

提高 MALDI-TOF 微生物快速鉴定成功率的方法研究

MALDI-066

摘要：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF) 是鉴定微生物的快速、可靠的方法，在快速和准确性方面的总体表现明显高于传统的生化鉴定方法，已在临床检验、食品安全、疾控等行业得到广泛应用。本文使用乙醇甲酸提取加超声法对革兰氏阳性菌进行前处理，MALDI-TOF Performance 采集质谱数据后，导入毅新博创数据库进行快速鉴定，检测到的微生物主要包括葡萄球菌、乳酸杆菌、双歧杆菌等。

关键词： MALDI-TOF Performance 微生物鉴定 革兰氏阳性菌

技术特点：

- ❖ 乙醇甲酸提取加超声进行前处理，可有效提取革兰氏阳性菌中的目的蛋白。
- ❖ MALDI-TOF 作为一种软电离技术，适用于蛋白质等生物大分子的直接电离检测。
- ❖ 毅新博创微生物数据库中含有 3500 种以上微生物的标准谱图，适合大部分常见微生物的鉴定。

革兰氏染色反应是细菌分类的传统方法之一，微生物经染色后在显微镜下呈蓝紫色的即为革兰氏阳性菌。其特点是细胞壁较厚，主要由肽聚糖和磷壁酸组成，具有较高的机械强度和化学稳定性。常见的革兰氏阳性菌有葡萄球菌、乳酸杆菌、双歧杆菌等，部分为致病菌，如葡萄球菌可引起皮肤感染及化脓；部分为益生菌，如乳酸杆菌、双歧杆菌可改善肠道菌群，促进营养物质吸收，增强机体抵抗力。

相较于传统的生化反应等检测方法，MALDI-

TOF 质谱法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。微生物鉴定前处理时对于目的蛋白的有效提取，会影响最终的鉴定结果。本文利用 MALDI-TOF Performance 质谱仪结合微生物数据库，对革兰氏阳性菌进行快速鉴定。经过与数据库中的标准谱图对比，成功鉴定葡萄球菌、乳酸杆菌、双歧杆菌等，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-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：经固体培养基培养的大肠杆菌标准菌株 ATCC 8739 和 8 个革兰氏阳性菌样品（编号为样品 1- 样品 8）。

