

# 使用 MALDI-TOF Performance 快速鉴定产气荚膜梭菌

MALDI-059

**摘要：**产气荚膜梭菌广泛分布于土壤、动物以及人的肠道之中，常通过被污染的饲料和饮水致使动物感染发病。在微生物鉴定领域，基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF）法具备快速、准确、使用成本低且操作简便等诸多优势。本文采用岛津 MALDI-TOF Performance 结合毅新博创微生物数据库，成功对动物肠道来源的产气荚膜梭菌进行了鉴定。

**关键词：** MALDI-TOF Performance 动物肠道 微生物鉴定

## 技术特点：

- ❖ 质谱法操作简便、分析速度快，可以快速给出鉴定结果。
- ❖ 乙醇甲酸提取法结合超声前处理，适用于革兰氏阳性菌的快速鉴定。

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)，亦称产气荚膜杆菌或魏氏梭菌 (*Clostridium Welchii*)，属于厌氧革兰氏阳性杆菌。产气荚膜杆菌作为气性坏疽的主要病原菌，能够引起厌氧性蜂窝织炎、泌尿系感染以及食物中毒等病症。该菌广泛存在于人粪以及温血动物的粪便之中，通常借助污染的饲料和饮水致使实验动物感染发病，可作为粪便污染水体和土壤的指示菌。

传统的微生物检测方法，诸如生化反应法、PCR

法、16S rDNA 测序技术等，不仅耗时较长，而且试剂耗材成本较高。而 MALDI-TOF 质谱法作为近年来兴起的微生物鉴定技术，其鉴定过程仅需数分钟，日常使用成本低廉，目前已在临床及科研领域得到广泛应用。本文使用岛津 MALDI-TOF Performance 结合微生物鉴定数据库，对动物来源的产气荚膜梭菌进行快速鉴定。通过实测质谱图与数据库中的标准谱图进行对比，最终实现了该菌的成功鉴定。

