

# 金黄色葡萄球菌基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱的鉴定与聚类分型

陈志敏<sup>1</sup>, 张亦琴<sup>1</sup>, 胡连霞<sup>1</sup>, 陈敏娜<sup>1</sup>, 姜彦芬<sup>1</sup>, 孙晓霞<sup>1</sup>, 杨倩<sup>2</sup>,  
张伟<sup>3</sup>, 王建昌<sup>1\*</sup>

(1. 石家庄海关技术中心, 石家庄 050050; 2. 河北农业大学理工学院, 沧州 061100;  
3. 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001)

**摘要:** **目的** 建立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 spectrometer, MALDI-TOF MS)快速鉴定金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)并自建数据库, 进行聚类分型。**方法** 基于MALDI-TOF MS技术, 对经全自动微生物分析仪(VITEK2 COMPACT)鉴定为*S. aureus*的25株分离株和1株标准菌株(ATCC 25923)进行鉴定。并进一步采集26株*S. aureus*特征性蛋白质指纹图谱, 使用flex Analysis软件进行分析, 汇总成标准图谱并构建本地分离株*S. aureus*的鉴定数据库, 命名为*Staphylococcus aureus*。**结果** 经标准菌株ATCC 25923验证, 自建数据库对*S. aureus*鉴定结果的可信度较设备自带数据库明显提高, 鉴定分值由2.251提高到了2.845。自建数据库进一步对26株*S. aureus*进行聚类分型, 在差异水平100时, 24株不同来源*S. aureus*被聚类成24个分支, 将食品中不同来源分离的*S. aureus*分为24个型。**结论** MALDI-TOF MS作为一种快速、准确、高通量的全新微生物鉴定技术, 实现了对*S. aureus*的特异性快速鉴定与分型, 能够满足公共安全卫生、突发食品安全事件和口岸快速通关方面的需求。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌; 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱; 鉴定; 聚类分型

## Identification and dendrogram of *staphylococcus aureus* by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

CHEN Zhi-Min<sup>1</sup>, ZHANG Yi-Qin<sup>1</sup>, HU Lian-Xia<sup>1</sup>, CHEN Min-Na<sup>1</sup>, JIANG Yan-Fen<sup>1</sup>,  
SUN Xiao-Xia<sup>1</sup>, YANG Qian<sup>2</sup>, ZHANG Wei<sup>3</sup>, WANG Jian-Chang<sup>1\*</sup>

(1. Technology Center of Shijiazhuang Customs, Shijiazhuang 050050, China; 2. College of Science and Engineering, Hebei Agricultural University, Changzhou 061100, China; 3. College of Life Science, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to rapidly identify *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and build a database for clustering. **Methods** Based on the MALDI-TOF MS technique, 25 isolates that were identified as *S. aureus* by automatic microbiology analyzer (VITEK2 COMPACT) and one *S. aureus* standard strain (ATCC 25923) was

基金项目: 河北省科技项目(17275507D, 19226636D)

Fund: Supported by Hebei Science and Technology Project (17275507D, 19226636D)

\*通讯作者: 王建昌, 博士, 高级兽医师, 主要研究方向为食品微生物检测。E-mail: jianchangwang1225@126.com

\*Corresponding author: WANG Jian-Chang, Ph.D, Senior Veterinarian, Technology Center of Shijiazhuang Customs, Shijiazhuang 050051, China. E-mail: jianchangwang1225@126.com

detected. The characteristic protein fingerprints of the 26 strains of *S. aureus* field strains were obtained, analyzed and summarized into standard fingerprints by flex analysis. The self-built database named as *Staphylococcus aureus* was established based on these data. **Results** The identification results of ATCC 25923 showed that the self-built database had high reliability for identification of *S. aureus* comparing to the origin database. The identify score increased from 2.251 to 2.845. On the basis of the information obtained from the self-built database, 26 *S. aureus* strains were clustered. When the difference level was 100, 24 *S. aureus* from different sources were clustered into 24 branches and *S. aureus* from different sources in food was divided into 24 types. **Conclusion** As a fast, accurate and high throughput bacterial identification technology, MALDI-TOF MS can realize the specific identification of *S. aureus*, and meet the rapid requirement of laboratorial identification of *S. aureus* in public safety and health, emergency food safety incidents and rapid customs clearance at ports.

