

# 使用 MALDI-8030 结合自建库功能鉴定诺卡菌

## MALDI-067

**摘要：**诺卡菌为革兰氏阳性条件致病菌，普遍存在于土壤及水体中，不属于人体正常菌群，多在免疫功能受损个体中引发感染，以肺部受累最为常见。在微生物鉴定技术中，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-8030 结合毅新博创微生物数据库的自建库功能，对圣乔治教堂诺卡菌进行了快速准确鉴定。

**关键词：**基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8030 微生物鉴定 诺卡菌

### 技术特点：

- ❖ 质谱法前处理简便、分析速度快，可以快速给出未知微生物鉴定结果。
- ❖ 通过数据库的自建标准谱图功能，实现圣乔治教堂诺卡菌的快速鉴定。

诺卡菌（*Nocardia*）是一类革兰氏阳性、需氧、弱抗酸的放线菌，广泛分布于土壤、水体及腐烂有机物中。诺卡菌病多见于免疫功能受损人群，如器官移植、艾滋病、长期使用免疫抑制剂或糖皮质激素的患者，但也可能累及健康人。诺卡菌可通过呼吸道吸入、皮肤破损或消化道进入人体，主要侵犯肺部、皮肤和中枢神经系统，其中肺部感染最常见，约占 85%，症状与肺结核相似，可出现发热、咳嗽、脓痰、咯血、胸痛等。

圣乔治教堂诺卡菌（*Nocardia cyriacigeorgica*）为专性需氧菌，在固体培养基上生长缓慢，通常需要 37°C 培养 48 小时以上，菌落呈白色、干燥、褶皱状。该菌是一种条件致病菌，正常情况下不致病，但在宿主免疫力下降、菌群失调、侵入非正常部位时可引发

感染。自 2001 年首次被分离鉴定以来，其感染病例逐渐增多，尤其是在中国，圣乔治教堂诺卡菌已成为诺卡菌感染的常见菌种。早期诊断和及时治疗是改善预后的关键。

传统的微生物检测法（如生化反应法、PCR 法、DNA 测序等）存在耗时长、试剂耗材成本高等局限性。相比之下，MALDI-TOF 质谱检测技术，具备数分钟内完成鉴定、可高通量检测、日常使用成本低等显著优势，已广泛应用于临床及科研领域。本文利用 MALDI-8030 质谱仪结合微生物数据库的自建库功能，对诺卡菌进行快速鉴定。通过自建标准谱图，成功鉴定了牛奶中培养得到的圣乔治教堂诺卡菌，结果与预期一致，验证了该方法的准确性。

## ■ 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-8030

数据库：毅新博创微生物鉴定平台 BE3.6.2

### 1.2 试剂与样品

样品：经血琼脂固体培养基培养的大肠杆菌标准菌株 ATCC 8739、6 个用于建库的圣乔治教堂诺卡菌（编号 sample1-6）、8 个用于验证的圣乔治教堂诺卡菌（编号 sample7-14）、2 个用于验证的星形诺卡菌（编号 sample15-16），所有菌株均已使用生物梅里埃 VITEK2 COMPACT 生化反应仪进行菌种确认。