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）。

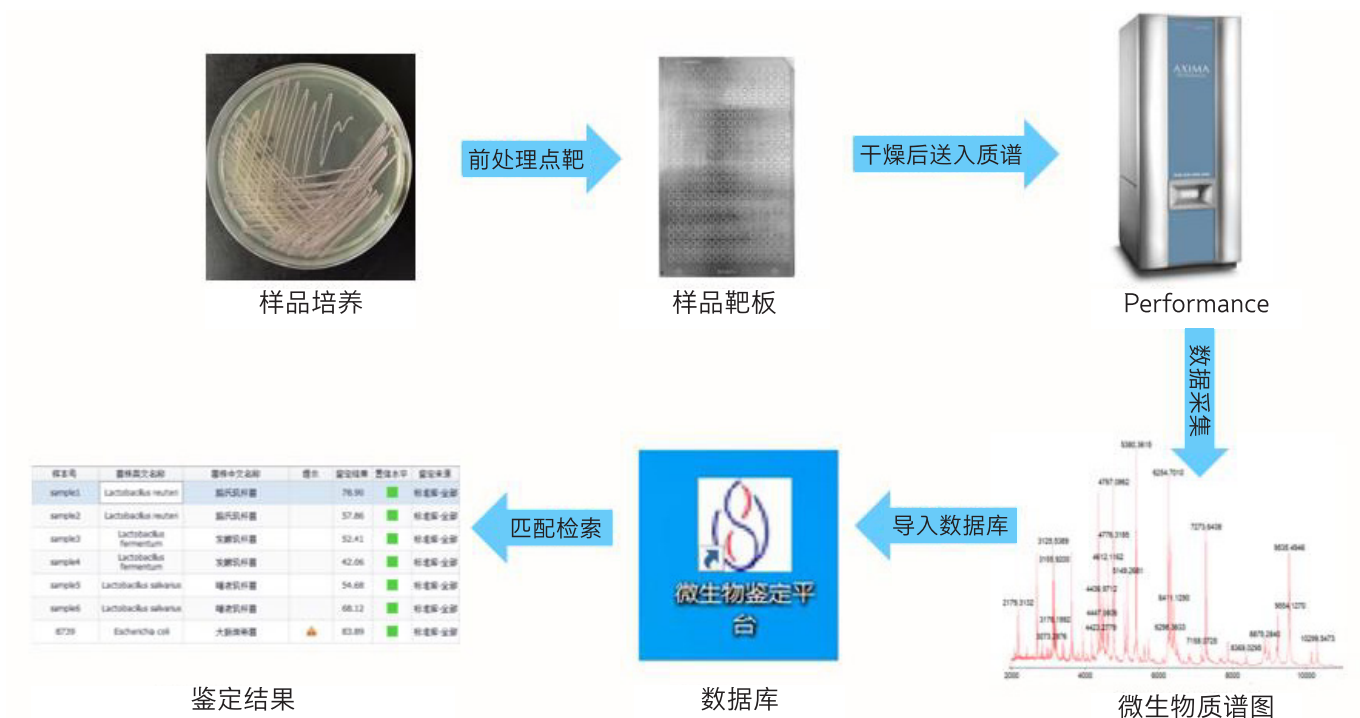


图 1 革兰氏阳性菌鉴定流程图

1.3 样品前处理

大肠杆菌标准菌株 ATCC 8739 及 8 个革兰氏阳性菌样品，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

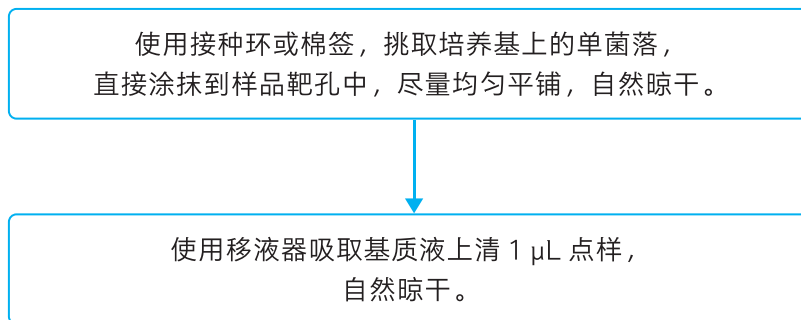


图 2 直接涂布法流程图

1.3.2 乙醇甲酸提取加超声前处理

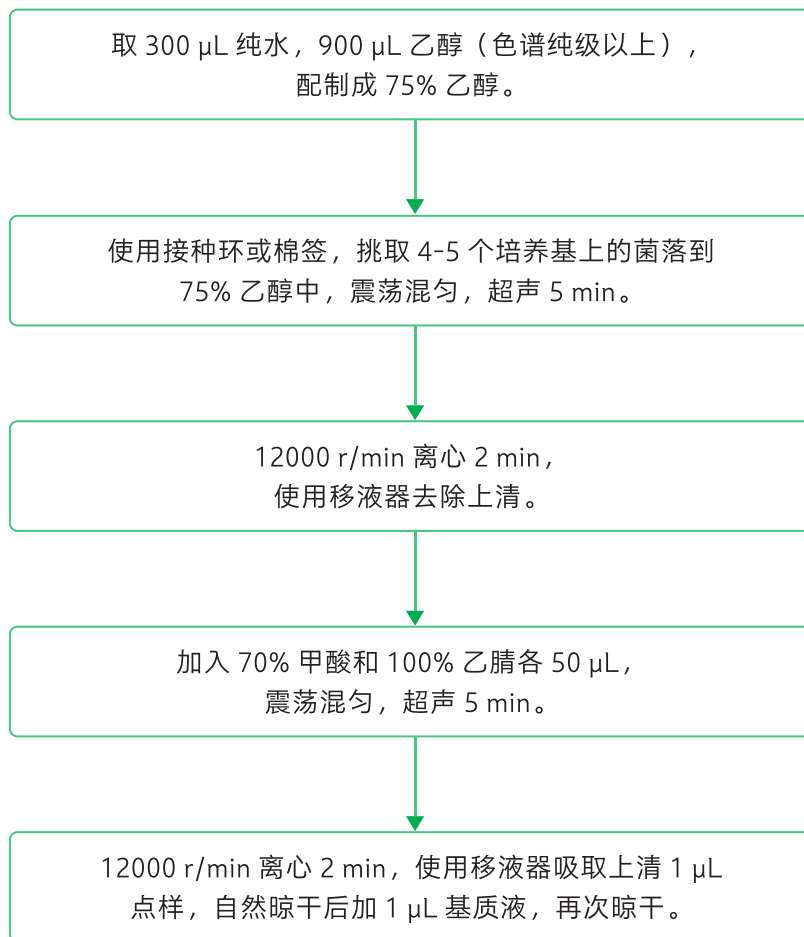


图 3 乙醇甲酸提取加超声前处理流程图

1.4 分析条件

调谐模式 : Linear Saramis	激光器 : 337 nm 氮气激光器
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 : 60

