

# 使用 MALDI-TOF 快速鉴定唐菖蒲伯克霍尔德菌

MALDI-017

**摘要：**基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF) 指纹图谱法是近些年来微生物鉴定领域的热点技术。MALDI-TOF 法具有快速、准确、使用成本低、高度自动化的特点，适合于临床诊断、分类研究或者疾病预防控制等领域微生物快速鉴定的应用需求。本文使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF 结合 SARAMIS 数据库，通过创建新的超级谱图，进行产米酵菌酸的唐菖蒲伯克霍尔德菌鉴定，结果显示样品成功进行了鉴定。

**关键词：**基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF 微生物鉴定 唐菖蒲伯克霍尔德菌 米酵菌酸 新建超级谱图

细菌鉴定的传统手段是基于生化方法，检测细菌对各种物质的代谢反应及其代谢产物，该方法耗时长、试剂贵，并且检测的菌种数量比较有限，通常在几百种。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF) 指纹图谱法因其快速简便的工作流程和强大可靠的数据处理能力，被认为是一种最有应用前景的微生物分类和鉴定方法。

MALDI-TOF 用于微生物鉴定时，通过 MALDI-TOF 质谱仪检测待测微生物的肽 / 蛋白指纹谱图，将实际检测的未知微生物的肽 / 蛋白指纹谱图和数据库中的标准谱图进行匹配检索，通过打分算法最后给出鉴定结果，即可实现对微生物的鉴定 (图 1)。与传统方法相比，MALDI-TOF 质谱法鉴定过程耗时只需数分钟、日常使用成本低廉，可实现 2,000 多种微生物鉴定，适于进行大规模菌株的准确鉴定。

唐菖蒲伯克霍尔德菌 (*Burkholderia gladioli*) 又

名椰毒假单胞菌，是我国学者于 1977 年发现的一种高致死性的食源性致病菌。可产生米酵菌酸和毒黄素，其中的米酵菌酸是一种小分子脂肪酸，可抑制线粒体膜的通透性，引起细胞代谢障碍，从而导致食物中毒和死亡。2020 年 10 月黑龙江鸡西“酸汤子”中毒事件，9 名中毒者全部死亡，即与米酵菌酸有关。因此对该菌的快速鉴定十分必要。

本文利用岛津飞行时间质谱 AXIMA iD<sup>Plus</sup> Assurance，结合 SARAMIS 数据库，进行产米酵菌酸的唐菖蒲伯克霍尔德菌鉴定。通过乙醇甲酸提取法进行样品前处理，使用质谱仪采集唐菖蒲伯克霍尔德菌标准菌株的谱图，导入 SARAMIS 数据库，创建唐菖蒲伯克霍尔德菌的超级谱图。进行样品鉴定时，通过将样品的谱图与包含了唐菖蒲伯克霍尔德菌超级谱图的 SARAMIS 数据库进行比对，成功鉴定唐菖蒲伯克霍尔德菌，结果与预期相符。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 AXIMA iD<sup>Plus</sup> Assurance，SARAMIS 数据库

### 1.2 试剂与样品

基质： $\alpha$ - 氰基 -4- 羟基肉桂酸 (CHCA)

样品：8 株样品，使用改良马铃薯葡萄糖琼脂培养基，36°C  $\pm$  1°C 培养 24--48 小时。

### 1.3 样品前处理

用接种环或枪头取适量单克隆细菌样品，加入 300  $\mu$ L 水，震荡混匀，再加入 900  $\mu$ L 无水乙醇，震荡混匀。12000 r/min 高速离心 2 min，弃去上清。加入 50  $\mu$ L 70% 甲酸，震荡混匀，再加入 50  $\mu$ L 乙腈，震荡混匀，12000 r/min 高速离心 2 min。用移液器取 1  $\mu$ L 上清液点样到 MALDI-TOF 专用靶板，自然晾干。随后覆盖 1  $\mu$ L CHCA 基质 (5 mg/mL)，干燥后放入 MALDI-TOF 仪器中分析。

### 1.4 分析条件

调谐模式: Linear-SARAMIS  
 扫描范围:  $m/z$  2000-20000  
 激光器: 337 nm 氮气激光器  
 激光能量: 70-80