## 实验部分

### 1.1 仪器及数据库

质谱仪：岛津基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-TOF Performance

数据库：毅新博创微生物鉴定平台 BE3.1.6.1

### 1.2 试剂与样品

样品：本次实验共测试动物肠道来源的 8 个微生物样品，均采用固体培养基培养。

基质： $\alpha$ - 氰基 -4- 羟基肉桂酸 (CHCA)，5 mg/mL。

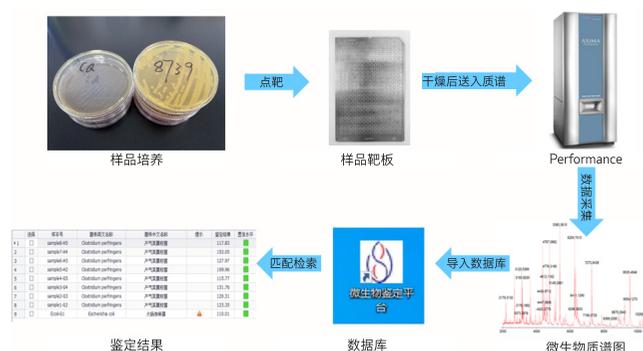


图 1 产气荚膜梭菌鉴定流程图

### 1.3 样品前处理

大肠杆菌标准菌株 ATCC 8739 及 8 个样品，均采用乙醇甲酸提取法（加入超声步骤）进行前处理。

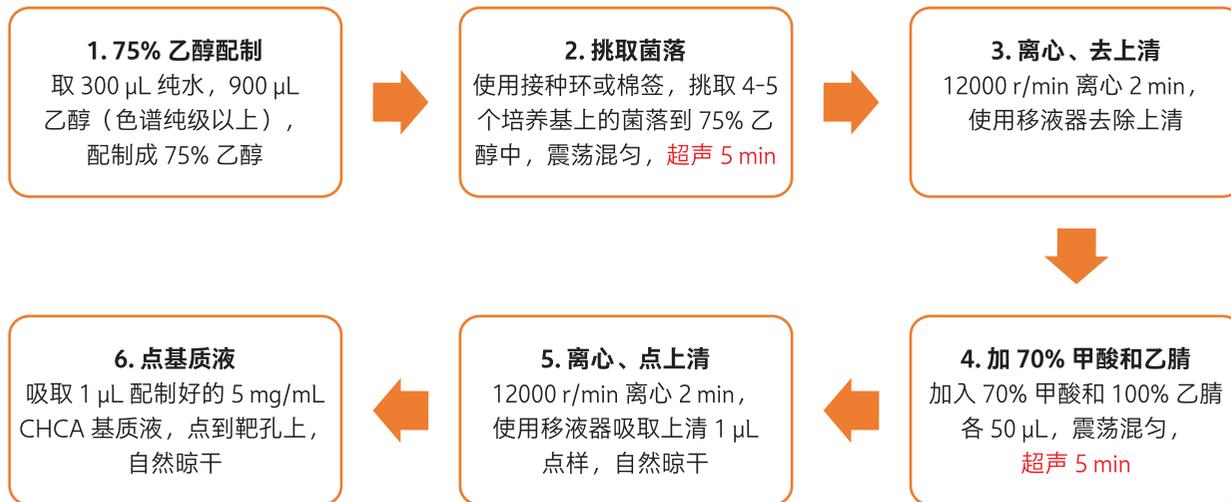


图 2 乙醇甲酸提取法流程图

### 1.4 分析条件

调谐模式：	Linear Saramis	激光器：	337 nm 气体激光器
扫描范围：	m/z 2000-20000	激光频率：	20 Hz
脉冲引出质量：	8330 Da	激光能量：	70-75

## ■ 结果与讨论

MALDI-TOF 质谱法鉴定的前处理步骤主要在于破坏微生物的细胞结构，以实现灭活微生物样本，以及提取细胞内的目的蛋白。其中，微生物细胞壁的构成和成分乃是影响前处理效果的最为关键的因素，样品细胞壁的破坏效果直接关系到是否有足够多的蛋白质用于质谱分析，是决定鉴定能否成功的重要前提。由于革兰氏阳性菌的细胞壁较厚，在传统乙醇甲酸提取法的基础上，每次加入有机试剂后再进行超声处理 5 分钟，能够更加有效地破坏微生物的细胞结构，进而实现目的蛋白的有效提取。