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

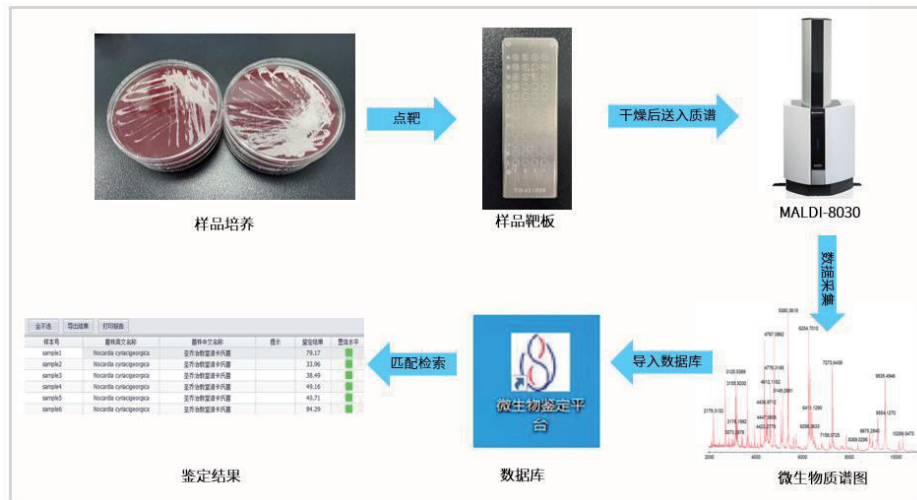


图1 诺卡菌鉴定流程图

### 1.3 样品前处理

大肠杆菌标准菌株 ATCC 8739 及 16 个诺卡菌样品，均采用乙醇甲酸提取法进行样品的前处理。

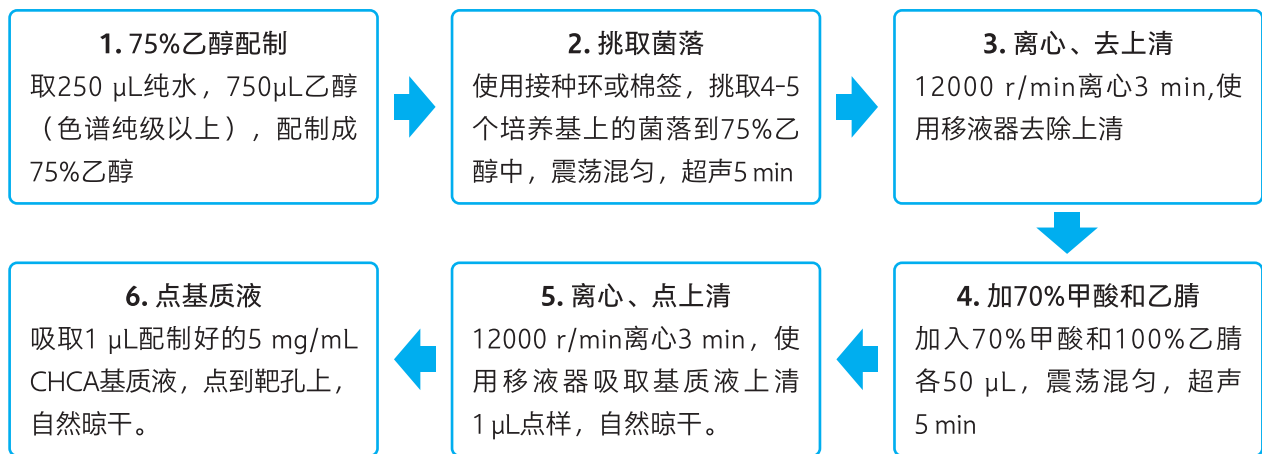


图2 乙醇甲酸提取加超声前处理流程图

### 1.4 分析条件

调谐模式：Linear Positive  
扫描范围：m/z 2000-20000  
脉冲引出质量：8330 Da  
激光器：355 nm 固体激光器  
激光频率：100 Hz  
激光能量：65-70

## ■ 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，随后使用 MALDI-8030 采集质谱图，再将所得数据导入数据库完成鉴定。其中，数据库是 MALDI-TOF 质谱法进行微生物鉴定的核心部分，待测微生物只有与数据库中已有谱图高度匹配才能得到准确鉴定结果。如遇到数据库中标准谱图较少的菌株，或者待测菌株与建库菌株表达生成的蛋白指纹谱图差异较大（可能由菌株地域差异、培养条件差异引起）等情况，鉴定成功率可

能会偏低。此种情况下，需要根据待测菌株数据及时建立和完善本地常见微生物菌株的标准谱图。

大肠杆菌标准菌株及部分样品的质谱图如下所示（图 3-5）。经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，目的蛋白出峰良好。