### ■ 结果与讨论

以提取法将待测样品处理后进行质谱分析，操作流程见图 1。

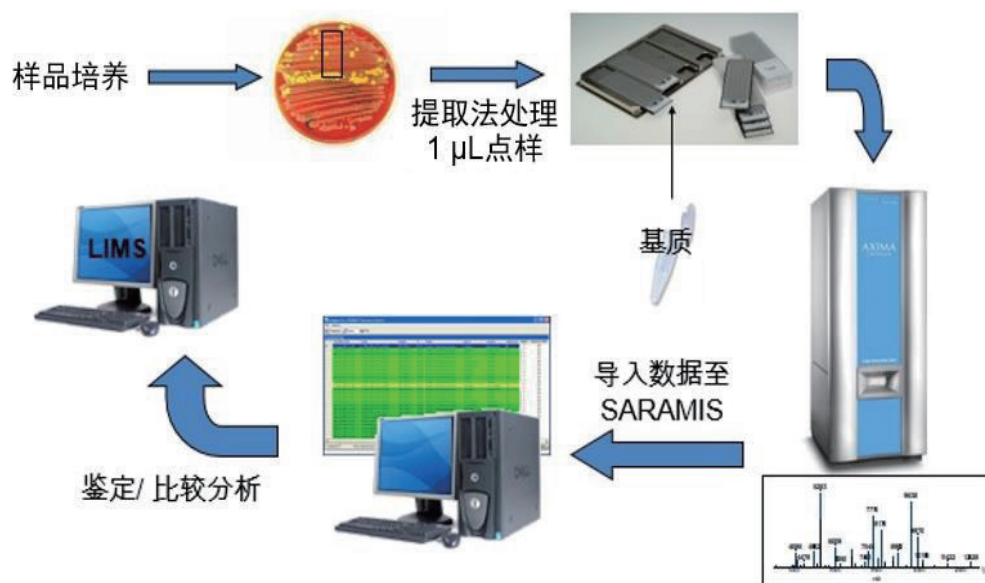


图 1 SARAMIS 微生物鉴定系统工作流程图

唐菖蒲伯克霍尔德菌的典型质谱图结果如图 2 所示。

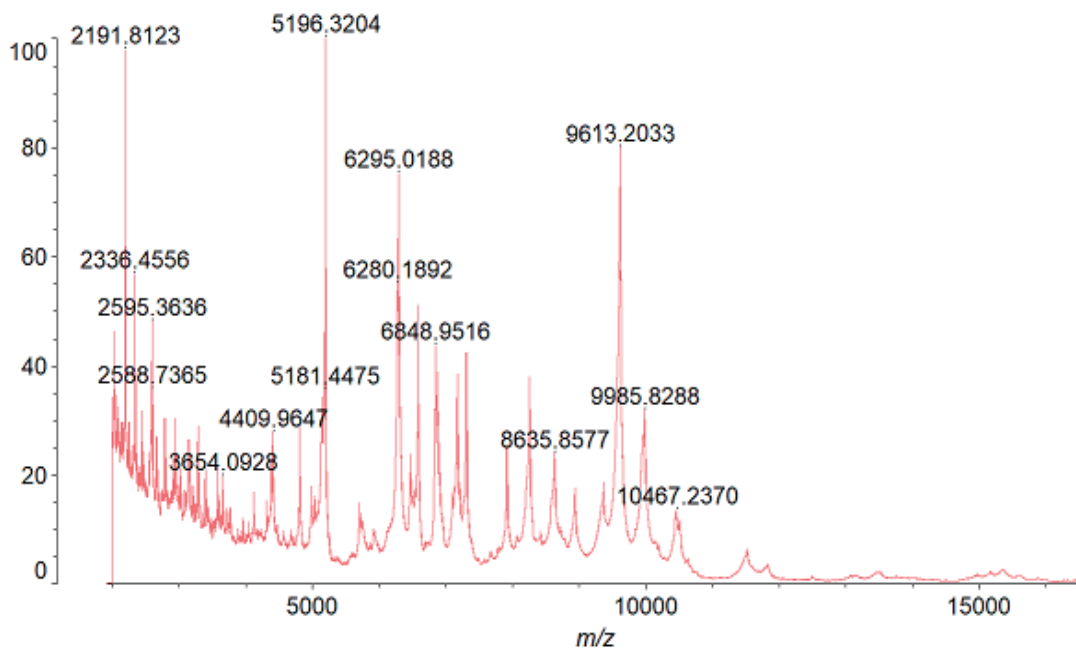
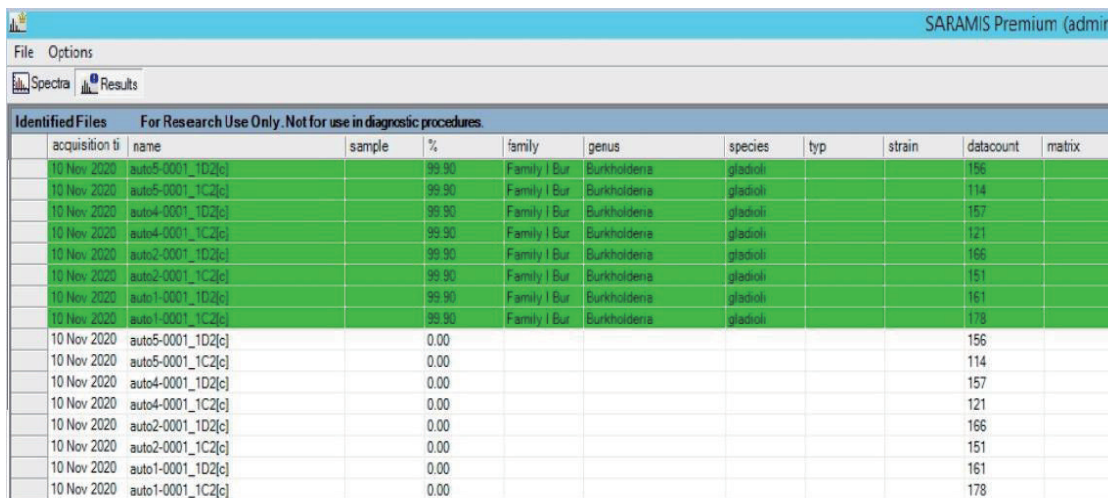