■ 结果与讨论

使用 MALDI-TOF 质谱法进行微生物鉴定时, 需要先对样品进行前处理, 再采集质谱图和导入数据库鉴定。

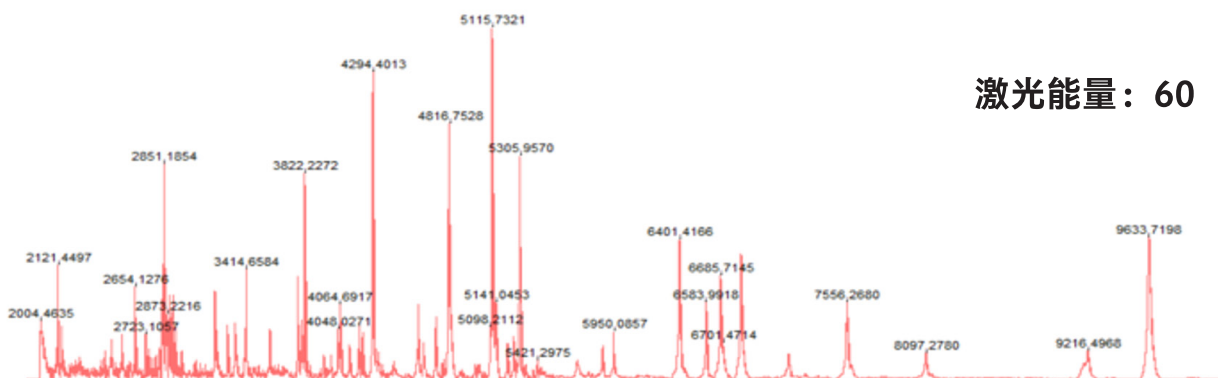
2.1 激光能量优化

激光能量对于质谱信号有至关重要的作用, 如图 4 所示, 在该条件优化过程中, 随着激光能量的增强, 质谱信号也显著增强, 但过高的激光能量也导致了基线噪声的增大。综合考虑选择激光能量 60, 在此能量下信号良好, 基线稳定。

激光能量：30



激光能量：60



激光能量：80

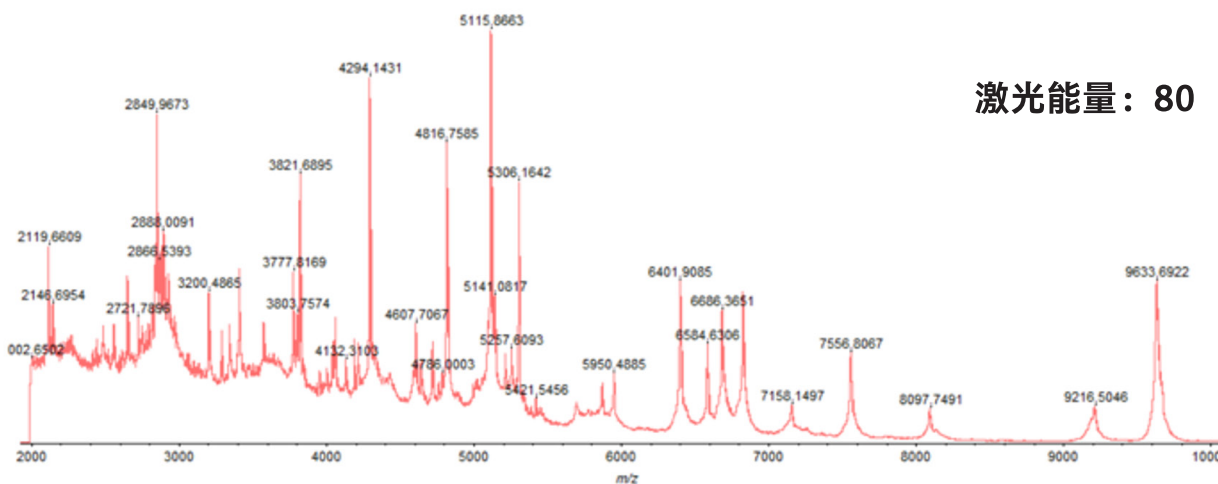


图 4 样品 1 不同激光能量测试对比

2.2 不同前处理方法对比

直接涂布法通常只对细胞壁较薄的革兰氏阴性菌有效果。革兰氏阳性菌由于细胞壁比较厚，尝试使用乙醇甲酸提取法加超声进行前处理，旨在破坏微生物的细胞结构，这样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。

