

基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱的 溶藻弧菌鉴定研究

谭建锡^{1,2}, 周慧平¹, 莫瑾¹, 黄迎波¹, 彭梓¹, 袁小雅¹, 陈盼³, 朱金国^{1*}

(1. 湖南出入境检验检疫局, 国家食品安全检测重点实验室, 食品安全科学技术湖南省重点实验室, 长沙 410004;
2. 湖南师范大学生命科学院, 长沙 410081; 3. 长沙县食品安全检测中心, 长沙 410100)

摘要: **目的** 建立快速检测和鉴定溶藻弧菌的方法, 采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和 SARAMIS 分析软件, 对来自水产品中的溶藻弧菌进行了检测和鉴定。 **方法** 将从样品中分离得到的可疑菌落于 37 °C 纯化培养 24、48、72 h 后, 分别用微生物 API 生化鉴定系统和 MALDI-TOF-MS 方法进行分析鉴定, 并对 MALDI-TOF-MS 鉴定方法的稳定性、准确性和重复性进行初步探讨。 **结果** 不同的培养时间, 24、48 和 72 h 对 MALDI-TOF-MS 检测的蛋白质谱图影响较小, 鉴定值分别为 94.10%, 93.90%, 92.70%; 同时用微生物 API-20E 生化鉴定试剂盒进行辅助分析鉴定, 培养 24 h 后, 鉴定值为 97.7%, T 值为 0.47, 但培养 72 h 后, 鉴定值为 52.4%, T 值为 0.15。同一样品点样 2 次, 得到的 6 张图谱显示出峰位置基本一致。用标准菌株大肠埃希菌 ATCC 8739 和溶藻弧菌 ATCC 17749 纯化培养 24 h 后, 鉴定值分别为 99.90%和 97.60%。 **结论** 与传统的生化鉴定方法相比, MALDI-TOF-MS 和 SARAMIS 软件分析方法具有较高的稳定性、重复性和准确性, 可以快速、准确地鉴定溶藻弧菌, 可用于水产品中溶藻弧菌的高通量、低成本的快速检测鉴定。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; SARAMIS 分析软件; 溶藻弧菌; 鉴定

Identification of *Vibrio alginolyticus* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

TAN Jian-Xi^{1,2}, ZHOU Hui-Ping¹, MO Jin¹, HUANG Ying-Bo¹, PENG Zi¹, YUAN Xiao-Ya¹,
CHEN Pan³, ZHU Jin-Guo^{1*}

(1. Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, State Key Laboratory of Food Safety Testing, Hunan Key Laboratory of Food Safety Science & Technology, Changsha 410004, China; 2. Department of Microbiology, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 3. Changsha County Food Safety Testing Center, Changsha 410100, China.)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the rapid detection and identification of *Vibrio alginolyticus*, and to detect and identify *Vibrio alginolyticus* carried in the aquatic product by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and the SARAMIS analysis software. **Methods** Suspicious colony isolated from the samples were analyzed by API-20E identification system and MALDI-TOF-MS method after being purified and cultured for 24, 48, 72 h at 37 °C. The accuracy, repeatability, and stability of MALDI-TOF-MS were also studied. **Results** Different time intervals of 24, 48 or 72 h were tested with mass spectrometry and little infects were found, with the identification scores of

*通讯作者: 朱金国, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: zhujg@hnciq.gov.cn

*Corresponding author: ZHU Jin-Guo, Researcher, Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410004, China. E-mail: zhujg@hnciq.gov.cn

94.10%, 93.90%, and 92.70%, respectively. Bacteria API-20E identification system was used to assist the analysis and identification. The results showed that the identification scores were 97.7% and 52.4%, and T value were 0.47 and 0.15, with the different time intervals of 24 and 72 h. The six mass spectrums of the same sample showed the peak positions were basically identical. The identification scores of standard strains of *E. coli* ATCC 8739 and *V. alginolyticus* ATCC 17749 after 24 h were 99.90% and 97.60 %, respectively.

Conclusion Compared with the traditional biochemical identification method, MALDI-TOF-MS is stable, repeatable and accurate. Moreover, it is less time-consuming, and the cost for reagents is minimized. It can be used as a tool for rapid detection and identification of *Vibrio alginolyticus* carried in the aquatic product.