**KEY WORDS:** *Staphylococcus aureus*; matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; identification; dendrogram

## 1 引言

食源性致病菌是危害食品安全和人类健康的主要因素之一,由食源性致病菌感染引发的食品安全问题是全球性公共卫生问题。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*),为革兰氏阳性球菌,广泛存在于自然界中。*S. aureus* 污染食品后,不仅会导致食品腐败变质,而且部分菌株能够产生金黄色葡萄球菌肠毒素引起食物中毒。研究表明,由 *S. aureus* 肠毒素引起的食物中毒位居整个细菌性食物中毒的首位<sup>[1,2]</sup>。目前 *S. aureus* 及肠毒素的传统鉴定方法,全程需时大概 4~8 d,方法繁琐<sup>[3]</sup>。免疫学检测方法尽管目前运用的较为广泛,但对于一些新近出现的肠毒素,还没有商业化的检测系统,而且要求有专门的技术和工具,并且在有些情况下,会产生非特异性结合而造成假阳性的结果<sup>[4]</sup>。分子生物学检测方法在 *S. aureus* 检测方面具有快速、特异性强、灵敏度高、检测限低等优点<sup>[5]</sup>,但 *S. aureus* 产生的毒素和酶的种类甚多,往往不能一步鉴定到 *S. aureus* 型,而且存在方法的技术性要求强、需要特殊设备、判断结果的国际标准化等问题,使得这些分子水平的分型方法不能得到普及<sup>[6]</sup>。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)是近年来新发展起来的一种微生物鉴定和分型技术。其基本原理为:将微生物与等量的基质分别在加样板上,溶剂挥发后形成样品和基质的共晶体,基质从激光中吸收能量使样品解吸,基质与样品之间发生电荷转移使得样品分子电离,经过飞行时间检测器,根据到达检测器的飞行时间不同而被检测,即测定离子的质荷比( $m/z$ )与离子的飞行时间成正比来检测离子的分子量,通过专用软件分析比较,确定出特异性的指纹图谱<sup>[7]</sup>。作为一种新型软电离物质谱技术, MALDI-TOF-MS 能进行蛋白质、脂类、DNA、脂多糖、脂寡糖多肽及其他能被离子化

的分子等多种细菌成分的分析<sup>[8,9]</sup>。

对于多血清型细菌,不同型别的细菌其生理生化特性可能存在明显差异,致病性等方面也可能完全不同<sup>[10]</sup>。金黄色葡萄球菌的致病力强弱主要取决于其产生的毒素和侵袭性酶,目前已发现肠毒素有 A、B、C、D、E、F、G、H、I 和 J 等 10 个毒素血清型。MALDI-TOF MS 技术对于多血清型细菌进行鉴定和分类已经得到了初步应用,闫军等<sup>[11]</sup>基于 MALDI-TOF/TOF 技术快速鉴别了单增李斯特菌的 4 种血清型; MALDI-TOF MS 技术在沙门氏菌血清分型中表现出较好的分型能力<sup>[12]</sup>。近年来, MALDI-TOF MS 主要应用于甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA)的鉴别诊断。Du 等<sup>[13]</sup>和 Majcherczykt 等<sup>[14]</sup>发现 *S. aureus* 的 MRSA 和 MSSA 在 500~3500  $m/z$  范围内的质谱存在差异,并且其质谱图谱聚类系统树准确地被分为 2 组,即 MRSA 和 MSSA。杜宗敏等<sup>[15]</sup>也利用 MALDI-TOF MS 细菌指纹图谱,建立了能高分辨率区分 MRSA 和 MSSA 的 MALDI-TOF MS 分析方法;胡燕燕等<sup>[16]</sup>采用 MALDI-TOF MS 对 MRSA 和 MSSA 进行了快速鉴别。张婷婷等<sup>[17]</sup>验证了 MALDI-TOF MS 对 MRSA 内部分型与多位点序列分析 MLST 具有较好的一致性。

MALDI-TOF-MS 技术以细菌蛋白为检测对象,其鉴定结果的准确性主要取决于数据库中采用的参考菌株蛋白指纹图谱的数量和准确性。因此,参考数据库中的参考菌株种类和数量越多,采集的蛋白指纹图谱越完善,得到的鉴定结果也越准确<sup>[18]</sup>。本文根据 MALDI-TOF MS 软件支持用户自定义数据库的特点,按统一的建库标准,采集食品中分离鉴定的 26 株 *S. aureus* 数据并获得特征指纹图谱,创建质谱图数据库,并进一步开展了本实验室分离的 *S. aureus* 的快速鉴定和聚类分型的初步研究,实现对本地 *S. aureus* 的特异性快速鉴定和可能污染源的追溯。

## 2 材料与方法

### 2.1 菌株、试剂与设备

25 株 *S. aureus* 分离株分离于 2015 年 11 月至 2019 年 1 月, 并经全自动微生物分析仪(VITEK 2 COMPACT)鉴定; 1 株标准菌株(ATCC 25923), 购自美国菌种保藏中心。具体信息见表 1。