部分样品两种前处理方法的对比质谱图如下所示（图 5-7）。直接涂布法的谱图表现为或者质谱峰较少，或者基线噪音较高，信号不明显，考虑是前处理时未能有效提取目的蛋白引起的；而乙醇甲酸提取加超声法处理后的谱图中质谱峰在整个扫描范围分布均匀，基线平稳，信号强，表明目的蛋白在前处理时得到了有效提取。

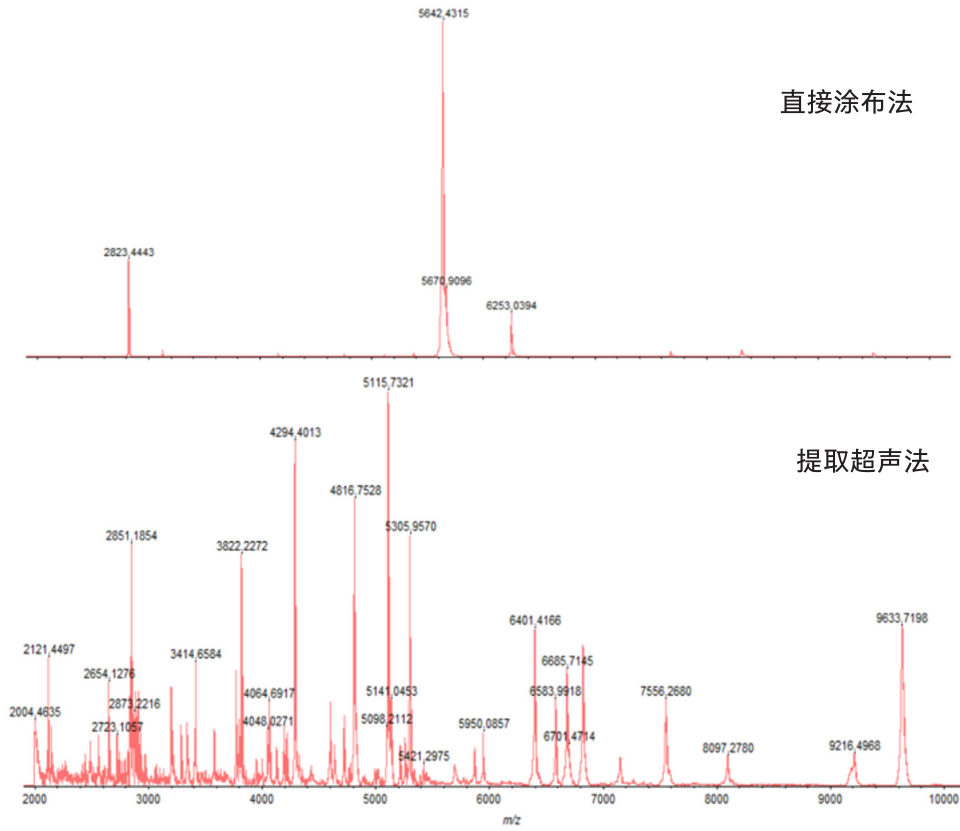


图 5 样品 1 两种前处理方法质谱图对比

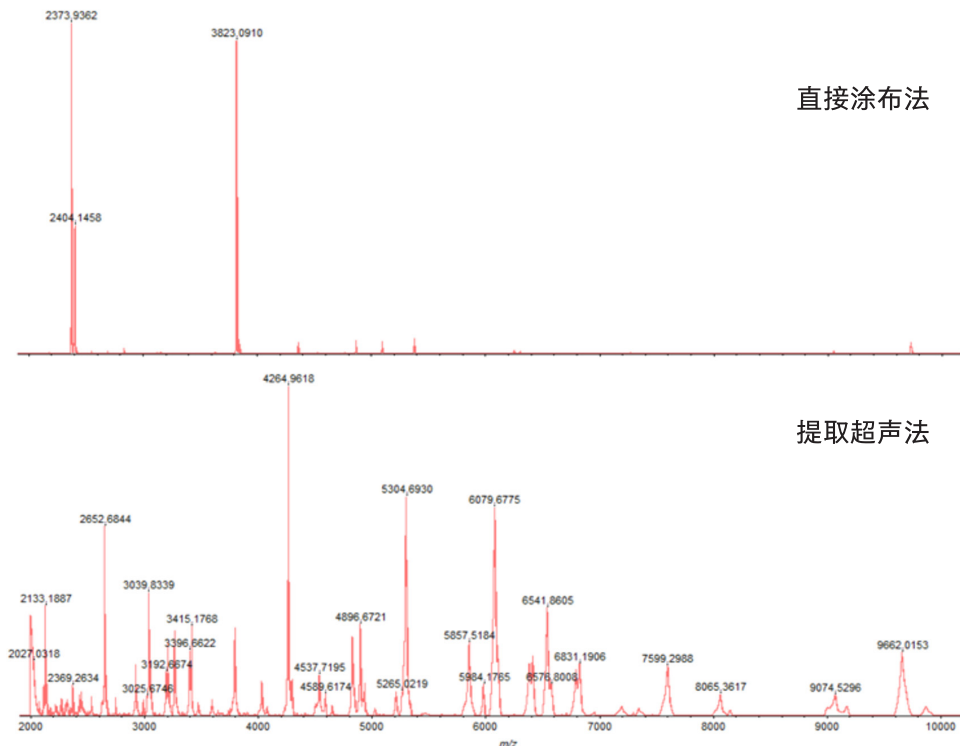


