

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法对环境中芽孢杆菌的鉴定及溯源

吴丽娜¹, 王 伟², 王 萍³, 殷培军¹, 李正义¹, 黄小华⁴, 张秋艳¹, 唐 静¹,
徐 玮¹, 姜英辉¹, 吕 宁¹, 贾俊涛^{1*}

(1. 青岛海关技术中心, 青岛 266100; 2. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100022;
3. 青岛海关风险防控分局, 青岛 266001; 4. 青岛海关, 青岛 266000)

摘 要: 目的 应用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)对芽孢杆菌进行快速鉴定及聚类分析, 研究 MALDI-TOF MS 对芽孢杆菌溯源的可行性。**方法** 实验菌株利用甲酸提取法提取蛋白, 应用 MALDI-TOF MS 对 22 株环境分离菌株和枯草芽孢杆菌标准菌株 CGMCC(B)1.1086 进行鉴定。采集 22 株实验菌株的蛋白质指纹图谱, 使用 SARAMIS 软件进行聚类分析。**结果** 枯草芽孢杆菌标准菌株 CGMCC(B)1.1086 的鉴定结果可信度为 99.9%。22 株环境菌均为芽孢杆菌, 其中, 6 株菌鉴定到属水平, 16 株菌鉴定到种水平。在相似水平为 80%的条件下, 22 株芽孢杆菌分为 22 个分支。**结论** 应用 MALDI-TOF MS 对芽孢杆菌进行快速鉴定与分型, 对于芽孢杆菌溯源有重要意义, 能够满足环境中芽孢杆菌检测及溯源的需求。

关键词: 芽孢杆菌; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法; 快速鉴定; 聚类分型

Identification and traceability of *Bacillus* in the environment by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

WU Li-Na¹, WANG Wei², WANG Ping³, YIN Pei-Jun¹, LI Zheng-Yi¹, HUANG Xiao-Hua⁴,
ZHANG Qiu-Yan¹, TANG Jing¹, XU Wei¹, JIANG Ying-Hui¹, LV Ning¹, JIA Jun-Tao^{1*}

(1. Technology Center of Qingdao Customs, Qingdao 266100, China; 2. National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China; 3. Qingdao Customs Risk Prevention and Control Branch, Qingdao 266001, China;
4. Qingdao Customs, Qingdao 266000, China)

ABSTRACT: Objective To use the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to rapidly identify and cluster *Bacillus*, and study the feasibility of MALDI-TOF MS for traceability of *Bacillus*. **Methods** The experimental strains were extracted by formic acid extraction method, and 22 environmental isolates and *Bacillus subtilis* standard strain CGMCC(B)1.1086 were identified by MALDI-TOF MS. The protein fingerprints of 22 experimental strains were collected, and the SARAMIS software was used for cluster analysis. **Results** The identification result of the standard strain of *Bacillus subtilis* CGMCC(B)1.1086 had a

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1605205)、国家质检总局项目(2012IK305)、青岛海关科研项目(QK201920)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1605205), the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine Project (2012IK305), and the Science and Research Projects of Qingdao Customs (QK201920)

***通信作者:** 贾俊涛, 研究员, 主要研究方向为微生物检测。E-mail: jiajt@tom.com

***Corresponding author:** JIA Jun-Tao, Professor, Technology Center of Qingdao Customs, No.83 Xinyue Road, High-tech District, Qingdao City, Shandong 266100, China. E-mail: jiajt@tom.com

reliability of 99.9%. The 22 environmental bacteria identified were all *Bacillus*, of which 6 strains were identified to the genus level and 16 strains were identified to the species level. At a similar level of 80%, 22 strains of *Bacillus* were divided into 22 branches. **Conclusion** The rapid identification and typing of *Bacillus* by MALDI-TOF MS is of great significance for the traceability of *Bacillus*, and can meet the needs of detection and traceability of *Bacillus* in the environment.

KEY WORDS: *Bacillus*; matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; rapid identification; cluster typing

