

使用 MALDI-8020 快速鉴定乳酸杆菌

MALDI-065

摘要： 乳酸杆菌具有调节肠道菌群，增强免疫力的功能，是常见的益生菌。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，具有快速、准确、使用成本低、操作简便等特点。本文使用岛津 MALDI-8020 结合毅新博创微生物数据库，对乳酸杆菌进行了快速鉴定，检测到的微生物主要包括唾液乳杆菌、发酵乳杆菌、路氏乳杆菌等。

关键词： 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 微生物鉴定 乳酸杆菌

技术特点：

- ❖ 质谱法操作简便、分析速度快，可以快速给出未知微生物鉴定结果。
- ❖ 乙醇甲酸提取加上超声进行前处理，适用于乳酸杆菌的快速鉴定。

乳酸杆菌是可使葡萄糖等糖类分解为乳酸的各种细菌的总称，是一类革兰氏阳性、无芽孢的杆菌。其广泛存在于自然界中，如动物的口腔、肠道中，以及乳制品、肉制品等食品中。在食品工业中，可用于制作酸奶、泡菜等，其产生的乳酸具有调味和防腐作用。

在医疗保健领域，某些乳酸菌可作为益生菌，调节肠道菌群，增强免疫力，保护粘膜，改善肠道功能。

传统的微生物检测法如生化反应法、PCR 法、DNA 探针技术等，不仅耗时较长，而且试剂和耗材的成本也较高。相较于传统检测方法，MALDI-TOF 质谱法作为近年来兴起的检测技术，鉴定过程仅需数分钟、可高通量检测、日常使用成本低廉，已在广泛应用于临床及科研领域。本文利用 MALDI-8020 质谱仪结合微生物数据库，对乳酸杆菌进行快速鉴定。经过与数据库中的标准谱图对比，成功鉴定唾液乳杆菌、发酵乳杆菌、路氏乳杆菌，结果与预期相符。

■ 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-8020

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：经固体培养基培养的大肠杆菌标准菌株 ATCC 8739 和 6 个乳酸杆菌样品。