KEY WORDS: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; SARAMIS analysis software; *Vibrio alginolyticus*; identification

1 引言

弧菌广泛分布于近岸海水、河口、鱼类及水产品等生物体表和肠道中。弧菌属是条件致病菌, 当外界环境恶化时, 一些致病种可引起鱼类、甲壳类和贝类等动物的弧菌病, 从而污染水产品。人类因食用被污染的水产品而引起急性食物中毒, 表现为腹泻、呕吐、菌血症和外伤感染及水样便等症状, 严重时可以致死^[1-3]。其中, 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)被确认为 12 种致病性弧菌之一^[4]。溶藻弧菌是一种革兰氏阴性的嗜盐弧菌, 在海水、海产品和食物中的检出率较高, 是沿海地区海产品分离的致病性弧菌中的优势菌种。溶藻弧菌属条件致病菌, 能引起人体伤口感染和败血症^[5-8]。近年来, 溶藻弧菌引起食物中毒和胃肠炎的报道屡见不鲜^[9-15]。因此, 溶藻弧菌作为一种致腹泻菌和影响食品安全的病原菌日益受到重视。

目前, 水产品中溶藻弧菌的检测主要是传统的微生物鉴定方法和分子生物学方法^[16-18]。传统的微生物鉴定方法及基于传统生理生化基础上的仪器分析技术, 均需要经过细菌的培养繁殖、分离纯化等步骤, 费时费力, 而且由于生化特性容易受培养基、保存时间等因素的影响, 尤其对很多海洋弧菌的鉴定还存在易出现假阳性、假阴性和没有结果等问题, 常常无法得到准确的鉴定结果。核酸检测法等分子生物学方法在溶藻弧菌鉴定方面取得了一定的应用, 但由于其敏感性高, 容易出现假阳性, 且对近似种的细菌鉴定的准确性方面还存在不足。因此, 急需要建立更加快速、准确、实用的检测和鉴定方法。

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass

spectrometry, MALDI-TOF-MS)是近年来发展起来的一种新型的软电离生物质谱, 该方法对微生物指纹谱鉴定, 具有灵敏度高、准确度高及分辨率高等特点, 适合对各种微生物进行快速、高通量的检测, 通过 SARAMIS 分析软件比对, 为微生物检验和病原菌鉴定等提供了一种快速的分析鉴定方法。本研究旨在对水产品中溶藻弧菌的传统微生物生化检测鉴定方法与 MALDI-TOF-MS 鉴定方法比较的基础上, 建立基于 (MALDI-TOF-MS 技术和 SARAMIS 分析软件的快速、高通量的溶藻弧菌的检测和鉴定方法。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

基质为 α -氰-4-羟基肉桂酸(α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA, 美国 Sigma 公司), 用于检测样品的基质的溶剂为乙腈-三氟乙酸-水(50:2.5:47.5, V:V:V), 基质溶液现配现用, 用溶剂将基质配成饱和溶液; 甲酸(分析纯)、乙腈(分析纯)、无水乙醇(分析纯); 碱性蛋白胨水(APW)、硫柠檬蔗糖琼脂培养基(TCBS)、科玛嘉弧菌显色培养基, 含 30 g/L NaCl 的营养琼脂等细菌培养基(北京陆桥技术有限公司); API-20E 生化鉴定试剂盒(法国生物梅里埃公司)。

标准菌株为大肠埃希菌 ATCC 8739 和溶藻弧菌标准菌株 ATCC 17749, 均由湖南出入境检验检疫局技术中心提供。

2.2 仪器与设备

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪及 SARAMIS 数据库(MALDI-TOF/SARAMIS, AXIMA Confidence, 日本岛津公司); APIWEB stand alone v 1.1.0 软件系统(法国生物梅里埃公司); 恒温培养箱

(BE600, 德国 Memmert 公司); 高速离心机(Allegra X-22R, 美国贝克曼库尔特公司)。

2.3 方法

2.3.1 样品中溶藻弧菌的分离及生化鉴定

将可疑样品以无菌操作取样品 25 g, 加入到 225 mL 的碱性蛋白胨水(APW)中, 36 °C 培养 24 h, 用接种环挑取培养液于 TCBS 平板划线, 于 37 °C 培养 24 h。挑取 TCBS 上的黄色单菌落纯化 2 次后, 接种于科玛嘉弧菌显色培养基平板上, 于 37 °C 培养 24 h, 观察菌落特征。挑取疑似菌落接种到含 30 g/L NaCl 的营养琼脂上进行纯化, 于 37 °C 纯化培养 24 h、72 h 后, 分别用灭菌棉签取适量细菌用稀释液稀释至特定浓度, 用微生物 API 生化鉴定条进行鉴定实验, 并采用 APIWEB stand alone v 1.1.0 软件系统进行结果分析。

