

16S rRNA 基因序列、生化鉴定、质谱 3 类方法鉴定常见微生物的结果分析

刘娜, 赵琳娜, 张伟, 骆海朋, 谢冠东, 陈怡文, 余文, 任秀, 崔生辉*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: **目的** 比较 16S rRNA 基因序列、生化鉴定、质谱鉴定 3 类实验方法分析沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌的鉴定结果的异同。**方法** 挑选沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌各 50 株, 分别进行 16S rRNA 基因序列测定、VITEK COMPACT 2 生化鉴定、质谱鉴定 3 类实验, 并比较 3 类实验的鉴定结果。**结果** 3 类实验方法对大部分沙门氏菌鉴定在属水平, 生化鉴定方法对少数血清型鉴定到种水平; 对金黄色葡萄球菌均鉴定到种水平; 16S rRNA 基因序列、生化方法对蜡样芽孢杆菌鉴定到属水平, 质谱鉴定到种水平。**结论** 3 类实验方法对大部分沙门氏菌、所有金黄色葡萄球菌鉴定水平相同, 质谱鉴定蜡样芽孢杆菌的结果更准确, 且质谱鉴定时效性更高。

关键词: 16S rRNA 基因序列; 生化鉴定; 质谱鉴定; 时效; 常见微生物

Analysis of the results identification of common pathogen using 3 methods including 16S rRNA gene sequencing, biochemical reaction identification and mass spectrum identification

LIU Na, ZHAO Lin-Na, ZHANG Wei, LUO Hai-Peng, XIE Guan-Dong, CHEN Yi-Wen, YU Wen, REN Xiu, CUI Sheng-Hui*

(National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To compare the differences and similarities of results of 3 types of experimental methods, including 16S rRNA gene sequence, VITEK COMPACT 2 biochemical reaction and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) on the determination of *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Methods** Fifty strains of *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were selected respectively to be identified by 16S rRNA gene sequence, VITEK COMPACT 2 biochemical identification and MALDI-TOF MS, and the identification results of the 3 kinds of experiments were compared. **Results** Three experimental methods were used to identify most *Salmonella* at the genus level. And VITEK COMPACT 2 biochemical reaction identified a few serotypes at the species level. The results of *Staphylococcus aureus* with the above methods were all on species. *Bacillus cereus* can be on species level with MALDI-TOF MS, but only on genus with the other methods. **Conclusion** The identification results of most *Salmonella* and all *Staphylococcus aureus* are consistent by the 3 methods, but MALDI-TOF MS can identify the

基金项目: 科技部“食品安全关键技术研发”重点专项项目(2017YFC1601400)

Fund: Support by the Special Program for Key Technology in Food Safety of the Ministry of Science and Technology of China (2017YFC1601400)

*通讯作者: 崔生辉, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: cuishenghui@aliyun.com

*Corresponding author: CUI Sheng-Hui, Professor, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China, No.2, Tiantanxili, East District, Beijing 100050, China. E-mail: cuishenghui@aliyun.com

Bacillus cereus accurately. MALDI-TOF MS presents higher timeliness on pathogen identification.

KEY WORDS: 16S rRNA gene sequence; biochemical reaction identification; mass spectrum identification; timeliness; common pathogen