基质： α - 氰基 -4- 羟基肉桂酸（CHCA），购自默克生命科学公司（货号：C8982）。

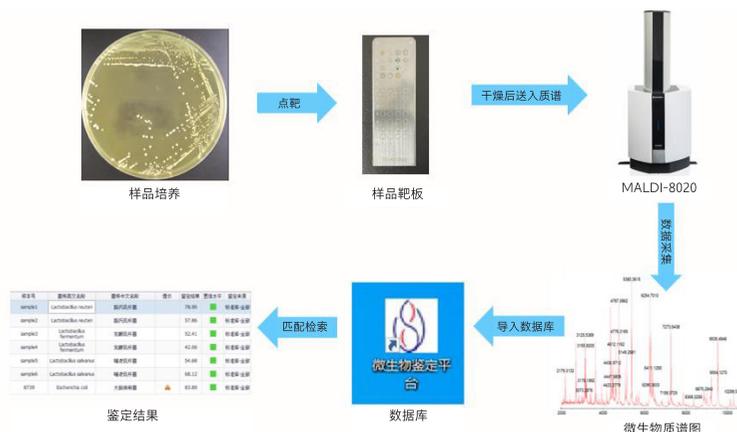


图 1 乳酸杆菌鉴定流程图

1.3 样品前处理

大肠杆菌标准菌株 ATCC 8739 及 6 个乳酸杆菌样品，均采用直接涂布法、乙醇甲酸提取加超声进行前处理，比较两种方法前处理效果。

1.3.1 直接涂布法

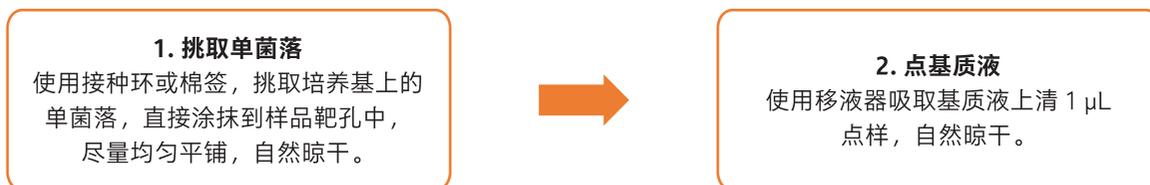


图 2 直接涂布法流程图

1.3.2 乙醇甲酸提取加超声前处理

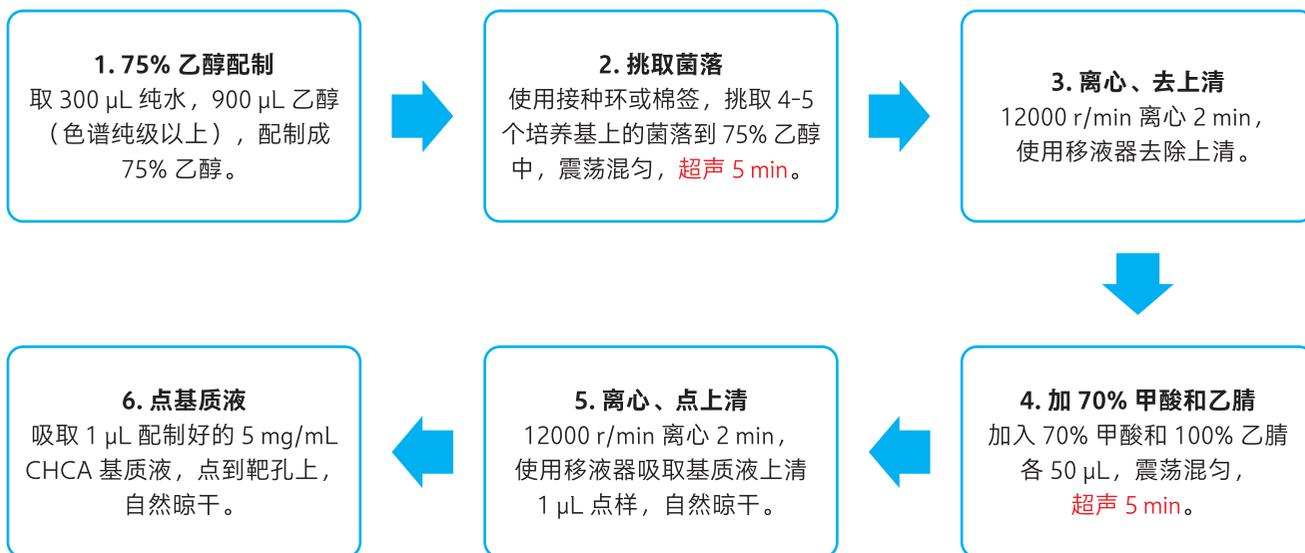


图 3 乙醇甲酸提取加超声前处理流程图

1.4 分析条件

调谐模式：Linear Positive

激光器：355 nm 固体激光器

扫描范围：m/z 2000-20000

激光频率：100 Hz

脉冲引出质量：8330 Da

激光能量：55-60

■ 结果与讨论

在进行微生物鉴定质谱分析时，需先对样品进行前处理，随后利用 MALDI-8020 采集质谱图，再将所得数据导入数据库完成鉴定。其中，样品前处理环节，重点在于破坏微生物的细胞结构，其不仅能使微生物样本灭活，还能有效释放细胞内的目的蛋白。

部分样品的质谱图如下所示（图 4-5）。直接涂布法的质谱图较粗糙，考虑原因为未能有效提取目的蛋白，谱图基线噪音较高，目的蛋白信号不明显；而乙醇甲酸提取加超声法处理后的质谱图信号强烈，基线平稳，目的蛋白信号良好。

