质谱图进行比对确定未知细菌血清型。

[0040] 实施例4

[0041] 将实施例1-3获得的不同细菌的寡糖MALDI谱图导成TXT文件。通过MarkerView软件进行信号比对,选择合适的基线值,本组数据将小于20000的信号认为是噪音,过滤噪音后选取单同位素峰,再用Heatmap Illustrator软件进行聚类分析。结果如图4所示,每个血清型的3个不同实验数据聚类在一起,相同细菌的2个血清型也聚类在一起,可以根据这个方法建立不同细菌血清型的数据库,把未知血清型的样品和已知血清型样品比对确定未知细菌血清型。

[0042] 参考文献:

[0043] [1]Oscar Cerda,Ana Rivas,Hector Toledo.Helico bacterpylori strain ATCC700392encodes a methyl-accepting chemotaxis receptor protein(MCP)for arginine and sodium bicarbonate[J].FEMS Microbiol Lett.2003,224:175-181.[2] Atsushi Miyashita,Sunao Iyoda,Kenichi Ishii1,Hiroshi Hamamoto,Kazuhisa Sekimizu&Chikara Kaito.Lipo polysaccharide O-antigen of entero hemorrhagic Escherichia coli O157:H7is required for killing both insects and mammals[J] .FEMS Microbiol Lett.2012,333:59-68.

[0044] [3]Artur Muszynski,Kamila Rabsztyn,Katarzyna Knapska,Katarzyna A.Duda,Katarzyna Duda-Grychtol,Katarzyna Kasperkiewicz,Joanna Radziejewska-Lebrecht,Otto Holstand Mikael Skurnik.Entero bacterial common antigen and O-specific polysaccharide coexist in the lipo polysaccharide of Yersinia enterocolitica serotype O:3[J].Microbiology.2013,159:1782-1793.