0 引言

芽孢杆菌是一种杆状需氧的革兰氏阳性菌,可广泛见于各种自然环境,能够形成孢子,而孢子的形成不会因暴露在空气中而受到抑制,芽孢杆菌产生的孢子对外界不利条件具有抗性^[1-2]。大多数芽孢杆菌对人体无害,但某些菌如蜡样芽孢杆菌可导致食物中毒,炭疽杆菌能引起羊、牛、马等动物及人类的炭疽病^[3-4]。此外,在食品加工贮藏过程中,芽孢杆菌也会对乳制品品质产生不利影响,芽孢杆菌产生的芽孢可以在乳制品储藏过程中激活成营养体,恢复其生长繁殖的能力,造成乳制品细菌污染,芽孢杆菌产生的蛋白酶和脂肪酶等物质,也能够造成蛋白质和脂肪水解,导致乳制品出现凝胶、脂肪上浮、酸败变质等各种品质问题^[5]。酸土脂环酸芽孢杆菌也会对果汁品质产生不利影响,其自身代谢产生的物质会降低产品品质,缩短产品贮藏时间,从而影响风味^[6]。目前,常用的微生物鉴定方法有生化鉴定法^[7]、免疫学方法^[8]、分子生物学方法^[9]等,常规的培养基培养和生化鉴定检测周期长,免疫学方法需要大量的抗原,且仅针对少数微生物而开发,分子生物学方法对技术性要求较强^[10]。因此,创建一种快速且便捷的鉴定方法对于微生物的鉴定、溯源与控制传播十分重要。

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)现已成为微生物鉴定分型等的有效检测技术。在MALDI-TOF MS检测过程中,使用完整细胞或细胞提取物来识别微生物。MALDI-TOF MS可用于多种用途,且容易掌握,例如用于鉴定微生物种属和菌株分型^[11-12]、鉴定细菌核糖体蛋白质标志物^[13]、水源性和食源性病原体的检测^[14]、检测抗生素耐药性^[15]和血液和泌尿道病原体检测^[16-17]等。MALDI-TOF MS是一种新型的软电离生物质谱技术,样品是通过混合或涂覆一种具有能量吸收性的基质来制备的,当基质在干燥结晶时,夹在基质中的样品也会形成共结晶,基质中的样品用激光束电离,基质分子吸收能量与样品解吸附并使样品电离,离子在固定电位下加速,根据不同的质荷比相互分离,随后离子进入飞行时间检测器,根据到达飞行时间检测器时间的不同,形成肽指纹图谱,与数据库比对后获得鉴定

的结果^[18]。在图谱中,横坐标表示离子的质荷比,纵坐标表示置信水平,数值越接近100,表示越接近特定菌的典型模式。微生物中蛋白质含量较高,常被用于细菌种属的鉴定,MALDI-TOF MS是通过分析实验菌株蛋白质峰图与数据库中菌的蛋白质峰图之间的匹配度,进而得到鉴定结果^[19],鉴定结果准确度高、重现性好,只需几分钟即可获得鉴定结果^[20]。MALDI-TOF MS可以鉴定多种微生物,如哈维弧菌、肺炎克雷伯氏菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌以及铜绿假单胞菌等^[21-26]。

MALDI-TOF MS在进行微生物种属鉴定时具有操作简单、快速、高通量、准确度高和成本低等优点,非常适合病原微生物诊断和监测。目前来说,MALDI-TOF MS在使用过程中还存在一定的缺陷,部分原因可能是由于微生物蛋白指纹图谱的数据库不够完善,一些少见或变异菌种的蛋白图谱尚未被目前的数据库所收录,从而导致某些细菌得不到鉴定结果或结果不够精确^[27]。而MALDI-TOF MS的鉴定结果主要取决于数据库中存在的指纹图谱的丰富性和准确性。因此,数据库中菌株的种类和数量越丰富,指纹图谱越完善,得到的鉴定结果也越可靠^[28]。此外,在进行分析时,实验结果也会受到一些其他因素的影响,如培养时间、前处理方法、培养基种类等^[22,25,28],有研究表明,甲酸乙腈提取法实验结果要优于直接涂抹法^[29]。但MALDI-TOF MS所具有的优势也是其他鉴定方法无法取代的,如实验操作简单、所需试剂少、检测时间短、结果以较直观的图谱形式呈现、数据可与数据库自动匹配等。且MALDI-TOF MS对纯培养的微生物鉴定已经比较成熟,对常见病原菌鉴定的准确率高达95%以上,但对一些厌氧、非脆弱类杆菌等误差较大^[30-31]。

蛋白质组学代表基因组学的功能方面,可用作菌株分型。基于MALDI-TOF MS的分型是一种快速、灵敏的细菌分型方法,在用于细菌分型的研究上受到越来越多的关注。除了血清分型、细菌多位点序列分型之外^[32-33],MALDI-TOF MS也可以通过分析同属或同种菌株间的差异,对细菌进行进一步分型,且方法简单快速。近来有国内学者研究表明MALDI-TOF MS的聚类分析可以对细菌进行同源分析,例如芽孢杆菌、副溶血弧菌、分歧杆菌等^[34-36]。MALDI-TOF MS的同源性分析结果与重复序列PCR的分