1 引言

食品安全一直是我国重大的公共卫生问题。其中,食源性致病菌污染是影响我国食品安全的重要因素。食源性致病菌在食品生产、加工、储存、运输等各个环节中都可能存在,如何高效鉴定,将风险降至最低,一直是微生物检验工作者努力的方向。目前,致病菌鉴定、识别技术主要有传统的生化方法、基于DNA的扩增、杂交方法、基于蛋白和多糖的免疫学方法^[1],生化方法一直被认为是鉴定菌株的金标准,但是任何一株菌都需要多项生化反应结果相互验证才能最终完成鉴定,即使现在的全自动生化鉴定系统鉴定菌株最少也需要4~5 h,芽孢杆菌和酵母菌鉴定则需要十几个小时,且全自动生化鉴定系统并不能覆盖鉴定工作中的所有微生物。而基于基因测定的鉴定方法,需要提取细菌基因、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增、序列测定、分析等过程,较为繁琐,且该方法往往仅对特定的目的微生物进行快速、准确识别,很难形成一个有效的聚类数据库从而实现对食品中分离到的大量未知微生物进行识别。基于免疫学的鉴定方法,尤其以单克隆抗体为基础的方法最为常见,如免疫金标技术、悬浮芯片技术等。虽然这类方法通常以简单、快速、不依赖于经验著称,但该方法对单克隆抗体的高度依赖大大限制了该方法在未知微生物识别领域的应用,目前还没有形成一个有效的单克隆抗体库以完成对食品中常见微生物的识别与鉴定。因此缩短鉴定时间是提高食源性致病菌检验的重要因素。

近年来,基于细菌特征蛋白指纹图谱的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)对致病菌进行快速识别技术在微生物鉴定领域得到了快速发展^[2,3]。尤其是关于MALDI-TOF MS鉴定微生物与其他传统方法比较的研究,研究表明该方法鉴定微生物具有准确性且时效性^[4-7],因此MALDI-TOF MS鉴定微生物受到研究者的广泛关注。在我国,MALDI-TOF MS研究多应用于临床致病菌鉴定,针对不同类型的致病菌,采用多种方法鉴定且分析比较鉴定结果异同的研究尚不多^[8]。本研究从全国多个地区收集了沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌,且每个种属菌株数量均不少于50株,对每一株菌分别进行16S rRNA基因序列测定、VITEK COMPACT 2生化鉴定、MALDI-TOF MS鉴定,分析比较3类实验鉴定结果,以期对食源性致病

菌的快速鉴定研究奠定基础。

2 材料与方法

2.1 材料

本实验所用菌株来自于全国不同省份不同食品,且每个种属都配以标准菌株作为对照,最终每个种属使用菌株数量均不小于50株。

2.2 试剂与仪器

TSA琼脂培养基(美国BD公司);VITEK COMPACT 2革兰氏阴性菌鉴定卡、VITEK COMPACT 2革兰氏阳性菌鉴定卡、VITEK COMPACT 2芽孢菌鉴定卡(法国梅里埃公司);标准溶液(批号19182,美国Sigma-Aldrich公司);HCCA基质(批号8255344,德国Bruker公司);无水乙醇(分析纯,国药集团试剂有限公司)。

THERMO1384生物安全柜(美国THERMO公司);3730x1核酸测序仪(美国ABI公司);VITEK 2 COMPACT 60全自动微生物分析系统(法国梅里埃公司);PR205050GCN生化培养箱(美国THERMO公司);MALDI-TOF MS(德国Bruker Auto-flexcontrol公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 收集菌株

从全国多个省市收集多种来源的沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌,并且依照地区、样品以及血清型的多样性挑选目的菌株,各个种属挑选50株菌。沙门氏菌菌株信息见表1。金黄色葡萄球菌来自于全国5个省市,从动物、动物粪便、凉拌菜等分离,同时选择标准菌株ATCC29213。蜡样芽孢杆菌来自于全国3个省市,从手抓饼等20种食品中分离,同时选择标准菌株CICC23828、CMCC63511。

2.3.2 16S rRNA基因序列测定鉴定菌株种属

将沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌接种于TSA平板进行培养(37℃,24 h,需氧),挑取新鲜培养的二代菌落提取各个菌株的基因组DNA,对16S rRNA基因序列进行克隆扩增(F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, R: GGY(C/T)TACCTTGTTACGACTT),随后进行连接、转化,培养感受态细菌并提取质粒进行测序(F: TGTAACACGACGGCCAGT, R: CAGGAAACAGCTATGACC),并将每一株的16S rRNA基因序列在NCBI中经BLAST与数据库中序列进行比对,对菌株种属进行鉴定。