表 1 实验用 26 株金黄色葡萄球菌信息一览表

Table 1 Information of 26 *S. aureus* strains used in the study

序号	编号	名称	来源	分离日期
1	B1	金黄色葡萄球菌	ATCC 25923	2019.1.7
2	F1	金黄色葡萄球菌	生切面条	2016.8.14
3	F2	金黄色葡萄球菌	东北大拉皮	2016.8.14
4	F3	金黄色葡萄球菌	凉拌菜	2015.11.21
5	F4	金黄色葡萄球菌	顶鲜大馄饨	2015.11.21
6	F5	金黄色葡萄球菌	北方家常水饺	2015.11.21
7	F6	金黄色葡萄球菌	三文鱼	2015.11.21
8	F7	金黄色葡萄球菌	豆腐丝	2015.11.21
9	F8	金黄色葡萄球菌	大骨灌汤水饺	2015.12.25
10	F9	金黄色葡萄球菌	烧鸡	2015.12.25
11	F10	金黄色葡萄球菌	芝麻酥	2015.12.25
12	F11	金黄色葡萄球菌	三黄鸡	2016.4.9
13	F12	金黄色葡萄球菌	原色开心果	2016.4.9
14	F13	金黄色葡萄球菌	能力验证菌株 A	2016.3.3
15	F14	金黄色葡萄球菌	能力验证菌株 B	2016.3.3
16	F15	金黄色葡萄球菌	猪肉大葱	2016.3.3
17	F16	金黄色葡萄球菌	生切湿面条	2016.9.20
18	F17	金黄色葡萄球菌	火锅茼蒿	2016.9.28
19	F18	金黄色葡萄球菌	手抓饼	2016.9.28
20	F19	金黄色葡萄球菌	原味鸡柳	2016.10.21
21	F20	金黄色葡萄球菌	孜然鸡柳	2016.10.21
22	F21	金黄色葡萄球菌	豆腐丝	2017.2.4
23	F22	金黄色葡萄球菌	素春卷	2017.12.25
24	F23	金黄色葡萄球菌	化妆品能力验证菌株	2018.11.2
25	F24	金黄色葡萄球菌	冰糖腰果	2018.9.28
26	F25	金黄色葡萄球菌	低熔点复合短纤维	2019.1.9

营养肉汤(nutritional broth, NB)、营养琼脂(nutritional agar, NA)、金黄色葡萄球菌的选择性培养基(baird-parker, BP)、无水乙醇(分析纯)(北京陆桥公司); 70%甲酸、三氟乙

酸、乙腈(色谱纯, 美国赛默飞世尔科技有限公司);  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(4-hydroxy- $\alpha$ -cyanocinnamic acid HCCA, HCCA)、细菌实验标准品(bacterial test standard, BTS)(色谱纯, 德国布鲁克公司)。

MALDI-TOF MS 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱仪(德国布鲁克公司); VITEK2 全自动微生物分析仪(法国生物梅里埃公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 菌株的培养

将表 1 中所列菌株, 于 NB 肉汤中 36 °C 培养 24 h, 划线接种于 NA 琼脂和 BP 琼脂上, 36 °C 培养 24 h, BP 琼脂生长的菌落用于观察菌落形态, NA 琼脂上生长的单菌落用于 MALDI-TOF MS 检测。

#### 2.2.2 试剂的配制

标准溶剂的配制: 于 1.5 mL 离心管中, 加入 475  $\mu$ L 色谱级超纯水、25  $\mu$ L 三氟乙酸和 500  $\mu$ L 乙腈, 混均, 配制成 1 mL 标准溶剂。

HCCA 基质溶液的配制: 于装有 HCCA 的旋盖存液管中(最终浓度: 10 mg HCCA/mL), 添加 250  $\mu$ L 标准溶剂, 并且将存液管旋盖拧紧。振摇旋盖存液管并涡旋混均, 在室温下完全溶解 HCCA。瞬时离心于管底部, 备用。

BTS 溶液的配制与分装: 于装有 BTS 固体颗粒的管子中, 加入 50  $\mu$ L 标准溶剂, 用移液枪上下吹打至少 20 次, 使其完全溶解。室温放置 BTS 溶液 5 min, 然后用移液枪上下吹打混合至少 20 次。离心 2 min(转速 13000 r/min), 分装 5  $\mu$ L/管, 留 1 支 BTS 溶液备用, 其余分装液于 -20 °C 冰箱保存。

#### 2.2.3 样品制备

BTS 样本制备: 将 1  $\mu$ L 分装液 BTS 溶液滴于清洗干净的 MALDI-TOF MS 靶板指定的验证靶位。室温下晾干后, 将 1  $\mu$ L HCCA 基质溶液滴数于样本上, 作为质量控制。室温下自然晾干(约 10 min)后 MALDI-TOF MS 质谱仪测量<sup>[19,20]</sup>。

提取法制备样本: 于营养平板上刮取 *S. aureus* 新鲜纯培养物 5 mg, 加入 300  $\mu$ L 灭菌水混匀, 再加入 900  $\mu$ L 无水乙醇混匀。静置 15 min 后, 离心 2 min(13000 r/min), 弃上清。加入 50  $\mu$ L 70%甲酸, 混匀, 再加入 50  $\mu$ L 纯乙腈, 混匀。静置 15 min 后, 离心 2 min(13000 r/min)吸出上清液于一新的离心管中。取 1  $\mu$ L 上清液点于 MALDI-TOF MS 靶板的相应靶点上, 自然晾干后, 用 1  $\mu$ L HCCA 基质溶液覆盖, 室温下自然晾干(约 10 min)后进行质谱测量<sup>[19,20]</sup>。