2.3.2 MALDI-TOF-MS 鉴定方法

(1) 样品提取处理与分析

用接种环收集纯化平板上 5~10 mg 菌体, 加入 300 μ L 水, 仔细混匀, 再加入 900 μ L 无水乙醇, 仔细混匀。12000 r/min 离心 2 min, 弃去上清, 加入 50 μ L 70%的乙酸, 仔细混匀, 再加入 50 μ L 乙腈, 仔细混匀, 12000 r/min 离心 2 min, 吸出上清置一新的离心管中, 先点 1 μ L 上清, 放干后再点 1 μ L 基质(CHCA), 晾干后进行 MALDI-TOF-MS 分析。

(2) 质谱图的采集和分析

仪器参数为: Linear configuration 线性操作模式, 正离子, 基质抑制偏转模式; 脉冲离子提取时间: 350 ns; 质量范围: 2000~20000; 激光点击数: 100。靶板采用 384 孔靶板, 每次实验前都大肠埃希菌 ATCC 8739 进行质量校正; 利用 Saramis Premium 软件对细菌质谱图进行分析和鉴定, 可以得到一个鉴定结果的表格, 并以不同的颜色代表信任度不同的鉴定结果, 小于 70.0%的信任度的鉴定结果会以白色显示。

2.3.3 菌株蛋白表达的稳定性实验

将疑似菌落在 37 °C 纯化培养 24、48 和 72 h 后, 分别按照 2.3.2 的方法对菌株进行 MALDI-TOF MS 检测和鉴定, 利用 Saramis Premium 软件将所得的质

谱图与数据库中质谱图进行对比, 比较培养时间对细菌蛋白质谱图鉴定结果的影响。

2.3.4 检测方法的准确性实验

分别将标准菌株大肠埃希菌 ATCC 8739 和溶藻弧菌 ATCC 17749 纯化培养 24 h 后, 按照 2.3.2 的方法进行 MALDI-TOF MS 检测和鉴定, 利用 Saramis Premium 软件将所得的质谱图与数据库中质谱图进行对比, 检测此方法的准确性。

2.3.5 检测方法的重复性实验

将菌株处理后, 在同一样品靶上点样 2 次, 每个点样采集 3 张图谱, 共计 6 张图谱, 得到的图谱分别与其他 5 张图谱进行比较, 检测此方法的重复性。

3 结果与分析

3.1 溶藻弧菌的菌落形态及生化鉴定结果

溶藻弧菌菌落在 TCBS 上呈现为呈黄色、直径 2~3 mm、圆形、凸起、光滑、湿润、边缘整齐, 粘稠, 接种环不易挑取。在科玛嘉弧菌显色培养基上呈现为圆的、扁平的白色菌落, 直径 2~3 mm。于 37 °C 纯化培养 24 h、72 h 后, 微生物 API-20E 生化鉴定试剂盒鉴定实验有明显差异, 培养 24 h 后鉴定结果较好, 鉴定值 97.7%, T 值为 0.47, 但培养 72 h 后, 鉴定值 52.4%, T 值为 0.15, 说明溶藻弧菌的生化特性容易受培养基、保存时间等因素的影响较大, 从而影响生化鉴定结果, 见表 1。

3.2 菌株蛋白表达的稳定性实验

取培养 24 h、48 h 和 72 h 后 3 个不同时间段的溶藻弧菌进行 MALDI-TOF-MS 检测(结果见图 1), 表明不同生长阶段的细菌用 MALDI-TOF-MS 检测得到的蛋白质谱图基本保持不变, 至少 72 h 内, 其蛋白质谱图没有明显的变化。与数据库中相应参考菌株的匹配分值均在 90%以上(鉴定值分别为 94.10%, 93.90%, 92.70%)。本实验中溶藻弧菌在不同生长阶段得到的 MALDI-TOF-MS 蛋白质谱图具有良好的稳定性(见表 2), 说明能够利用 MALDI-TOF-MS 进行检测鉴定。

表 1 溶藻弧菌 API-20E 生化鉴定结果
Table 1 API - 20E biochemical identification results of *Vibrio alginolyticus*