图 2 唐菖蒲伯克霍尔德菌一级质谱图

谱图数据经软件处理后，导入 SARAMIS 数据库检索。SARAMIS 数据库鉴定结果置信度阈值为 70%，高于 70% 即为阳性结果。检索结果见图 3，与数据库自带的超级谱图自动匹配分析，无匹配结果（白色，0%）。可能是 SARAMIS 原始数据库建库时使用的欧洲菌株，数据库中唐菖蒲伯克霍尔德菌的超级谱图与本地菌株匹配时特异性不够造成的。

将本地采集的 8 株唐菖蒲伯克霍尔德菌的质谱数据导入数据库，使用聚类分析功能，筛选出在 8 株菌中均出现的具有种特异性的质谱峰，给每个特异性质谱峰赋予一定的权重，生成一张具有本地特色的超级谱图。构建新的超级谱图后，再次采集数据导入数据库匹配检索（图 3），均成功鉴定（绿色，99.9%），所得结果与预期相符。



| acquisition ti | name              | sample | %     | family       | genus        | species  | typ | strain | datacount | matrix |
|----------------|-------------------|--------|-------|--------------|--------------|----------|-----|--------|-----------|--------|
| 10 Nov 2020    | auto5-0001_1D2[c] |        | 99.90 | Family I Bur | Burkholderia | gladioli |     |        | 156       |        |
| 10 Nov 2020    | auto5-0001_1C2[c] |        | 99.90 | Family I Bur | Burkholderia | gladioli |     |        | 114       |        |
| 10 Nov 2020    | auto4-0001_1D2[c] |        | 99.90 | Family I Bur | Burkholderia | gladioli |     |        | 157       |        |
| 10 Nov 2020    | auto4-0001_1C2[c] |        | 99.90 | Family I Bur | Burkholderia | gladioli |     |        | 121       |        |
| 10 Nov 2020    | auto2-0001_1D2[c] |        | 99.90 | Family I Bur | Burkholderia | gladioli |     |        | 166       |        |
| 10 Nov 2020    | auto2-0001_1C2[c] |        | 99.90 | Family I Bur | Burkholderia | gladioli |     |        | 151       |        |
| 10 Nov 2020    | auto1-0001_1D2[c] |        | 99.90 | Family I Bur | Burkholderia | gladioli |     |        | 161       |        |
| 10 Nov 2020    | auto1-0001_1C2[c] |        | 99.90 | Family I Bur | Burkholderia | gladioli |     |        | 178       |        |
| 10 Nov 2020    | auto5-0001_1D2[c] |        | 0.00  |              |              |          |     |        | 156       |        |
| 10 Nov 2020    | auto5-0001_1C2[c] |        | 0.00  |              |              |          |     |        | 114       |        |
| 10 Nov 2020    | auto4-0001_1D2[c] |        | 0.00  |              |              |          |     |        | 157       |        |
| 10 Nov 2020    | auto4-0001_1C2[c] |        | 0.00  |              |              |          |     |        | 121       |        |
| 10 Nov 2020    | auto2-0001_1D2[c] |        | 0.00  |              |              |          |     |        | 166       |        |
| 10 Nov 2020    | auto2-0001_1C2[c] |        | 0.00  |              |              |          |     |        | 151       |        |
| 10 Nov 2020    | auto1-0001_1D2[c] |        | 0.00  |              |              |          |     |        | 161       |        |
| 10 Nov 2020    | auto1-0001_1C2[c] |        | 0.00  |              |              |          |     |        | 178       |        |

图 3 SARAMIS 数据库显示鉴定结果图（白色：新建超级谱图前，0%；绿色：新建超级谱图后，99.9%）

## ■ 结论

本文采用岛津公司 MALDI-TOF 质谱仪，结合 SARAMIS 数据库的自建库功能，可以快速准确进行产米酵菌酸的唐菖蒲伯克霍尔德菌的鉴定。此方法高效、灵敏、快速、操作简便，是微生物鉴定的有力分析方法。

岛津应用云