图 6 样品 2 两种前处理方法质谱图对比

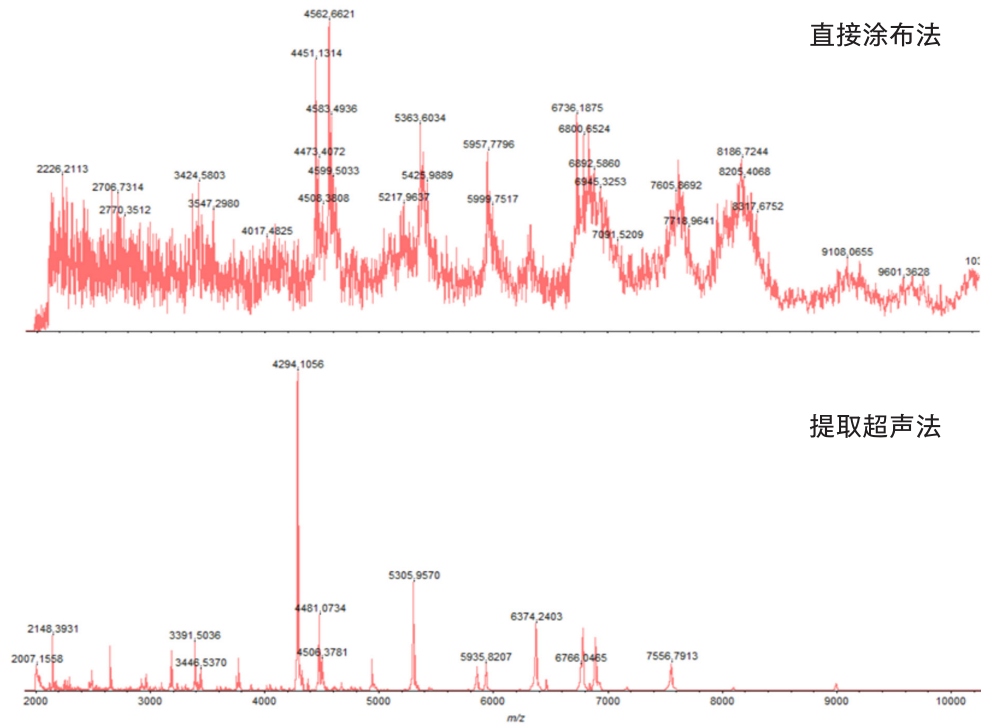


图 7 样品 3 两种前处理方法质谱图对比

实验发现，针对革兰氏阳性菌细胞壁较厚的特点，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，选择合适的激光能量，以便采集到信号更佳的质谱图。相对于传统的直接涂布法，提取加超声的方法确实能够有效提高革兰氏阳性菌的鉴定成功率。