培养时间(h)	生化谱	分类单位	鉴定值%	T 值(T 指数)	不一致的实验
24	4146324	<i>Vibrio alginolyticus</i>	97.7	0.47	INO 0%
72	4146326	<i>Vibrio alginolyticus</i>	52.4	0.15	INO 0%, ARA1%

20150414 s-0001
Shimadzu Biotech Axima Confidence 2.9.3.20110624
%Int. 99 mV 124 mV 146 mV

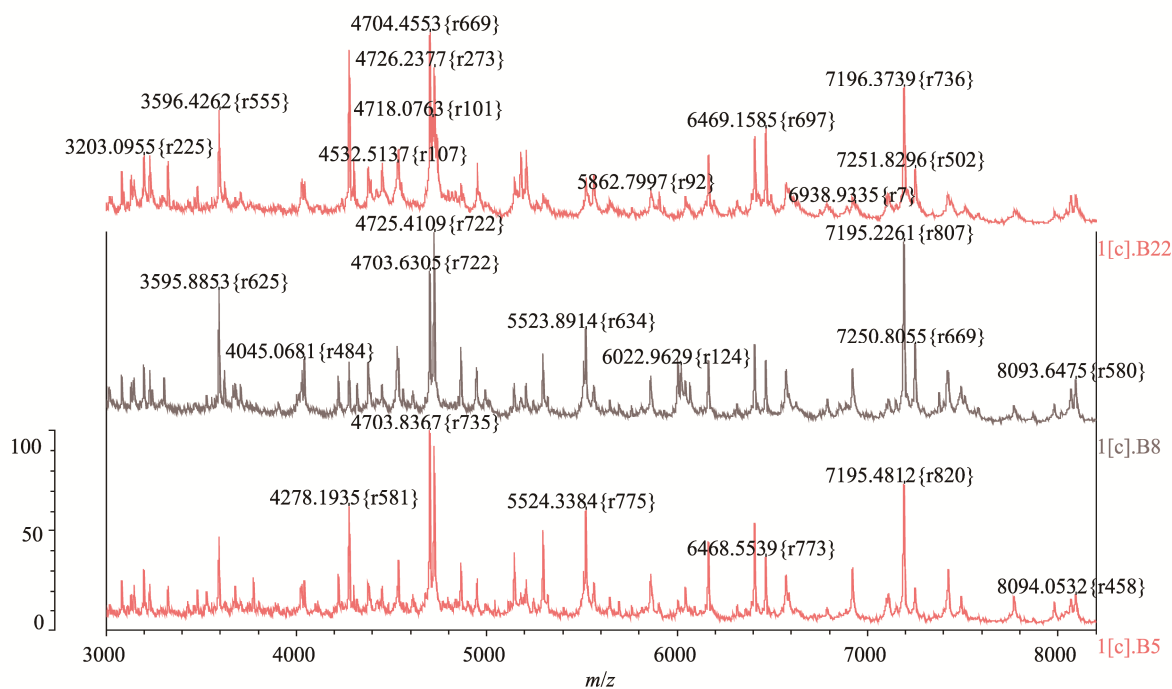


图 1 不同培养时间溶藻弧菌 MALDI-TOF-MS 蛋白质谱图

Fig. 1 MALDI-TOF-MS spectrum of *Vibrio alginolyticus* with different culture time

表 2 不同培养时间溶藻弧菌鉴定值

Table 2 Appraisal values of *Vibrio alginolyticus* with different culture time

培养时间(h)	分类单位	鉴定值%
24	<i>Vibrio alginolyticus</i>	94.10
48	<i>Vibrio alginolyticus</i>	93.90
72	<i>Vibrio alginolyticus</i>	92.70

3.3 检测方法的准确性实验

标准菌株大肠埃希菌 ATCC 8739 和溶藻弧菌 ATCC 17749 纯化培养 24 h 后, 经 MALDI-TOF-MS 检测后, 利用 Saramis Premium 软件将所得的质谱图与数据库中质谱图进行对比, 鉴定值分别为 99.90% 和 97.60%, 说明该检测方法的准确性高。MALDI-TOF MS 对溶藻弧菌的检测鉴定结果与传统方法结果一致, 重复性、稳定性等方面均优于传统生化鉴定方法, 且精确度更高, 检测时间更快速、样品处理更简便。MALDI-TOF-MS 方法操作简单, 鉴定过程时间短, 可成为细菌蛋白质组学研究的重要工具及食品中致病菌快速检测鉴定重要手段。