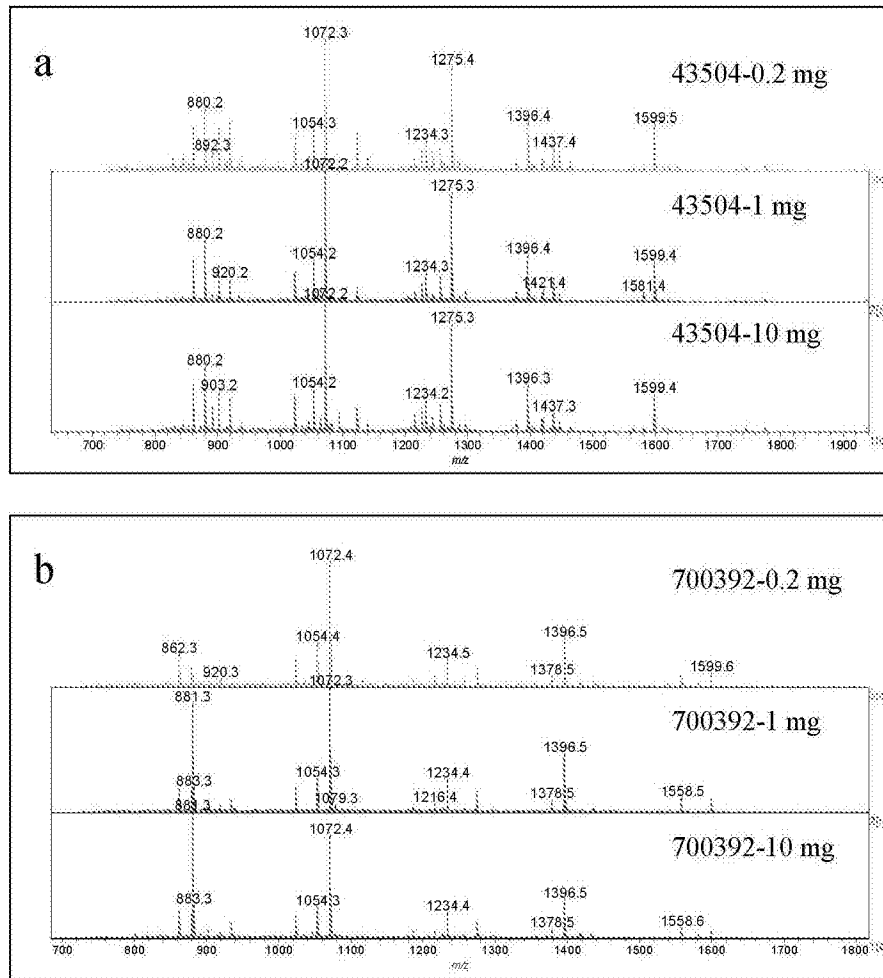


图1

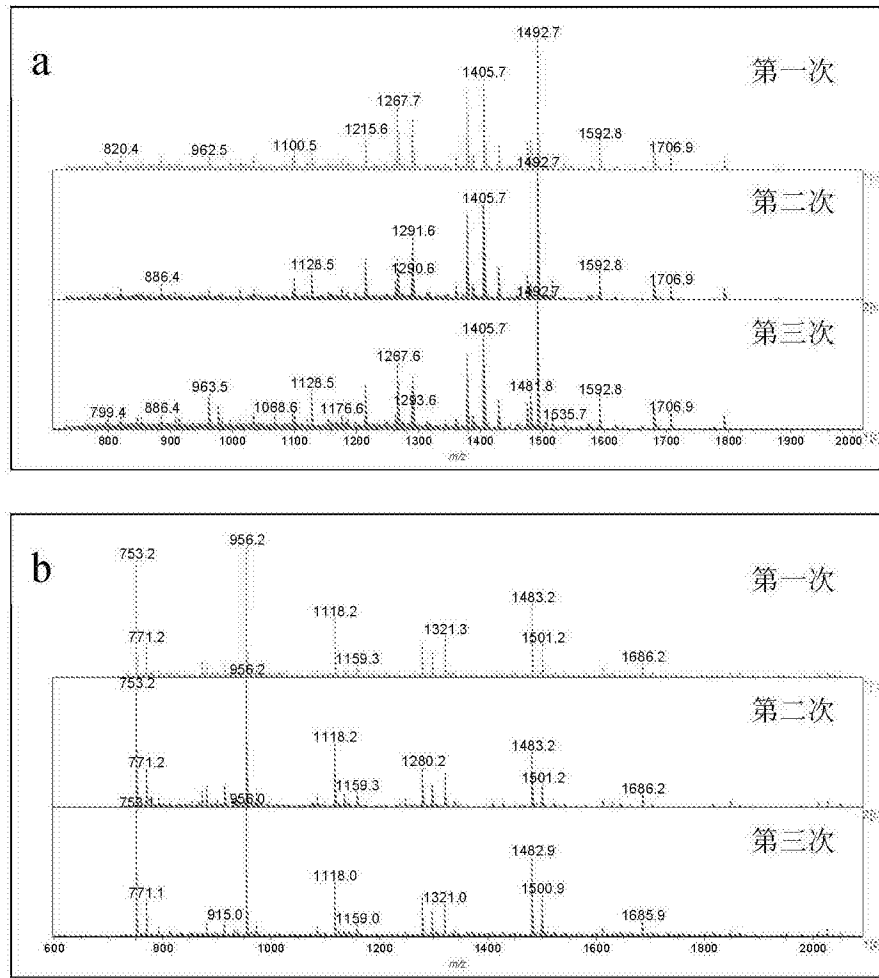


图2