表 1 沙门氏菌来源信息
Table 1 Information of *Salmonella*

编号	来源	血清型
1	湖北, 食品	布里丹沙门氏菌
2	CMCC 50719	德尔卑沙门氏菌
3	CICC 21482	肠炎沙门氏菌
4	CMCC 50917	布隆方丹沙门氏菌
5	CMCC 50920	鼠伤寒沙门氏菌
6	CMCC 50107	阿柏丁沙门氏菌
7	CMCC 50200	山夫登堡沙门氏菌
8	CMCC 50730	猪霍乱沙门氏菌
9	CMCC 50735	汤卜逊沙门氏菌
10	CMCC 50748	科特布斯沙门氏菌
11	CMCC 50761	都柏林沙门氏菌
12	CMCC 50774	鸭沙门氏菌
13	CMCC 50854	纽波特沙门氏菌
14	CMCC 50860	基桑加尼沙门氏菌
15	丹麦血清所	病牛沙门氏菌
16	丹麦血清所	婴儿沙门氏菌
17	北京, 食品	明斯特沙门氏菌
18	北京, 食品	莱贡沙门氏菌
19	北京, 食品	乌普萨拉沙门氏菌
20	北京, 食品	密西西比沙门氏菌
21	广西, 食品	汤卜逊沙门氏菌
22	广西, 食品	姆班达卡沙门氏菌
23	广西, 食品	阿柏丁沙门氏菌
24	广西, 食品	斯坦利沙门氏菌
25	广西, 食品	奥拉宁堡沙门氏菌
26	广西, 食品	氟鲁奇沙门氏菌
27	广西, 食品	西非沙门氏菌
28	广西, 食品	法里斯沙门氏菌
29	广西, 食品	弗吉尼亚沙门氏菌
30	广西, 食品	阿马加尔沙门氏菌
31	广西, 食品	茨昂威沙门氏菌
32	广西, 食品	肯塔基沙门氏菌
33	广西, 食品	西翰普顿沙门氏菌
34	WHO 考核样品	蒙得维的亚沙门氏菌

续表 1

编号	来源	血清型
35	WHO 考核样品	胥瓦增格隆沙门氏菌
36	WHO 考核样品	巴拿马沙门氏菌
37	WHO 考核样品	塞罗沙门氏菌
38	WHO 考核样品	哈瓦那沙门氏菌
39	WHO 考核样品	维诺赫雷迪沙门氏菌
40	WHO 考核样品	新加坡沙门氏菌
41	WHO 考核样品	鼠伤寒沙门氏菌
42	食品	圣保罗沙门氏菌
43	食品	鼠伤寒沙门氏菌
44	食品	肠炎沙门氏菌
45	食品	阿贡纳沙门氏菌
46	食品	鸭沙门氏菌
47	食品	圣地亚哥沙门氏菌
48	广西, 食品	火鸡沙门氏菌
49	广西, 食品	格罗斯出浦沙门氏菌
50	食品	沙门氏菌

2.3.3 VITEK COMPACT 2 生化鉴定菌株

将收集获得的沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌接种于 TSA 平板进行培养(37 °C, 24 h, 需氧), 挑取新鲜培养的二代菌落, 进行 VITEK COMPACT 2 菌种鉴定。沙门氏菌依照 GN 卡说明书操作, 金黄色葡萄球菌依照 GP 卡说明书操作, 蜡样芽孢杆菌依照 BCL 卡说明书操作, 对菌株种属进行鉴定。

2.3.4 MALDI-TOF MS 鉴定菌株种属

将沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌接种于 TSA 平板进行培养(37 °C, 24 h, 需氧), 挑取新鲜培养的二代菌落, 涂布于 MALDI-TOF MS 靶板上, 在靶孔加上 HCCA 基质(1 μL/孔), 待基质晾干后, 将靶板放回机器对菌株种属进行鉴定。