1	<input type="checkbox"/>	sample1-extract	Staphylococcus epidermidis	表皮葡萄球菌		86.36	■	标准库-全部	提取 超声法
2	<input type="checkbox"/>	sample2-extract	Staphylococcus cohnii	孔氏葡萄球菌		66.51	■	标准库-全部	
3	<input type="checkbox"/>	sample3-extract	Staphylococcus haemolyticus	溶血葡萄球菌		96.32	■	标准库-全部	
4	<input type="checkbox"/>	sample4-extract	Bifidobacterium adolescentis	青春双歧杆菌		25.69	■	标准库-全部	
5	<input type="checkbox"/>	sample5-extract	Bifidobacterium animalis	动物双歧杆菌		37.00	■	标准库-全部	
6	<input type="checkbox"/>	sample6-extract	Bifidobacterium bifidum	两叉双歧杆菌		33.57	■	标准库-全部	
7	<input type="checkbox"/>	sample7-extract	Lactobacillus fermentum	发酵乳杆菌		59.30	■	标准库-全部	
8	<input type="checkbox"/>	sample8-extract	Lactobacillus reuteri	路氏乳杆菌		39.96	■	标准库-全部	
9	<input type="checkbox"/>	Ecoli-extract	Escherichia coli	大肠埃希菌	⚠	60.11	■	标准库-全部	直接 涂布法
10	<input type="checkbox"/>	sample1-direct smear	Streptococcus parasanguinis	副血链球菌		12.30	●	标准库-全部	
11	<input type="checkbox"/>	sample2-direct smear		无匹配结果			●	标准库-全部	
12	<input type="checkbox"/>	sample3-direct smear	Gemella morbillorum	麻疹孪生球菌		23.77	▲	标准库-全部	
13	<input type="checkbox"/>	sample4-direct smear	Parvimonas micra	微小单胞菌		10.00	●	标准库-全部	
14	<input type="checkbox"/>	sample5-direct smear	Comamonas sp.	丛毛单胞菌属		10.94	●	标准库-全部	
15	<input type="checkbox"/>	sample6-direct smear	Nocardia cyriacigeorgica	圣乔治教堂诺卡菌		21.89	▲	标准库-全部	
16	<input type="checkbox"/>	sample7-direct smear	Rothia nasimurium	鼠鼻罗斯氏菌		5.00	●	标准库-全部	
17	<input type="checkbox"/>	sample8-direct smear	Cryptococcus neoformans	新生隐球菌		18.42	●	标准库-全部	

图 8 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 8）。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 8 个样品均为阳性结果，本次实验检测到的微生物主要为葡萄球菌属表皮葡萄球菌、孔氏葡萄球菌、溶血葡萄球菌，双歧杆菌属青春双歧杆菌、动物双歧杆菌、两叉双歧杆菌，乳酸杆菌属发酵乳杆菌、路氏乳杆菌，详细鉴定结果见表 1。

表 1 革兰氏阳性菌鉴定结果

菌株编号	鉴定菌种名称		鉴定得分
	英文名	中文名	
1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	表皮葡萄球菌	86.36
2	<i>Staphylococcus cohnii</i>	孔氏葡萄球菌	66.51
3	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	溶血葡萄球菌	96.32
4	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	青春双歧杆菌	25.69
5	<i>Bifidobacterium animalis</i>	动物双歧杆菌	37.00
6	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	两叉双歧杆菌	33.57
7	<i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳杆菌	59.30
8	<i>Lactobacillus reuteri</i>	路氏乳杆菌	39.96
ATCC8739	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希菌	60.11

■ 结论

本文使用岛津飞行时间质谱仪 MALDI-TOF Performance，对比了直接涂布法和乙醇甲酸提取加超声法两种前处理方法，结合微生物数据库进行鉴定。实验结果显示，乙醇甲酸提取加超声法鉴定结果优于直接涂布法，检测到的微生物包括葡萄球菌、双歧杆菌、乳酸杆菌等多种革兰氏阳性菌。MALDI-TOF 质谱法相较于传统生化反应方法，具有检测速度快、准确率高、前处理简单等特点，显著提升了微生物样本的鉴定效率。此外，数据库涵盖了 3500 种以上的菌种标准谱图，适合于大部分常见的科研及临床微生物检测。

岛津应用云