标准菌株大肠杆菌 ATCC 8739 及测试样品使用 MALDI-TOF Performance 采集的质谱图如下所示（图 3-6）。

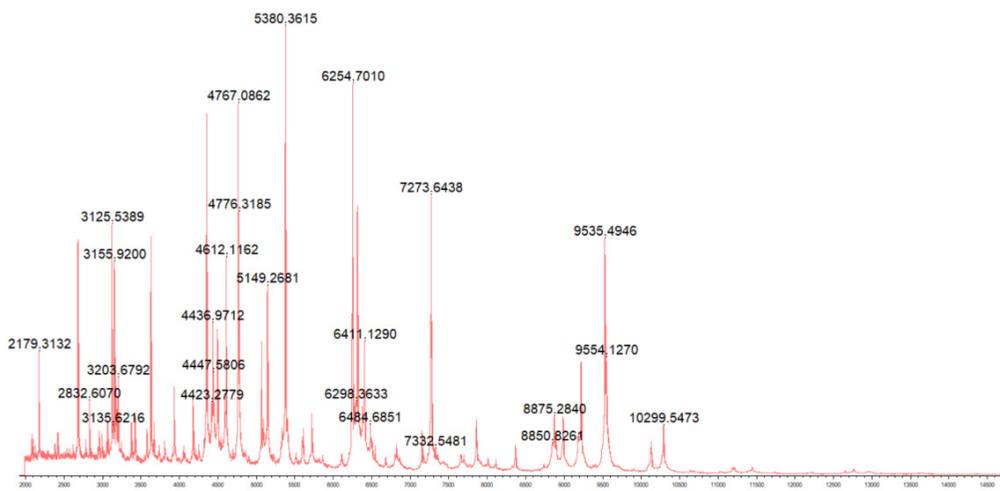


图 3 ATCC 8739 标准菌株的质谱图

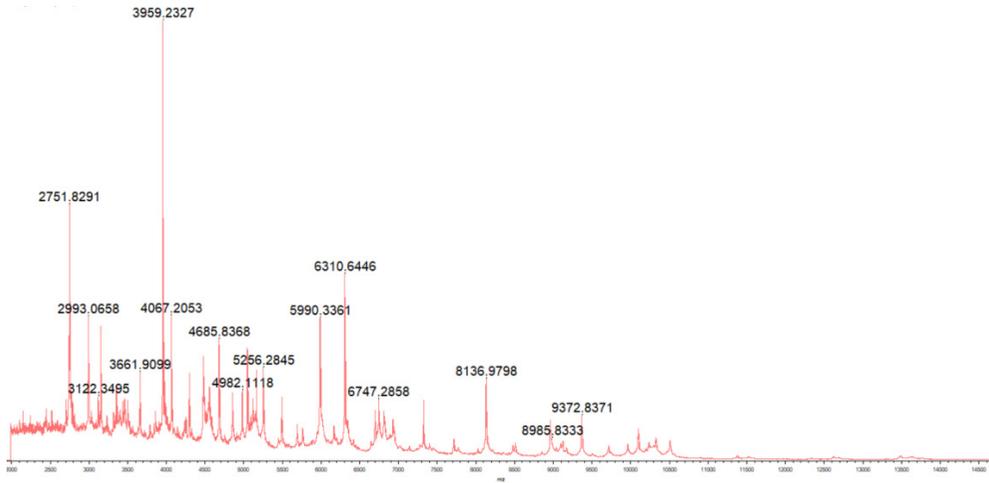


图 4 样品 1 的质谱图

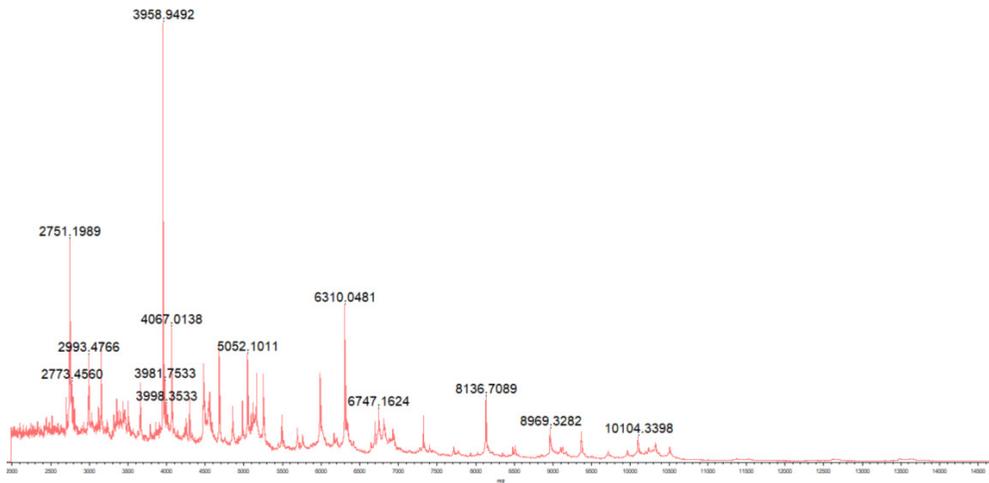


图 5 样品 2 的质谱图

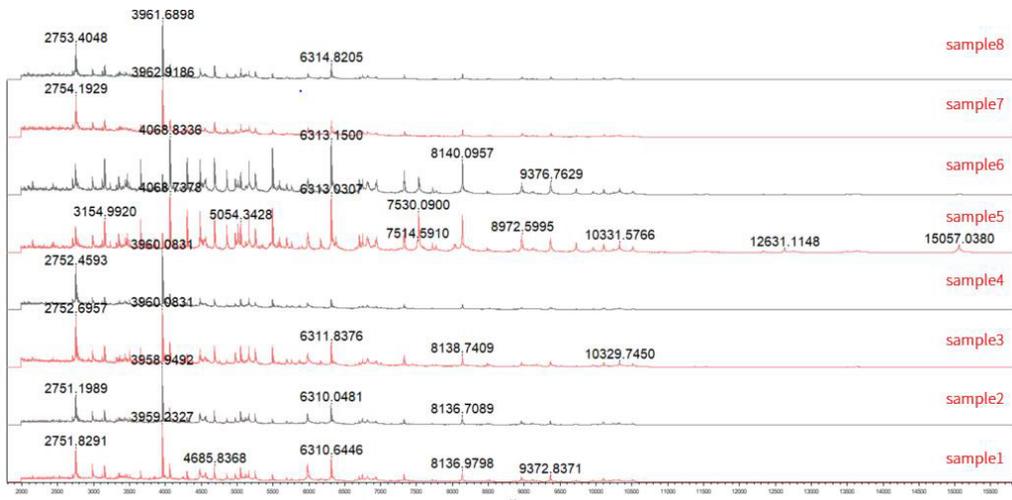


图 6 8 个样品质谱图对比展示

	选择	样本号	菌株英文名称	菌株中文名称	提示	鉴定结果	置信水平	鉴定来源
▶ 1	<input type="checkbox"/>	sample8-H5	Clostridium perfringens	产气荚膜梭菌		117.83	■	标准库-全部
2	<input type="checkbox"/>	sample7-H4	Clostridium perfringens	产气荚膜梭菌		153.05	■	标准库-全部
3	<input type="checkbox"/>	sample6-H3	Clostridium perfringens	产气荚膜梭菌		127.97	■	标准库-全部
4	<input type="checkbox"/>	sample5-H2	Clostridium perfringens	产气荚膜梭菌		109.96	■	标准库-全部
5	<input type="checkbox"/>	sample4-G5	Clostridium perfringens	产气荚膜梭菌		115.77	■	标准库-全部
6	<input type="checkbox"/>	sample3-G4	Clostridium perfringens	产气荚膜梭菌		131.76	■	标准库-全部
7	<input type="checkbox"/>	sample2-G3	Clostridium perfringens	产气荚膜梭菌		120.31	■	标准库-全部
8	<input type="checkbox"/>	sample1-G2	Clostridium perfringens	产气荚膜梭菌		123.35	■	标准库-全部
9	<input type="checkbox"/>	Ecoli-G1	Escherichia coli	大肠埃希菌	⚠	110.01	■	标准库-全部