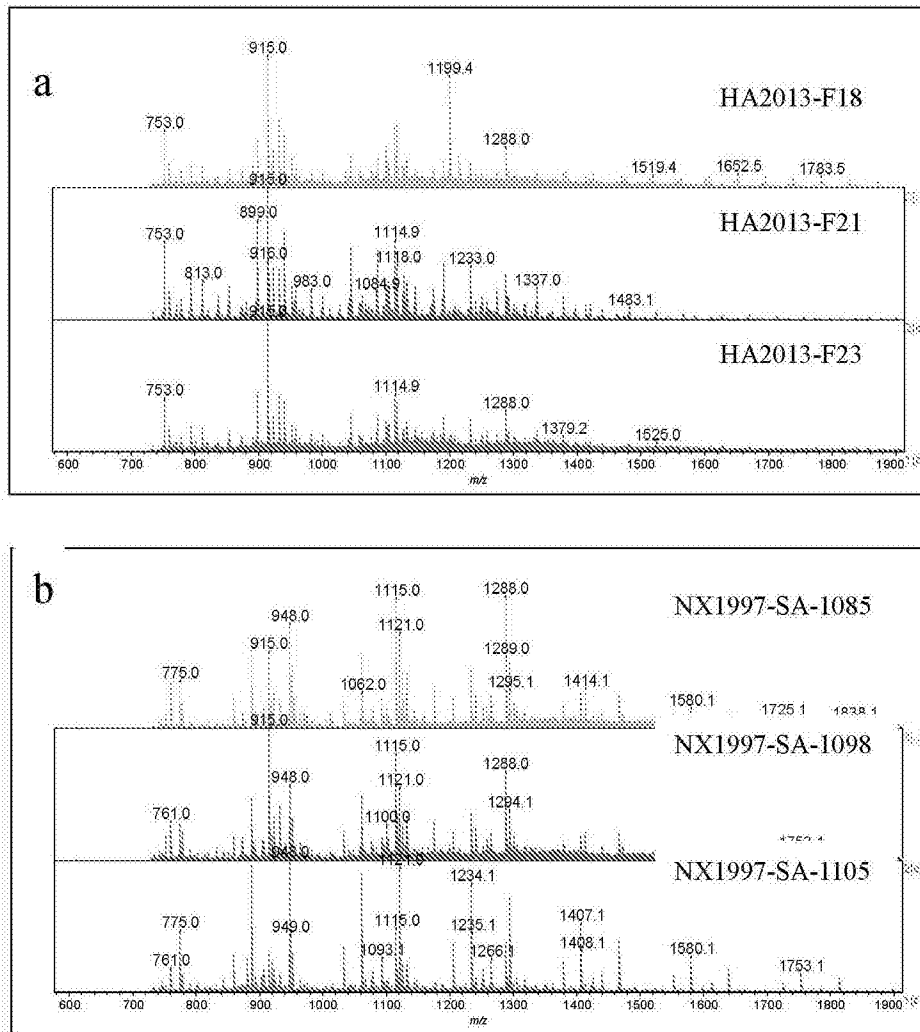


图3

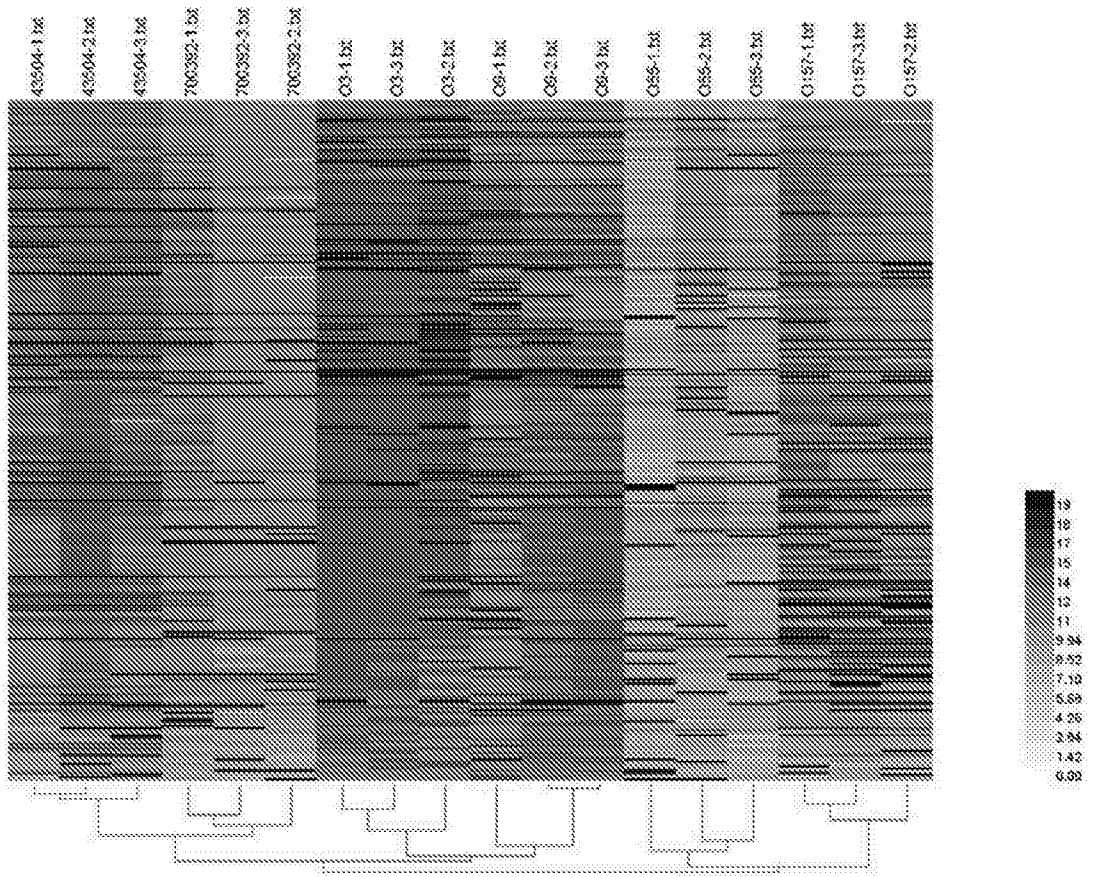


图4