型结果基本相符,且 MALDI-TOF MS 的结果比多位点序列分型结果能更详细地展示各菌株之间的亲缘关系^[21,37]。有研究用生化和 MALDI-TOF MS 对生鸡肉样品中分离的疑似沙门氏菌进行鉴定,结果表明生化和质谱鉴定结果一致,这表明 MALDI-TOF MS 可以作为对细菌的快速鉴定方法应用到对微生物的鉴定溯源^[38]。

目前来说,应用于芽孢杆菌的鉴定与聚类分析的研究相对还较少。本研究通过 MALDI-TOF MS 对 22 株环境菌进行了鉴定,得到指纹图谱,对实验菌株进行了鉴定和聚类分型,以期实现对芽孢杆菌的快速鉴定和溯源。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

所用菌株为某厂分离的环境菌,共 22 株;枯草芽孢杆菌标准菌株 CGMCC(B)1.1086 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心;大肠杆菌标准菌株 ATCC 8739 购自美国模式菌种收集中心。

无水乙醇、甲酸、乙腈、三氟乙酸(色谱纯)、2-氰基-4-羟基肉桂酸基质(纯度≥99.0%)(美国 Sigma 公司);DNA 提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);胰蛋白胍大豆琼脂(北京陆桥技术股份有限公司)。

1.2 仪器与设备

MALDI-TOF MS 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱仪(日本岛津公司);IKA VORTEX 2 漩涡混合器(德国 IKA 公司);Scanspeed miniPINK 离心机(丹麦 LABOGENE 公司);KQ-50 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株活化

将实验菌株接种于胰蛋白胍大豆琼脂,置于(36±1)℃培养 24 h,所生长菌落用于 MALDI-TOF MS 的检测。

1.3.2 样品处理

胰蛋白胍大豆琼脂平板上刮取待测菌株 5~10 mg,在 300 μL 水中混匀后,加入 900 μL 无水乙醇,仔细混匀。12000 r/min 离心 2 min,弃去上清。加入 50 μL 70%甲酸,仔细混匀,超声破壁 10 min,再加入 50 μL 乙腈,仔细混匀,超声破壁 10 min,12000 r/min 离心 2 min,吸出上清。先点 1 μL 上清,放干后再点 1 μL 2-氰基-4-羟基肉桂酸基质,晾干后上机进行检测^[20]。

1.3.3 MALDI-TOF MS 检测及聚类分析

参数设置:激光光源,激光频率 65 Hz,线性正离子采样模式,设定质量范围为 2000~20000 Da,采集谱图数每样品 100 次。检测待测样品用标准菌株 ATCC 8739 进行校正,以降低结果数据的误差。在 SARAMIS 窗口显示鉴定结果,结果可信度用百分比(%)表示。使用 SARAMIS 软

件,对实验菌株进行聚类分析。

1.3.4 16S rDNA 相关性分析

使用 DNA 提取试剂盒提取 DNA,并将其进行 PCR 反应[反应体系: MgCl₂ (1.5 mmol/L)、基因组 DNA (10 ng)、Dntp (200 μmol/L)、引物(0.4 μmol/L)、TaqDNA 聚合酶 (1.25 U); 反应条件: 94℃变性 30 s, 53℃退火 20 s, 72℃延伸 1.5 min, 共 30 个循环],16S rDNA 通用引物将 PCR 产物进行双向测序并拼接,将微生物 16S rDNA 序列在 Clustal-1.81 Raindy 软件上整理,采用 Phylipwx 软件进行序列分析,构建发育树。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定结果

标准菌株 ATCC 8739 与数据库中大肠杆菌未匹配的峰数量小于 3 个。结果见表 1,鉴定可信度为 99.9%,图谱如图 1A 所示。

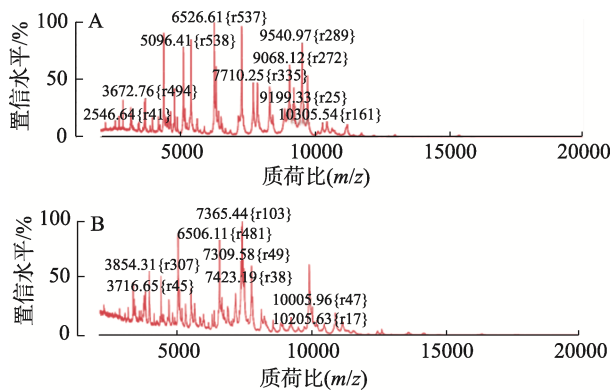
图 1B 为枯草芽孢杆菌 CGMCC(B)1.1086 标准菌株图谱,质荷比 *m/z* 主要在 3716.65、3854.31、6506.11、7309.58、7365.44、7423.19、10005.96、10205.63,这 8 处相应的峰强度增强,其主要离子峰重复性好。