#### 2.2.4 MALDI-TOF MS 检测

参数设置: 线性模式 L; 正离子模式 P 采集模式; 加速电压 19.43 kV, 延迟提取电压 17.63 kV, 聚焦电压 8.20 kV, 质量范围 2000~20000 Da。激光频率 500 Hz。每次实验前用标准品溶液进行质谱仪的质量校正。将靶板送入 MALDI-TOF MS 进样仓, 用 Flex Control 系统采集标准品

及样品的质谱图。

结果判断: 鉴定结果给出数据库中与鉴定菌种最为匹配的 10 个菌株种属, 并给出相对应的分数。匹配分数在 2.300~3.000 之间, 标记为(+++), 表示菌种鉴定的可信度很高, 为种水平鉴定; 在 2.000~2.299 之间, 标记为(++), 表示保守的菌属鉴定或可能的菌种鉴定, 为种水平鉴定; 在 1.700~1.999 之间, 标记为(+), 表示可能的菌属鉴定, 为属水平鉴定; 在 0.000~1.699 之间, 标记为(-), 表示不可信的鉴定。

### 2.2.5 建立数据库

使用 BioTyper 软件, 分别调入所采集的 26 株 *S. aureus* 的质谱图, 将此 26 个质谱图汇总生成整合图谱, 并对所得的图谱进行分析统一化, 该图谱即为 *S. aureus* 数据库的标准图谱, 并建成包含 26 株 *S. aureus* 信息的独立的本地鉴定数据库。

### 2.2.6 自建库验证

运用 MALDI Biotyper 软件, 对标准菌株 ATCC 25923 采集的图谱通过原有库和自建库进行比对分析, 对鉴定结果的可信度进行比较。使用 flex Analysis 分析软件对特征离子峰进行分析。

### 2.2.7 聚类分析

在数据库信息的基础上, 使用 BioTyper 软件, 进一步对 26 株 *S. aureus* 进行聚类分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 *S. aureus* MALDI-TOF MS 鉴定数据库的建立

采用离线微生物鉴定软件 MALDI Biotyper 进行质量图谱分析, 所有 26 株均报告为 *S. aureus*, 其中 F1、F2、F6、F9、F11、F14、F17、F21、F23、F24、F25, 11 株菌匹配分数大于 2.300(+++)说明鉴定到可信的种水平; B1、F3、F4、F5、F7、F8、F10、F12、F13、F15、F16、F18、F19、F20、F22, 15 株菌匹配分数在 2.000~2.300(++)-之间, 说明鉴定到可信的属水平或可能的种水平。

使用 flex Analysis 对 26 株 *S. aureus* 的主要离子峰进行分析, 离子峰主要集中在 2000~10000 Da 范围内, 如图 1 所示。质核比  $m/z$ (横坐标) 主要在 2487.978, 3103.625, 3445.477, 4307.520, 4816.011, 5034.164, 5527.865, 5934.277, 6575.428, 6890.951, 7171.094, 7733.457, 8894.699, 9630.491 共 14 处相应的峰强度增强, 其主要离子峰重复性好, 图谱质量好。进一步对供试 25 株 *S. aureus* 本地分离株和 1 株标准菌株 ATCC 25923 进行图谱采集与汇总, 建立标准图谱, 最终建成包含 26 株 *S. aureus* 信息的独立鉴定数据库, 标注为 *Staphylococcus aureus* 自建数据库。

### 3.2 自建库验证

#### 3.2.1 质量图谱分析

使用 flex Analysis 软件对标准菌株 ATCC 25923 的质

谱图进行分析, 如图 2 所示, 2000~10000 Da 范围内其主要特征峰(质荷比,  $m/z$ )为 2369.200, 3007.851, 3445.630, 3876.981, 4307.483, 4575.414, 5034.374, 5509.163, 5876.168, 6356.384, 6891.490, 7172.301, 7142.431, 7734.946, 9150.273, 9631.004 共 16 处峰强度增强。