图 7 数据库检索结果界面

将样品前处理后进行质谱分析，使用 MALDI-TOF Performance 采集质谱图，将数据导入微生物数据库鉴定（图 7）。数据库鉴定结果置信度阈值为 25，高于 25 即为阳性结果。经鉴定 8 个样品均为阳性结果，本次实验检测到的微生物均为产气荚膜梭菌。在 8 个样品中均出现的特征离子峰见表 1。

表 1 样品中特征离子峰列表

菌株编号	特征离子 (m/z)
sample1	2751.8291、3151.3053、3959.2327、4067.2053、5493.5695、6310.6446、8136.9798、9372.8371
sample2	2751.1989、3152.8837、3958.9492、4067.0138、5493.3017、6310.0481、8136.7089、9372.6917
sample3	2752.6957、3154.2330、3960.0831、4068.0673、5494.8600、6311.8376、8138.7409、9375.0180
sample4	2752.4593、3154.1486、3960.0831、4068.3547、5495.3053、6311.8376、8138.8764、9374.8726
sample5	2752.6169、3154.9920、3960.4611、4068.7378、5495.6393、6313.0307、8139.2828、9375.8904
sample6	2752.8533、3154.5703、3960.8392、4068.8336、5495.6393、6313.1500、8140.0957、9376.7629
sample7	2754.1929、3155.5825、3962.9186、4070.7496、5499.4250、6316.9687、8144.4319、9382.2894
sample8	2753.4048、3155.3295、3961.6898、4069.6957、5497.1979、6314.8205、8142.3991、9379.2351

## ■ 结论

本文采用岛津飞行时间质谱 MALDI-TOF Performance，使用乙醇甲酸提取法结合超声的方法对样品进行前处理，通过微生物鉴定数据库快速准确鉴定动物肠道来源的微生物，本次实验检测到的微生物为产气荚膜梭菌。MALDI-TOF 质谱法前处理简单、速度快、操作简便，同时数据库中含有 3400 多种微生物的标准谱图，是微生物鉴定的有力分析方法。

岛津应用云