2.3.5 VITEK COMPACT 2、16S rRNA 基因序列、MALDI-TOF MS 鉴定比较

将获得的生化鉴定数据、16S rRNA 基因序列测定数据、MALDI-TOF MS 鉴定数据进行对比, 比较 3 类实验对菌株种属鉴定的结果。

3 结果与分析

3.1 16s RNA 基因序列测定结果

在 16s RNA 基因序列测定实验中, 将序列在 NCBI 中经 BLAST 分析比对, 其中 50 株沙门氏菌在属水平鉴定为

沙门氏菌, 同源性为 98%~100%; 50 株金黄色葡萄球菌在种水平鉴定为金黄色葡萄球菌, 同源性为 97%~100%; 50 株蜡样芽孢杆菌在属水平鉴定为蜡样芽孢杆菌, 同源性为 97%~100%, 见表 2。

3.2 VITEK COMPACT 2 生化鉴定结果

在生化鉴定实验中, 50 株沙门氏菌均可鉴定为沙门氏菌, 其中 8 株特殊血清型(肠炎沙门氏菌等)的菌株可以达到种的水平, 剩下 42 株只是达到属的鉴定水平。50 株金黄色葡萄球菌均在种水平鉴定为金黄色葡萄球菌。50 株蜡样芽孢杆菌在属水平鉴定为芽孢杆菌(*Bacillus*), 见表 2。

3.3 MALDI-TOF MS 鉴定结果

在 MALDI-TOF MS 鉴定实验中, 50 株沙门氏菌均可鉴定为沙门氏菌, 只是达到属的鉴定水平。50 株金黄色葡萄球菌均鉴定为金黄色葡萄球菌, 可以达到种的鉴定水平。50 株蜡样芽孢杆菌鉴定为蜡样芽孢杆菌, 可以达到种的鉴定水平, 具体图谱见图 1。

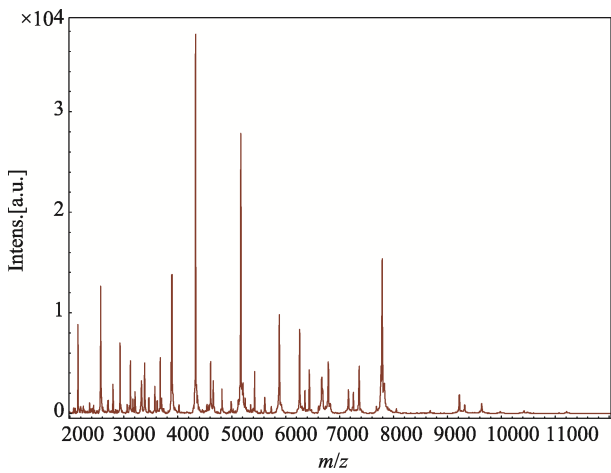


图 1 蜡样芽孢杆菌 MALDI-TOF MS 鉴定图谱
Fig.1 MALDI-TOF MS identification spectrum of *Bacillus cereus*

4 讨 论

食源性致病菌由于增殖等特点, 一般随着时间的延续, 潜在风险也在逐步增高。因此, 提高时效性是微生物

检验的重要瓶颈。本研究从多个省市收集并挑选革兰氏阴性菌(沙门氏菌)、革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)、芽孢杆菌(蜡样芽孢杆菌)3 类常见致病菌, 通过基因序列、VITEK COMPACT 2 生化反应、MALDI-TOF MS 采集峰图 3 个方面对菌株进行鉴定, 并将 3 种实验结果进行对比分析。

沙门氏菌经 16S rRNA 基因序列鉴定, 从基因提取、PCR 扩增、50 株均鉴定到属水平, VITEK COMPACT 2 生化鉴定, 要求新鲜的培养物, 因为长时间放置会影响菌体内某些酶活性从而影响鉴定结果, 除去前期准备和调制菌悬液(浊度要求为 0.5~0.63)时间, 需要 5 h, 且大部分也停留在属水平; MALDI-TOF MS 是基于菌体内蛋白的有无和多少对未知菌株鉴定, 因此对菌株是否新鲜没有要求, 从准备菌株到鉴定结束, 约 3 min, 且 50 株全部为属水平。因此, 16S rRNA 基因序列测定、VITEK COMPACT 2 生化鉴定、MALDI-TOF MS 采集峰图鉴定, 此 3 方面的鉴定水平相同, 但是从时效性来说, MALDI-TOF MS 最高。