3.4 检测方法的重复性实验

菌株应用实验方法所获得的 6 张图谱显示出峰位置基本一致(见图 2), 获得的图谱用不同颜色表示。从图中可以看出, 6 张图谱变化很小, 出峰位置比较一致, 说明该方法的重复性良好。但有个别峰的强度略有差别, 可能是因为点样均匀性不一致, 导致采集到的蛋白丰度产生一定影响。说明不同的样品处理方法, 点样方式可能会影响到最终的检测结果, 在后续的实验中对样品处理, 点样等做进一步的规范统一, 从而保证检测方法的重复性。

4 讨论

微生物 API 生化鉴定系统主要基于细菌在生长阶段利用底物产生代谢物的生化反应进行, 其实质是酶促反应, 容易受到不同培养条件的干扰使鉴定结果产生比较大的影响。MALDI-TOF MS 技术已经越来越多地用于食源性致病菌的快速鉴定中^[19-21], 此技术基于细菌蛋白质组表达的比较, 因此更为准确和直接。获取的全细胞蛋白质指纹分析是建立在对

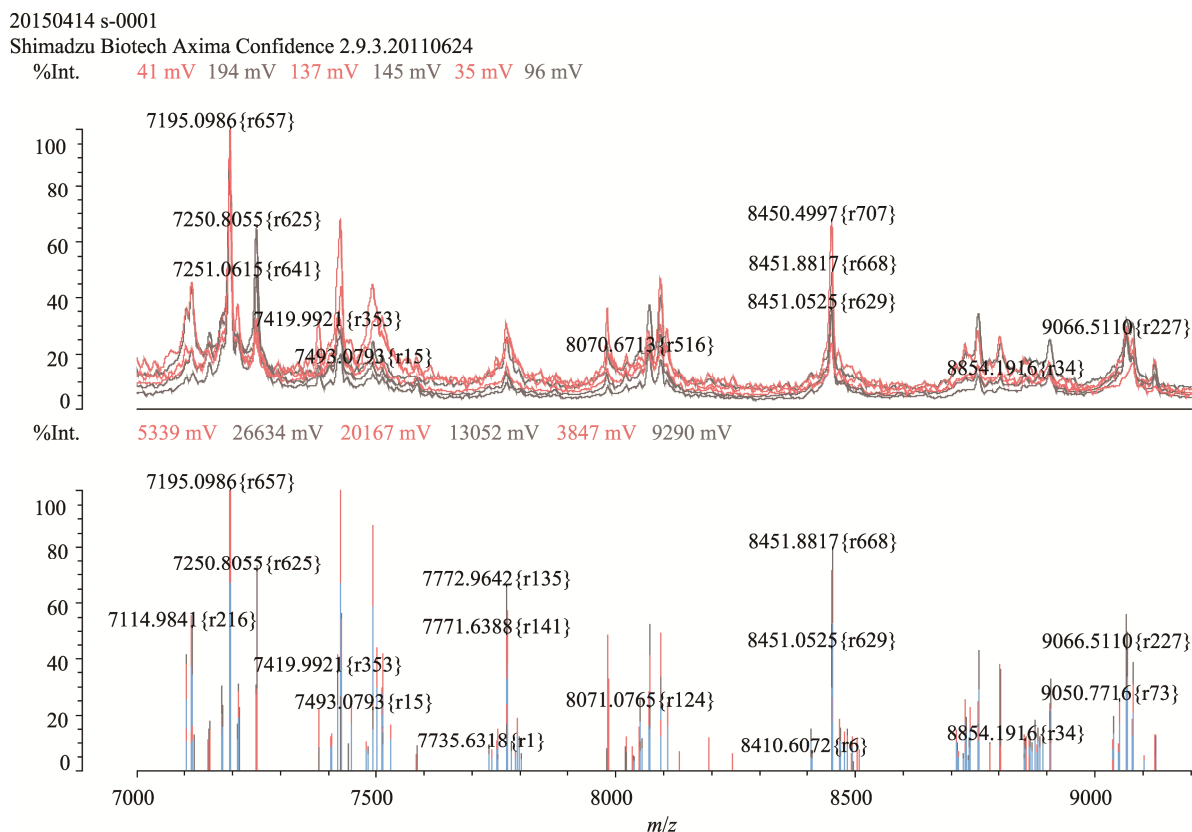


图 2 重复性实验图谱的特征峰重合图

Fig. 2 The characteristic peaks overlap figure of repetitive experimental spectrum