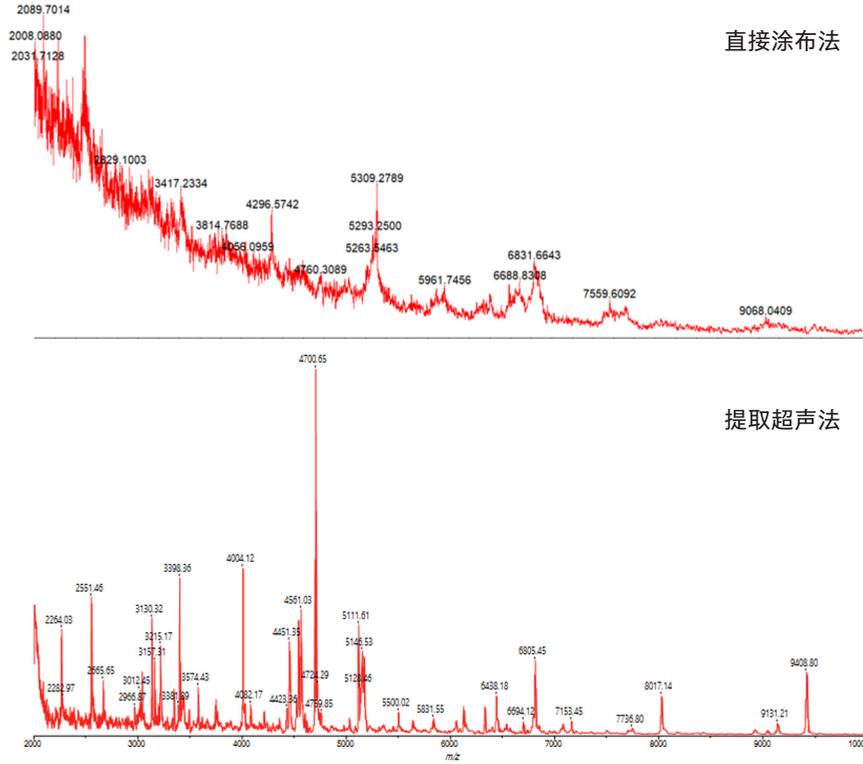


图 4 样品 1 两种前处理方法质谱图对比

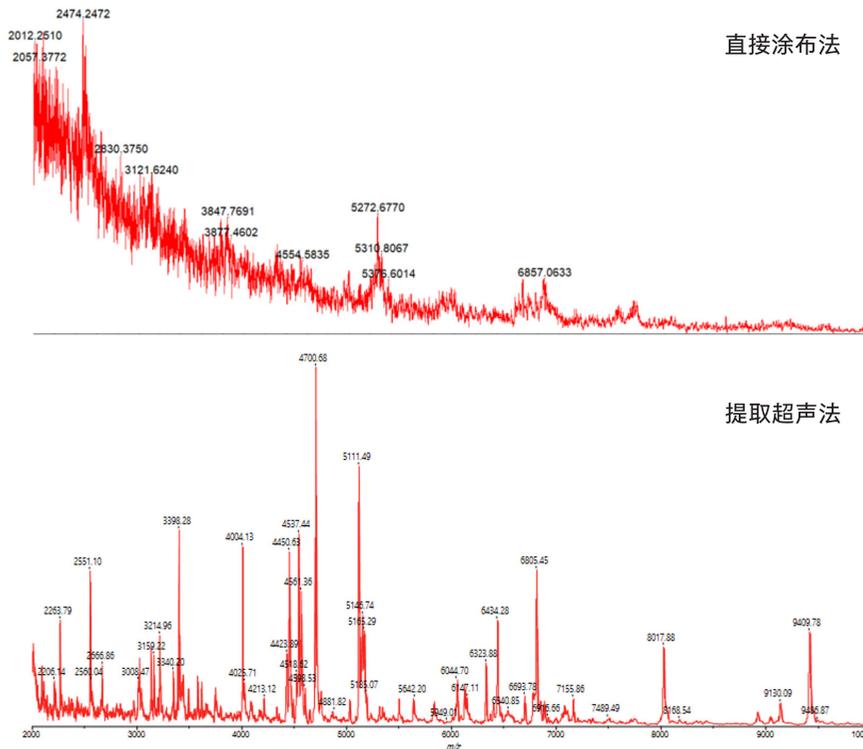


图 5 样品 2 两种前处理方法质谱图对比

经过实践发现，由于革兰氏阳性菌的细胞壁较厚，仅采用传统的直接涂布法难以充分破坏其细胞结构，在乙醇甲酸提取法的基础上，每次加入有机试剂后进行5分钟的超声处理，可高效地破坏革兰氏阳性菌的细胞结构，实现目的蛋白的有效提取，为后续精准的质谱分析和微生物鉴定提供有力支持。