金黄色葡萄球菌经 16S rRNA 基因序列鉴定, 实验操作流程同于沙门氏菌, 但是由于金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性菌, 在提取基因时, 额外需要溶菌酶裂解至少 1 h, 50 株均鉴定到种水平; VITEK COMPACT 2 生化鉴定, 菌株要求同于沙门氏菌, 除去前期准备和调制菌悬液(浊度要求为 0.5~0.63)时间, 需要 6 h, 50 株均鉴定到种水平; MALDI-TOF MS 鉴定金黄色葡萄球菌, 从准备菌株到鉴定结束, 约 3 min, 50 株均鉴定到种水平。因此, 16S rRNA 基因序列测定、VITEK COMPACT 2 生化鉴定、MALDI-TOF MS 采集峰图鉴定, 此 3 方面的鉴定水平相同, 但 MALDI-TOF MS 时效性最高。

蜡样芽孢杆菌经 16S rRNA 基因序列鉴定, 实验操作流程同于沙门氏菌, 但是由于蜡样芽孢杆菌为厚壁革兰氏阳性菌, 在提取基因时, 额外需要溶菌酶裂解至少 1.5 h, 50 株均鉴定到属水平; VITEK COMPACT 2 生化分析鉴定, 菌株要求同于沙门氏菌, 除去前期准备和调制菌悬液(浊度要求为 2.0)时间, 需要 12 h, 50 株均鉴定到属水平; 经 MALDI-TOF MS 鉴定蜡样芽孢杆菌, 从准备菌株到鉴定结束, 约 3 min, 50 株均鉴定到种水平。因此, 16S rRNA 基因序列测定、VITEK COMPACT 2 生化鉴定、MALDI-TOF MS 采集峰图鉴定, 从鉴定水平和时效性 2 方面来讲, 均是 MALDI-TOF MS 采集峰图鉴定最高。

表 2 3 类实验鉴定结果比较
Table 2 Comparative analysis of 3 kinds experimental identification results

种属	生化鉴定结果 (属株数, 种株数)	16S rRNA 序列测定结果 (属株数, 种株数)	MALDI-TOF MS 鉴定结果 (属株数, 种株数)
沙门氏菌	42, 8	50, 0	50, 0
金黄色葡萄球菌	50, 50	50, 50	50, 50
蜡样芽孢杆菌	50, 0	50, 0	0, 50

从上述3种类型病原菌的鉴定比较中不难发现,16S rRNA 基因序列测定方法需要收集一定菌量才能进行基因提取,菌量多少均会影响提取效率,从而影响后续实验结果;VITEK COMPACT 2 生化鉴定需要调制一定浊度为菌悬液,否则鉴定结果不准确;而MALDI-TOF MS 鉴定菌株则是将培养物直接涂布于靶板,只要菌量满足 10^5 CFU, 均可以得到准确的鉴定结果,因此对于难培养或菌落过小的微生物, MALDI-TOF MS 鉴定的优势更为突出。其次,由于MALDI-TOF MS 鉴定的靶板有96孔、384孔等,每1个孔为1个鉴定单元。所以MALDI-TOF MS 鉴定还具有高通量的特点。

5 结 论

随着社会对食品安全重视程度的提升,微生物识别与鉴定技术在食品微生物检验中的应用也不断深入、不断发展,致病菌鉴别速度和精度也不断提高。本研究分别挑选革兰氏阴性菌(沙门氏菌)、革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)、芽孢杆菌(蜡样芽孢杆菌)3类常见致病菌,从生化、16S rRNA 基因序列测定、MALDI-TOF MS 3方面对常见的3种菌株进行鉴定,发现MALDI-TOF MS 鉴定水平并不逊于前两者,甚至优于前两者。我国也有对MALDI-TOF MS 鉴定微生物认可的研究^[9-11],甚至也包括对真菌的鉴定研究^[12],另一方面,MALDI-TOF MS 有高通量、操作简便^[13]、速度快等优点^[2,5,14,15],对完善我国食品微生物鉴定检测方法具有重要意义。