如表 2 所示,通过 MALDI-TOF MS 对实验菌株进行鉴定,7、9、11、12、19、20 共 6 株菌鉴定到属水平,均为芽孢杆菌属。其余 16 株菌鉴定到种水平,其中,1、2、3、5、6、22 为枯草芽孢杆菌,4、14、16、21 为短小芽孢杆菌,8、10 为巨大芽孢杆菌,13、15 为海洋芽孢杆菌,17 为高地芽孢杆菌,18 为克劳氏芽孢杆菌。菌株图谱如图 2 所示。

表 1 大肠杆菌 ATCC 8739 标准菌株校准结果
Table 1 Calibration results of *Escherichia coli* ATCC 8739 standard strain

序号	仪器标准菌株质荷比(<i>m/z</i>)	飞行时间/ns
1	4365.40	88532.00
2	5096.80	95665.00
3	5381.40	98299.00
4	6241.40	-
5	6255.40	105975.00
6	6316.20	106489.00
7	6411.60	107292.00
8	6856.10	110945.00
9	7158.80	113316.00
10	7274.50	114271.00
11	7872.10	118828.00
12	9742.00	132208.00
13	12227.30	148056.00

注: -表示菌株 ATCC 8739 与数据库中大肠杆菌未匹配。



注: A: 大肠杆菌 ATCC 8739; B: 枯草芽孢杆菌 CGMCC(B)1.1086; 括号内数字代表分辨率。

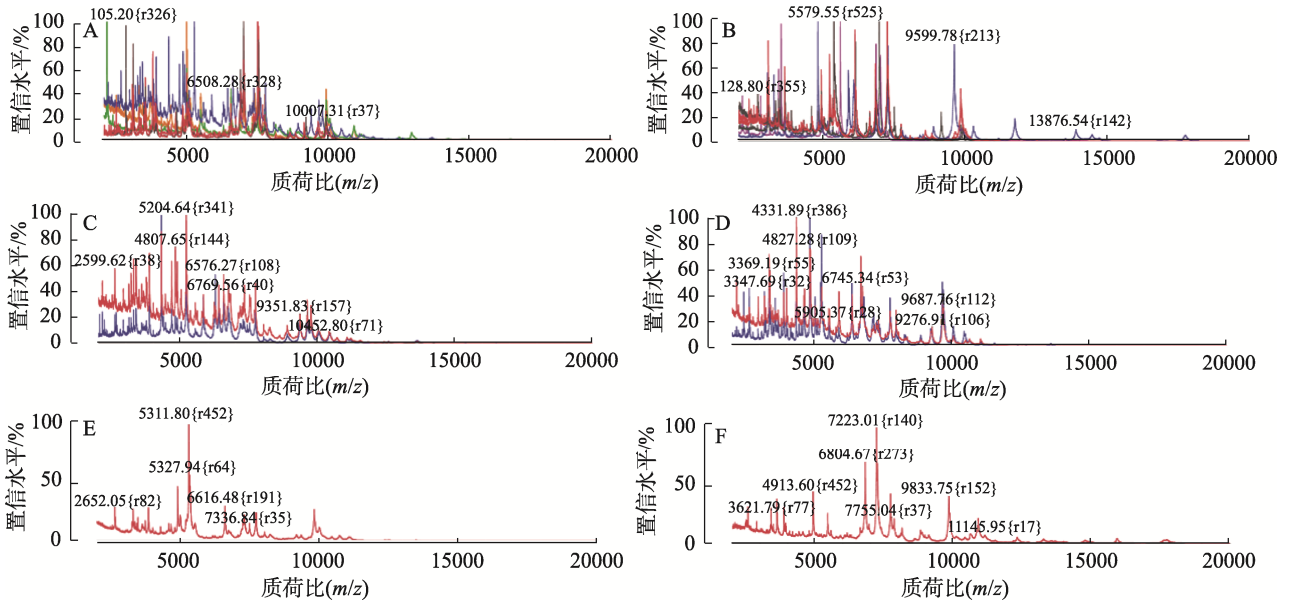
图 1 菌株的图谱

Fig.1 Atlas of bacterial strain

2.2 菌株聚类分析结果

差异水平代表彼此间的亲缘关系, 其值在 0 到 100% 之间。相关性数值越大, 表示亲缘关系越近; 相关性数值越小, 表明亲缘关系越远。如图 3 所示, 将 22 株芽孢杆菌的质谱图导入数据库中, 使用 SARAMIS 软件, 进一步对实验菌株进行聚类分析。图 3 可以直观反映出分离的 22 株菌在蛋白质水平的相关性和亲缘关系, 在相关性为 80% 的条件下, 22 株芽孢杆菌分为 22 个群, 这 22 株菌亲缘关系较远。在相关性为 70% 的条件下, 只有 1 和 6 可以归属于同一个群。实验菌株虽然来自于同一公司, 但彼此间亲缘关系相差较大。