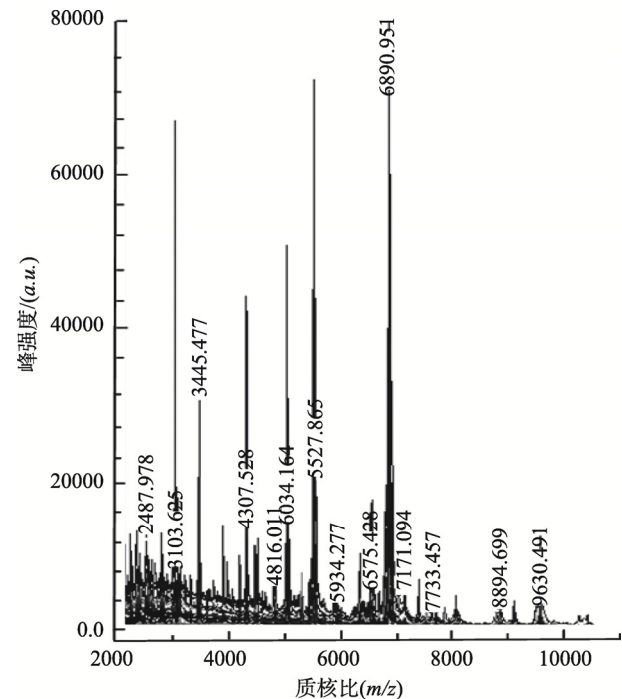


图 1 26 株 *S. aureus* 特征峰的重复性

Fig.1 Repeatability of 26 strains of *S. aureus* characteristic peaks

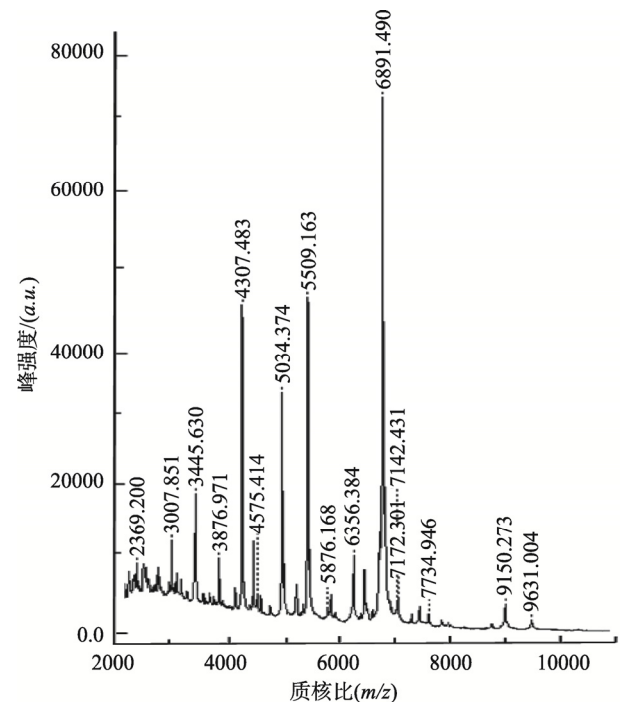


图 2 *S. aureus* 标准株 ATCC 25923 的标准图谱

Fig.2 Standard atlas of *S. aureus* ATCC 25923

### 3.2.2 鉴定可信度比较

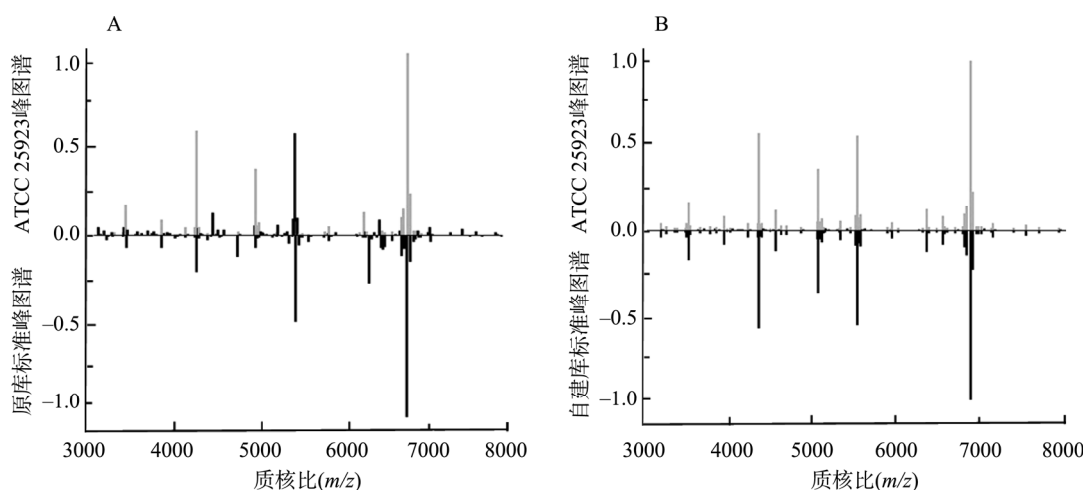
对 ATCC 25923 的特征峰与原数据库和自建数据库中 *S. aureus* 的特征峰进行比对, 其中纵坐标 0.0 以下为数据库中 *S. aureus* 标准图谱, 以上为 ATCC 25923 的特征峰图谱, 如图 3A 所示。在原数据库中, ATCC 25923 的鉴定分值为 2.251, 并且同原数据库标准谱图相比, ATCC 25923 具有较多的蛋白质峰(纵坐标 0.0 以上深色柱为多出标准图谱的蛋白质峰), 如图 3B 所示。在自建数据库中, ATCC 25923 的鉴定分值为 2.845, 并且同自建数据库标准谱图相比, 自建库中标准图谱特征蛋白质峰增加, 深色柱减少, ATCC 25923 蛋白质峰同标准图谱一致性明显增强。上述结果表明, 在鉴定本地区 *S. aureus* 时用本地菌株建立的自建数据