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
<input type="checkbox"/>	sample1	Lactobacillus reuteri	路氏乳杆菌		78.90	■	标准库-全部
<input type="checkbox"/>	sample2	Lactobacillus reuteri	路氏乳杆菌		57.86	■	标准库-全部
<input type="checkbox"/>	sample3	Lactobacillus fermentum	发酵乳杆菌		52.41	■	标准库-全部
<input type="checkbox"/>	sample4	Lactobacillus fermentum	发酵乳杆菌		42.06	■	标准库-全部
<input type="checkbox"/>	sample5	Lactobacillus salivarius	唾液乳杆菌		54.68	■	标准库-全部
<input type="checkbox"/>	sample6	Lactobacillus salivarius	唾液乳杆菌		68.12	■	标准库-全部
<input type="checkbox"/>	8739	Escherichia coli	大肠埃希菌	⚠	83.89	■	标准库-全部
<input type="checkbox"/>	sample1-direct smear	Shigella sp.	志贺菌属	⚠	13.36	●	标准库-全部
<input type="checkbox"/>	sample2-direct smear	Lactobacillus reuteri	路氏乳杆菌		17.75	●	标准库-全部
<input type="checkbox"/>	sample3-direct smear		无匹配结果			●	标准库-全部
<input type="checkbox"/>	sample4-direct smear	Shigella sonnei	宋内氏志贺菌	⚠	13.80	●	标准库-全部
<input type="checkbox"/>	sample5-direct smear	Burkholderia anthina 标准 SMR + AR + A pmovar VIII	花园伯克霍尔德菌		10.53	●	标准库-全部
<input type="checkbox"/>	sample6-direct smear	Bacillus endophyticus	植物内芽孢杆菌		18.69	●	标准库-全部
<input type="checkbox"/>	8739-direct smear	Shigella sp.	志贺菌属	⚠	22.43	⚠	标准库-全部

图 6 微生物数据库检索结果对比

质谱数据经软件处理后，导入微生物数据库检索（图6）。数据库鉴定结果置信度阈值为25，高于25即为阳性结果。直接涂布法样品经检索得分均低于25，无阳性结果。提取加超声法处理后的6个样品均为阳性结果，可见质谱图出峰的优劣会影响最终的鉴定结果。本次实验检测到的微生物主要为唾液乳杆菌、发酵乳杆菌、路氏乳杆菌等乳酸杆菌属微生物，详细鉴定结果见表1。

表 1 乳酸杆菌鉴定结果

菌株编号	鉴定菌种名称		鉴定得分
	英文名	中文名	
1	Lactobacillus reuteri	路氏乳杆菌	78.90
2	Lactobacillus reuteri	路氏乳杆菌	57.86
3	Lactobacillus fermentum	发酵乳杆菌	52.41
4	Lactobacillus fermentum	发酵乳杆菌	42.06
5	Lactobacillus salivarius	唾液乳杆菌	54.68
6	Lactobacillus salivarius	唾液乳杆菌	68.12
ATCC8739	Escherichia coli	大肠埃希菌	83.89

■ 结论

本文使用岛津台式飞行时间质谱仪 MALDI-8020，采用乙醇甲酸提前加超声的前处理方法，结合毅新博创微生物数据库，实现了对固体培养基分离纯化后的乳酸杆菌的快速准确鉴定。实验结果显示，检测到的微生物包括唾液乳杆菌、发酵乳杆菌、路氏乳杆菌等多种乳酸杆菌。MALDI-TOF 指纹图谱法以其前处理简便、检测速度快、操作简易等优势，显著提升了鉴定效率。此外，数据库涵盖了3500种以上的菌种标准谱图，是微生物分析鉴定的有力工具。

岛津应用云