参考文献

- [1] 沈萍,陈向东. 微生物学实验(第4版)[M]. 北京:高等教育出版社,2010.
Shen P, Chen XD. Microbiology experiment (Forth Edition) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2010.
- [2] Dieckmann R, Malorny B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(12): 4136-4146.
- [3] Huang CH, Huang L. Rapid species- and subspecies-specific level classification and identification of *Lactobacillus casei* group members using MALDI biotyper combined with clinprotocols [J]. J Dairy Sci, 2018, 101(2): 979-991.
- [4] Lawton SJ, Weis AM, Byrne BA, et al. Comparative analysis of campylobacter isolates from wild birds and chickens using MALDI-TOF MS, biochemical testing, and DNA sequencing [J]. J Veter Diagnost Invest, 2018, 30(3): 354-361.
- [5] Pranada AB, Witt E, Bienia M, et al. Accurate differentiation of mycobacterium chimera from mycobacterium intracellulare by MALDI-TOF MS analysis [J]. J Med Microbiol, 2017, 66(5): 670-677.
- [6] Schlebusch S, Pric GR, Gallagher RL, et al. MALDI-TOF MS meets WGS in a VRE outbreak investigation [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017, 36(3): 495-499.
- [7] Ayeni FA, Andersen C, Lauritsen NN. Comparison of growth on mannitol salt agar, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, VITEK® 2 with partial sequencing of 16S rRNA gene for identification of coagulase-negative staphylococci [J]. Microb Pathogen, 2017, 105: 255-259.
- [8] 李修远,李亚楠,鲁辛辛. MALDI-TOF MS 用于临床微生物检验中常见菌鉴定的应用探讨[J]. 临床检验杂志, 2018, 46(4): 297-303.
Li XY, Li YN, Lu XX. Discussion on the application of MALDI-TOF MS in the identification of common bacteria in clinical microbiological examination [J]. J Clin Lab Sci, 2018, 46(4): 297-303.
- [9] 佚名. MALDI-TOF MS 病原体鉴定质量保证专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(8): 567-570.
Anonymous. Expert consensus on MALDI-TOF MS pathogen identification quality assurance [J]. Chin J Lab Med, 2018, 41(8): 567-570.
- [10] 张雪英,叶红,李爱云,等. 采用MALDI-TOF MS 和全基因组测序鉴定和分析动弯杆菌属及其亲缘关系[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2018, 38(6): 446-450.
Zhang XY, Ye H, Li AY, et al. Identification and analysis of genus acinetobacter and its relatives by MALDI-TOF MS and whole genome sequencing [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2018, 38(6): 446-450.
- [11] 俞静,陈峰,李媛睿,等. 应用MALDI-TOF MS 技术快速鉴定布鲁菌[J]. 国际检验医学, 2018, 39(12): 1443-1447.
Yu J, Chen F, Li YR, et al. Rapidly identification of *Brucella* by MALDI-TOF MS [J]. Int Lab Med, 2018, 39(12): 1443-1447.
- [12] 李颖,徐英春. MALDI-TOF MS 在病原性丝状真菌鉴定中的应用进展[J]. 中国真菌学, 2017, 12(6): 378-381.
Li Y, Xu YC. Application progress of MALDI-TOF MS in identification of pathogenic filamentous fungi [J]. Chin Mycol, 2017, 12(6): 378-381.
- [13] Li Y, Christiaens GCMLP, Gille JJP, et al. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay [J]. Prenat Diagn, 2007, 27(1): 11-17.
- [14] Piseth Seng CA, Rolain JM, et al. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(7): 2182-2194.
- [15] Sparbier K, Weller U, Boogen C. Rapid detection of *Salmonella* sp. by means of a combination of selective enrichment broth and MALDI-TOF MS [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(5): 767-773.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



刘娜, 助理研究员, 主要研究方向为食品微生物检验。
E-mail: xinyiliuna@163.com



崔生辉, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: cuishenghui@aliyun.com