库比仪器自带数据库的鉴定可信度高。

### 3.3 聚类分析

差异水平代表彼此间的亲缘关系, 其值在 0 到 1000 之间。差异水平值越小, 表示亲缘关系越近; 差异水平值越大, 表明亲缘关系越远。26 株 *S. aureus* 聚类分型鉴定树状图如图 4 所示。

在差异水平为 800 时, MALDI-TOF MS 将 26 株 *S. aureus* 聚类分成 I 和 II 型 2 个型。来源为北方家常水饺的 F5/大骨灌汤水饺的 F8、原色开心果的 F12、能力验证菌株 A F13、生切湿面条的 F16 和素春卷的 F22 被聚类到 I 型, 与 II 型其他 *S. aureus* 菌株区分开来, I 型和 II 型分子水平的差异大, 亲缘关系也最远。



注: A: ATCC 25923 特征峰与原数据库标准谱图对比图; B: ATCC 25923 特征峰与自建数据库中标准图谱对比图。

图 3 *S. aureus* ATCC 25923 标准图谱的特征峰一致性比对

Fig.3 Comparison of consistency of characteristic peak of *S. aureus* ATCC 25923 standard atlas

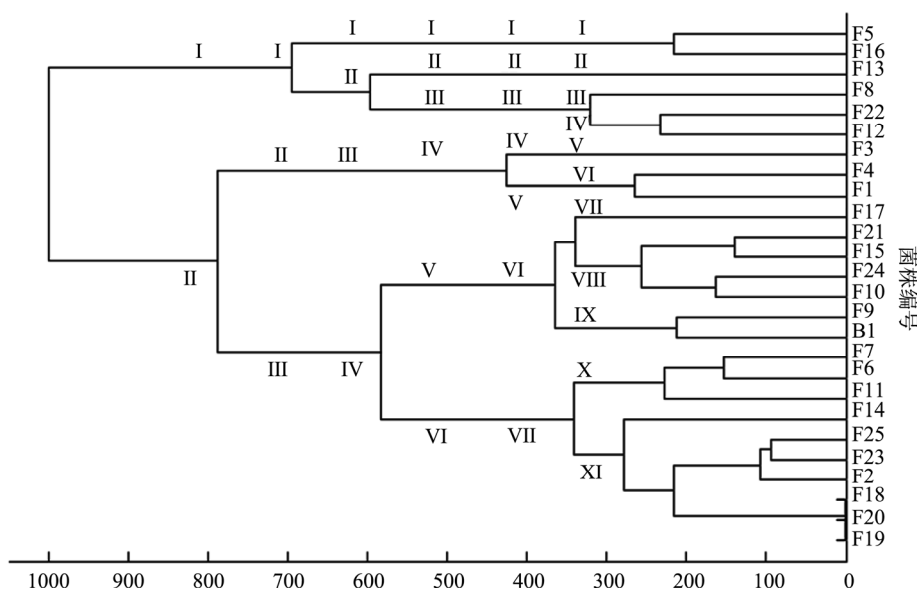


图 4 26 株 *S. aureus* MALDI-TOF MS 聚类树状图

Fig.4 Dendrogram of 26 *S. aureus* strains by MALDI-TOF MS

在差异水平为 700 时, 将 26 株 *S. aureus* 聚类分成 I、II 和 III 型 3 个型, 来源为生切面条的 F1、凉拌菜的 F3 和顶鲜大馄饨的 F4 从 II 型聚类成 1 个分支, 说明这 3 株 *S. aureus* 菌株与 II 型其他 *S. aureus* 存在差异。

在差异水平为 600 时, 将 26 株 *S. aureus* 聚类分成 I、II、III 和 IV 型 4 个型。来源为北方家常水饺的 F5 和生切湿面条的 F16, 从 I 型聚类成 1 个分支, 说明这 2 株 *S. aureus* 菌株与 I 型其他 *S. aureus* 存在差异。

在差异水平为 500 时, 将 26 株 *S. aureus* 聚类分成 I、II、III、IV、V 和 VI 型 6 个型, 来源为能力验证菌株 A F13 单独聚类成 1 个分支, 表明该菌株和原 II 型其他菌株存在差异; 来源为烧鸡的 F9、芝麻酥的 F10、猪肉大葱的 F15、火锅荟萃的 F17、豆腐丝的 F21 和冰糖腰果的 F24 与标准菌株 ATCC 25923 B1, 聚类成 1 个分支, 说明这 6 株 *S. aureus* 菌株亲缘关系较近。