表达稳定的、高丰度的蛋白质测量基础上的,如核糖体蛋白,所以在很宽的条件范围内都是很稳定的。从本实验中我们发现,不同培养时间(72 h)内的溶藻弧菌的蛋白质谱图基本保持不变,说明其蛋白表达在不同生长阶段比较稳定,可以应用 MALDI-TOF-MS 进行检测鉴定。在很少出现代谢物的 2000 ~ 20000 质量范围内,这些高丰度蛋白的谱峰可被观察到^[22]。获得的质谱图与标准参考菌株的 MALDI-TOF-MS 图谱进行比较,从而得出鉴定结果,具有良好的准确性。数据分析方面,主要根据微生物 MALDI 图谱中的特征峰来实现微生物的鉴定。与传统的生化鉴定方法相比, MALDI-TOF-MS 和 SARAMIS 软件分析方法具有较高的稳定性、重复性和准确性,可以快速、准确地鉴定溶藻弧菌,可用于水产品中溶藻弧菌的高通量、低成本的快速检测鉴定。

MALDI Saramis 的局限性主要是数据库的容量。目前此数据库中已经含有常见微生物的近 45000 个指纹参考图谱和 3300 个超级谱库,通过 MALDI-

TOF-MS 得到的图谱需要跟数据库中已有的标准谱图比对匹配,才能给出正确的鉴定结果。因此,数据库的容量是保证快速鉴定及鉴定结果准确的前提。随着全球对外贸易的不断发展,必须不断增加数据库的容量以满足检测鉴定的需要。合适的样品处理方式会得到更多的信息,获得良好的质谱图是进行正确鉴定的前提,必须综合考虑影响质谱图重现性的各种因素,建立更有利于对微生物进行分类鉴定的蛋白质指纹图谱分析方法。

参考文献

- [1] 徐秋芳, 董锐, 费琼, 等. 一起副溶血性弧菌食物中毒的病原学检测与分析[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2013, 33(3): 377-379.
Xu QF, Tong R, Fei Q, *et al.* Pathogen detection and analysis of one case of food poisoning caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. J Shanghai Jiaotong Univ (Med Sci), 2013, 33(3): 377-379.
- [2] 卢俊, 袁冬梅. 一起致病性弧菌引起的食物中毒的调查[J]. 现代预防医学, 2013, 40(7): 1216-1217.