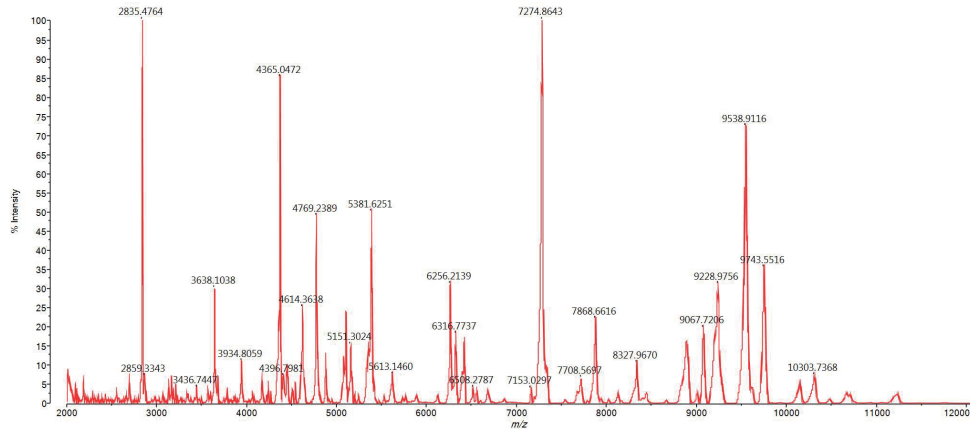


图 3 大肠杆菌标准菌株 ATCC8739 质谱图

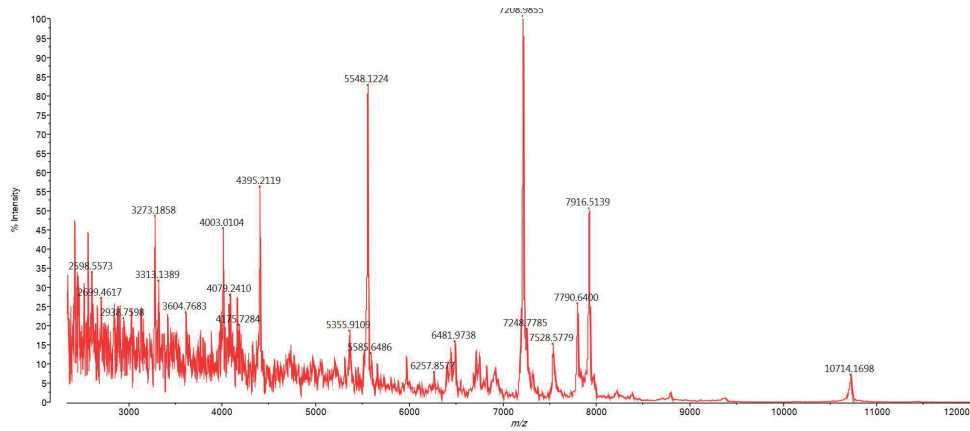


图 4 样品 1 质谱图

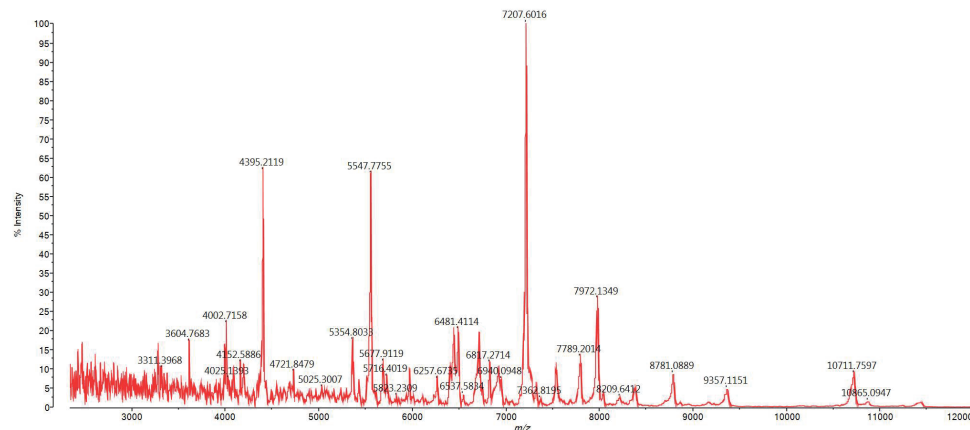


图 5 样品 2 质谱图

## 2.1 标准库鉴定结果

质谱图经软件处理后，将建库组样品数据（sample1-6）导入微生物数据库标准库检索（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。除标准菌株大肠杆菌得分较高外；6个建库组样品均得分低于25，部分样品甚至鉴定成其他菌种，均未成功鉴定。

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"/>	sample1	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡菌		22.66	▲	标准库-全部
2	<input type="checkbox"/>	sample2	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡菌		21.05	▲	标准库-全部
3	<input type="checkbox"/>	sample3	<i>Nocardia abscessus</i>	脓肿诺卡菌		18.54	●	标准库-全部
4	<input type="checkbox"/>	sample4	<i>Actinomyces neuii</i>	纽氏放线菌		12.98	●	标准库-全部
5	<input type="checkbox"/>	sample5	<i>Nocardia abscessus</i>	脓肿诺卡菌		20.22	▲	标准库-全部
6	<input type="checkbox"/>	sample6	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡菌		22.72	▲	标准库-全部
7	<input type="checkbox"/>	Ecol8739	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希菌	▲	69.50	■	标准库-全部