在差异水平为 400 时, 将 26 株 *S. aureus* 聚类分成 I、II、III、IV、V、VI 和 VII 型 7 个型, 来源为凉拌菜的 F3 聚类成 1 个分支, 说明该分离株与生切面条的 F1 和顶鲜大馄饨的 F4 存在差异。

在差异水平为 300 时, 将 26 株 *S. aureus* 聚类分成 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X 和 XI 型 11 个型, 来源为烧鸡的分离株 F9 与标准菌株 ATCC 25923 B1 仍聚类成 1 个分支, 而火锅荟萃的 F17 分离株单独聚类成一个分支。

在差异水平为 100 时, 将 26 株 *S. aureus* 聚类分成 25 个型, 来源为化妆品能力验证菌株 F23 和低熔点复合短纤维 F25 还处在同 1 分支上, 表示它们亲缘关系非常近。其余 24 株不同食品来源分离的 *S. aureus* 被聚类分布于 24 个型。

## 4 结 论

目前 MALDI-TOF MS 在微生物鉴定中还存在一定的局限性, 主要是微生物蛋白指纹图谱数据库不够完善, 一些罕见菌种或新型细菌的图谱尚未被现有数据库收录, 从而导致鉴定困难<sup>[21]</sup>。而 MALDI-TOF MS 鉴定结果的准确性主要取决于数据库中采用的参考菌株的指纹图谱的准确性。因此, 数据库中的参考菌株种类和数量越多, 指纹图谱越完善, 得到的鉴定结果也越准确<sup>[22]</sup>。本研究对于金黄色葡萄球菌, 采用甲酸萃取法制备样品, 进行采集菌株指纹图谱, *S. aureus* 标准菌株 ATCC 25923 鉴定分值由 2.251 提高到 2.845, 由可能的菌种鉴定提高到可信度很高的菌种鉴定水平。本研究中建立的自建库 *Staphylococcus aureus* 对于本地食源性 *S. aureus* 分离株的快速有效的种属鉴定, 进而进行分型分析具有重要意义。

本文采用 MALDI-TOF MS 对不同来源的 26 株 *S. aureus* 进行了质谱鉴定, 同样确认了 MALDI-TOF MS 对 *S. aureus* 具有良好的鉴定效果。同时, 采集并获得了 26 株不同来源的 *S. aureus* 的特征指纹图谱, 自建质谱图数据库,

进一步使用 *S. aureus* 标准菌株 ATCC 25923 对自建数据库进行了验证, 并对 25 株本实验室分离的不同来源的分离株进行了聚类分析, 构建了系统树。通过聚类分析, 实现了对 26 株 *S. aureus* 在差异水平不同时的不同分型, 通过分析不同菌株之间的亲缘关系, 可以实现追溯不同来源 *S. aureus* 可能的污染源。在差异水平为 800 时, MALDI-TOF MS 将 26 株 *S. aureus* 聚类分成 2 个型。不同菌株内在分子水平的差异可以引起外在蛋白表达的不同, 因此可以认为上述两个型菌株之间的亲缘关系相对最远。而在差异水平为 100 时, 26 株来源不同的 *S. aureus* 被聚类分成 25 个型。本研究表明, MALDI-TOF MS 能够对食品中的 *S. aureus* 进行快速鉴定分型, 对于预防和控制 *S. aureus* 引起的食物中毒将具有重要意义。

## 参考文献

- [1] 唐俊妮. 金黄色葡萄球菌耐热核酸酶相关基因的功能与特征分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.  
Tang JN. Function and characterization of thermostable nuclease related genes in *Staphylococcus aureus* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007.
- [2] 徐振波, 刘晓晨, 李琳, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素在食源性微生物中的研究进展[J]. 现代食品科技, 2013, (9): 2317-2324.  
Xu ZB, Liu XC, Li L, et al. Development of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food-borne bacteria [J]. Mod Food Sci Technol, 2013, (9): 2317-2324.
- [3] GB 4789.10-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验[S].  
GB 4789.10-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-Testing method for *Staphylococcus aureus* [S].
- [4] 杨蓉生, 王小玲, 唐俊妮. 食品中金黄色葡萄球菌检测方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 459-461.  
Yang RS, Wang XL, Tang JN. Research progress on detection methods of *Staphylococcus aureus* in food [J]. Sci Technol Food Ind, 2011, 32(5): 459-461.
- [5] Barski P, Piechowicz L, Janusz G, et al. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR [J]. Moll Cell Probe, 1997, 10(6): 471-475.
- [6] 李毅. 金黄色葡萄球菌及其肠毒素研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, (4): 392-395.  
Li Y. Advancement in researches of *Staphylococcus aureus* and its enterotoxin [J]. Chin J Health Lab Technol, 2004, (4): 392-395.
- [7] Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry [J]. Mass Spectrom Rev, 2001, 20(4): 157-171.
- [8] 龚艳清, 陈信忠, 杨俊萍. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在李斯特菌检测和鉴定中的应用[J]. 食品科学, 2012, 33(6): 209-214.  
Gong YQ, Chen XZ, Yang JP. Detection and identification of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Food Sci, 2012, 33(6): 209-214.
- [9] 林豪芸. MALDI-TOF MS 技术快速鉴定病原菌的应用研究[D]. 广州: 暨南大学, 2015.