- Lu J, Yang DM. Investigation and analysis of a food poisoning caused by pathogenic vibrio [J]. Mod Prev Med, 2013, 40(7): 1216–1217.
- [3] 张育禾, 徐丽萍, 潘佳, 等. 宁波市感染性腹泻患者致病性弧菌和气单胞菌分布的研究[J]. 浙江预防医学, 2013, 25(8): 26–28.
- Zhang YH, Xu LP, Pan J, et al. A Study on Distribution of Pathogenic *Vibrio* and *Aeromonas* among Infectious Diarrhea Patients in Ningbo [J]. Zhejiang Prev Med, 2013, 25(8): 26–28.
- [4] 江晓, 任春华, 胡超群, 等. 分子鉴定方法研究大亚湾水体弧菌种类变化[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(4): 154–159.
- Jiang X, Ren CH, Hu CQ, et al. On dynamic change of *Vibrio* species in the Daya Bay using molecular identification method [J]. J Trop Oceanogr, 2010, 29(4): 154–159.
- [5] Hormansdorfer S, Wentges H, Neugebauer-Buchler K, et al. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria [J]. Int J Hyg Environ Health, 2000, 203(2): 169–175.
- [6] Jayaprakash NS, Pai S S, Philip R, et al. Isolation of a pathogenic strain of *Vibrio alginolyticus* from necrotic larvae of *Macrobrachium rosenbergii*(de Man) [J]. J Fish Dis, 2006, 29(3): 187–191.
- [7] 蒋学兵, 马聪, 郭建巍, 等. 中国海域海洋细菌的分离与鉴定方法研究[J]. 解放军医学杂志, 2009, (7): 898–900.
- Jiang XB, MaC, Guo JW, et al. Studies on the isolation and identification of marine bacteria in near sea territory of China [J]. Med J Chin PLA, 2009, (7): 898–900.
- [8] 韩善桥, 虞积耀, 姜涛, 等. 海水中致病性弧菌分离及抗菌药物敏感性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2008, (4): 239–241.
- Han SQ, Yu JY, Jiang T, et al. An analysis of antimicrobial susceptibility and isolation of pathogenic *Vibrio* in brine [J]. Chin J Antibiot, 2008, (4): 239–241.
- [9] Larsen J L, Farid A F, Dalsgaard I. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in marine and estuarine bathing areas in Danish coast [J]. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg B, 1981, 173(5): 338–345.
- [10] Ripabelli G, Sammarco ML, Grasso GM, et al. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy [J]. Int J Food Microbiol, 1999, 49: 43–48.
- [11] 封会茹, 游京蓉, 刘玉堂, 等. 溶藻弧菌引起暴发型食物中毒的病原学研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2003, (4): 331–334.
- Feng HR, You JR, Liu YT, et al. Research of one abrupt food poisoning caused by *Vibrio alginolyticus* [J]. Chin J Food Hyg, 2003, (4): 331–334.
- [12] 龚玲芬, 郁祝新. 副溶血弧菌和溶藻弧菌混合污染引起食物中毒的调查[J]. 职业与健康, 2008, (4): 343–344.
- Gong LF, Yu ZX. Investigation of food poisonings induced by the compound contamination of *Vibrio Parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* [J]. Occup Health, 2008, (4): 343–344.
- [13] 夏迪平. 海岛旅游区溶藻弧菌食物中毒的流行病学调查[J]. 浙江预防医学, 2008, 20(12): 6–7.
- Xia ZP. An epidemiological investigation on food poisoning caused by *Vibrio alginolyticus* in island tourism spot [J]. Zhejiang Prev Med, 2008, 20(12): 6–7.
- [14] 侯霄煜. 由溶藻弧菌引起的一起食物中毒[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, (9): 11–23.
- Hou XY. Food Poisonings Induced by *Vibrio alginolyticus* [J]. Chin J Health Labora, 2005, (9): 11–23.
- [15] 郝聚敏, 李晶蕊, 汤学敏, 等. 溶藻弧菌适配子亲和力和测定条件的优化及其特异性研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(32): 19874–19876.
- Hao JM, Li JR, Tang XM, et al. Optimization of affinity determination condition of aptamer for *Vibrio alginolyticus* and specificity analysis [J]. J Anhui Agric Sci, 2011, 39(32): 19874–19876.
- [16] 韩一凡, 莫照兰, 李杰, 等. 溶藻弧菌的 PCR 快速检测方法[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(6): 1237–1240.
- Han YF, Mo ZL, Li J, et al. Rapid detection of *Vibrio alginolyticus* by PCR targeted to the partial of *toxR* gene [J]. Period Ocean Univ Chin, 2009, 39(6): 1237–1240.
- [17] 周凤丽, 简纪常, 吴灶和. 地高辛标记的 DNA 探针制备及其应用于溶藻弧菌的检测[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(4): 459–462.
- Zhou FL, Jian JC, Wu ZH. Preparation and Application of Digoxigenin Labeled DNA Probe for Detection of *Vibrio alginolyticus* [J]. J Huazhong Agric Univ, 2009, 28(4): 459–462.
- [18] 汪笑宇, 周遵春, 关晓燕, 等. 仿刺参养殖环境中溶藻弧菌和灿烂弧菌的 PCR 快速检测[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(3): 125–130.
- Wang XY, Zhou ZC, Guan XY, et al. Rapid PCR detection for *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio Splendidus* in sea cucumber *apostichopus japonicas* and its culturing environment [J]. J Agri Sci Technol, 2010, 12(3): 125–130.
- [19] Du Z, Yang R, Guo Z, et al. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2002, 74(21): 5487–5491.
- [20] Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, et al. Rapid identification and typing of listeria species by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(17): 5402–5407.
- [21] Fagerquist CK, Garbus BR, Miller WG, et al. Rapid

identification of protein biomarkers of *Escherichia coli* 0157: H7 by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry and top down proteomics [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(7): 2717–2725.

- [22] Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, *et al.* Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(1): 58–64.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



谭建锡, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物学。

E-mail: tanjx@hnciq.gov.cn



朱金国, 研究员, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: zhujg@hnciq.gov.cn