图6 微生物样品标准数据库检索结果

## 2.2 自建库鉴定结果

鉴于样品数据与标准库中谱图匹配得分较低，自行进行样品标准谱图的创建。将6个建库样品的质谱图导入数据库中，软件根据相应算法自动生成新的标准谱图，详细流程如下图。

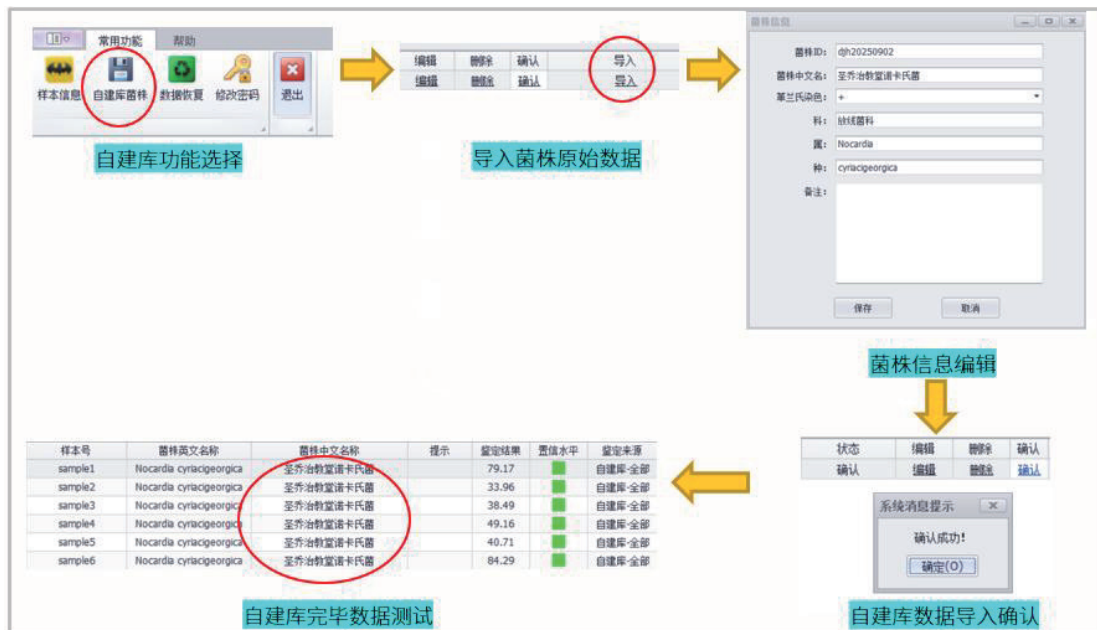


图7 微生物样品自建数据库流程

自建库完毕，导入建库组数据及验证组数据，使用自建库中的标准谱图进行鉴定。6个建库组圣乔治教堂诺卡菌（sample1-6）及8个验证组圣乔治教堂诺卡菌（sample7-14）得分均高于25，成功鉴定。与圣乔治教堂诺卡菌亲缘关系最近的2个星形诺卡菌（sample15-16）得分低于25，未鉴定成功，说明自建库能区分亲缘关系较近的菌种，不会产生假阳性结果。

	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"/>	sample1	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		79.17	■	自建库-全部
2	<input type="checkbox"/>	sample2	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		33.96	■	自建库-全部
3	<input type="checkbox"/>	sample3	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		38.49	■	自建库-全部
4	<input type="checkbox"/>	sample4	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		49.16	■	自建库-全部
5	<input type="checkbox"/>	sample5	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		40.71	■	自建库-全部
6	<input type="checkbox"/>	sample6	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		84.29	■	自建库-全部
7	<input type="checkbox"/>	sample7	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		32.92	■	自建库-全部
8	<input type="checkbox"/>	sample8	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		57.48	■	自建库-全部
9	<input type="checkbox"/>	sample9	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		37.95	■	自建库-全部
10	<input type="checkbox"/>	sample10	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		32.40	■	自建库-全部
11	<input type="checkbox"/>	sample11	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		64.11	■	自建库-全部
12	<input type="checkbox"/>	sample12	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		56.92	■	自建库-全部
13	<input type="checkbox"/>	sample13	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		31.03	■	自建库-全部
14	<input type="checkbox"/>	sample14	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		95.35	■	自建库-全部
15	<input type="checkbox"/>	sample15	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		16.94	●	自建库-全部
16	<input type="checkbox"/>	sample16	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	圣乔治教堂诺卡氏菌		10.25	●	自建库-全部

图 8 微生物样品自建数据库验证结果

## ■ 结论

本文利用岛津台式飞行时间质谱仪 MALDI-8030，结合乙醇甲酸前处理方法及毅新博创微生物数据库的自建库功能，成功实现了对血平皿分离纯化的圣乔治教堂诺卡菌的快速、精准鉴定。MALDI-TOF 指纹图谱法具有前处理简便、检测速度快、鉴定结果准确等优势，数据库自建库流程简单易操作，显著提升了微生物样品的鉴定效率。

岛津应用云