- Lin HY. Application of MALDI-TOF MS in rapid identification of pathogens [D]. Guangzhou: Jinan University, 2015.
- [10] 陈信忠, 龚艳清, 郭书林. MALDI-TOF-MS 在病原微生物鉴定中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2012, (6): 43-48.
- Chen XZ, Gong YQ, Gou SL. Progress in application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in identification of pathogenic microorganism [J]. Biotechnol Bull, 2012, (6): 43-48.
- [11] 闫军, 王娉, 赵晓美, 等. 基于 MALDI-TOF/TOF 技术的单增李斯特菌四种血清型的快速鉴别[J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(10): 138-145.
- Yan J, Wang P, Zhao XM, *et al.* Rapid identification of four serotypes of *Listeria monocytogenes* based on MALDI-TOF/Tof technology [J]. J Agric Sci Techol, 2018, 20(10): 138-145.
- [12] 吕佳, 卢行安, 刘淑艳, 等. MALDI-TOF MS 鉴定 2008 年辽宁省食源性性疾病监测系统检出的沙门菌的初步研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, (1): 61-69.
- Lv J, Lu XA, Liu SY, *et al.* Discrimination of *Salmonella* isolated from the foodborne disease monitoring system of Liaoning province in 2008 by MALDI-TOF-MS [J]. Chin J Food Hyg, 2011, (1): 61-69.
- [13] Du ZM, Yang RF, Guo ZB, *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.
- [14] Majchercayk PA, Mckenna T, Moreillon P, *et al.* The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Fems Microbiol Lett, 2010, 255(2): 233-239.
- [15] 杜宗敏, 杨瑞馥, 郭兆彪, 等. 金黄色葡萄球菌及其甲氧苯青霉素耐药性的 MALDI-TOF MS 鉴定[J]. 分析测试学报, 2003, 22(1): 62-67.
- Du ZM, Yang RF, Guo ZB, *et al.* Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2003, 22(1): 62-67.
- [16] 胡燕燕, 蔡加昌, 周宏伟, 等. 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱仪快速鉴别甲氧西林耐药和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2015, (1): 42-45.
- Hu YY, Cai JC, Zhou HW, *et al.* Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2015, (1): 42-45.
- [17] 张婷婷, 于静波, 薛文成, 等. 质谱分析仪对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分子分型的应用研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, (4): 730-732.
- Zhang TT, Yu JB, Xue WC, *et al.* Application value of MALDI-TOF MS in typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Chin J Nosocomiol, 2016, (4): 730-732.
- [18] 杨伟玮, 汪曦, 孙传强. 数据处理和分析方法在 MALDI-TOF MS 鉴定微生物中的应用[J]. 中国微生物学杂志, 2018, 30(3): 368-373.
- Yang WW, Wang Y, Sun CQ. Application of data processing and analytical methods in MALDI-TOF MS identification of microorganisms [J]. Chin J Microecol, 2018, 30(3): 368-373.
- [19] 汤旭, 肖迪, 张慧芳, 等. MALDI-TOF-MS 鉴定布鲁氏菌方法建立和评价[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(9): 772-778.
- Tang X, Xiao D, Zhang HF, *et al.* Establishment and evaluation of identification of *Brucella* by MALDI-TOF-MS [J]. Chin J Zoono, 2016, 32(9): 772-778.
- [20] 曹赓凡, 宋召, 周凤丽, 等. 两种菌体前处理方法对 MALDI-TOF MS 鉴定临床分离菌效果的影响[J]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2018, 6(1): 27-31.
- Cao WF, Song Z, Zhou FL, *et al.* Effect of two kinds of bacterial pretreatment methods on the clinical isolate strains identification by MALDI-TOF MS [J]. Chin J Clin Lab Manag (Elect Ed), 2018, 6(1): 27-31.
- [21] 戴颖欣, 李敏. MALDI-TOF MS 在临床微生物检验中的应用[J]. 检验医学, 2015, 30(2): 102-107.
- Dai YX, Li M. Application of MALDI-TOF MS technology in clinical microbial determination [J]. Lab Med, 2015, 30(2): 102-107.
- [22] 张丽荣, 黄辉涛, 方艳梅, 等. 霍乱弧菌基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术谱库的构建[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(2): 172-175.
- Zhang LR, Huang HT, Fang YM, *et al.* Establishment of mass spectrometry database of *V. cholerae* by matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2018, 28(2): 172-175.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



陈志敏, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。

E-mail: sxx7@163.com



王建昌, 博士, 高级兽医师, 主要研究方向为食品微生物检测。

E-mail: 18632188561@163.com