表 2 实验菌株信息		
Table 2 Information of experimental strain		
编号	菌株名称	
1	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌
2	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌
3	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌
4	<i>Bacillus pumilus</i>	短小芽孢杆菌
5	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌
6	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌
7	<i>Bacillus</i> sp.	芽孢杆菌属
8	<i>Bacillus megaterium</i>	巨大芽孢杆菌
9	<i>Bacillus</i> sp.	芽孢杆菌属
10	<i>Bacillus megaterium</i>	巨大芽孢杆菌
11	<i>Bacillus</i> sp.	芽孢杆菌属
12	<i>Bacillus</i> sp.	芽孢杆菌属
13	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	海洋芽孢杆菌
14	<i>Bacillus pumilus</i>	短小芽孢杆菌
15	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	海洋芽孢杆菌
16	<i>Bacillus pumilus</i>	短小芽孢杆菌
17	<i>Bacillus altitudinis</i>	高地芽孢杆菌
18	<i>Bacillus clausii</i>	克劳氏芽孢杆菌
19	<i>Bacillus</i> sp.	芽孢杆菌属
20	<i>Bacillus</i> sp.	芽孢杆菌属
21	<i>Bacillus pumilus</i>	短小芽孢杆菌
22	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌

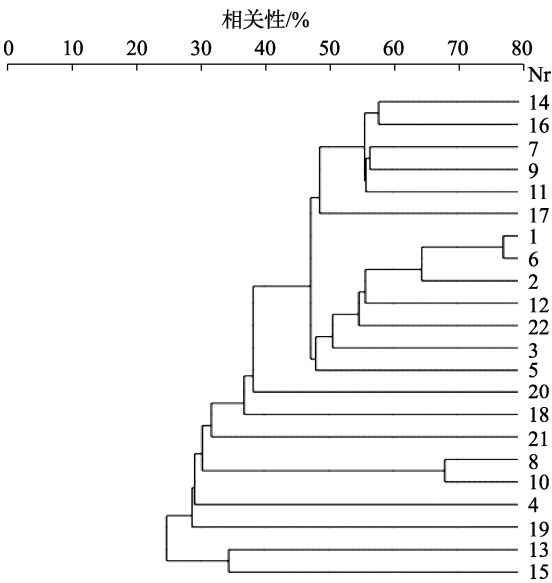


注: 括号内数字代表分辨率; A: 枯草芽孢杆菌(菌株 1、2、3、5、6、22); B: 短小芽孢杆菌(4、14、16、21); C: 巨大芽孢杆菌(8、10); D: 海洋芽孢杆菌(13、15); E: 高地芽孢杆菌(17); F: 克劳氏芽孢杆菌(18)。不同来源的菌株鉴定结果相同时, 主要蛋白质图谱的峰重叠度高。

图 2 实验菌株的图谱

Fig.2 Atlas of experimental strains

分离菌株在 16S rDNA 水平下的亲缘关系与位置如图 4 所示, 在相似性为 80%的条件下, 22 株菌可分为两个群。枯草芽孢杆菌 4 株菌(菌株 1、2、3、6)相对偏差较小, 归于 1 个分支, 枯草芽孢杆菌 2 株菌(菌株 5、22)相对偏差较小, 归于 1 个分支, 但这 2 个分支相差较大; 4 株短小芽孢杆菌中有 3 株菌(菌株 4、14、16)相对偏差较小, 归于 1 个分支, 但与菌株 21 相差较大; 6 株芽孢杆菌属中有 5 株菌(菌株 7、9、11、12、20)相对偏差较小, 归于 1 个分支, 但与菌株 19 相差较大; 巨大芽孢杆菌 2 株菌(菌株 8、10)相对偏差较小, 归于 1 个分支; 2 株海洋芽孢杆菌(菌株 13、15)相对偏差较大。与 MALDI-TOF MS 聚类分型结果相比, 16S rDNA 显示的菌株间的亲缘关系更为接近。



注: 质量偏差/%: 0.08; 质量范围: 3000~20000。

图 3 芽孢杆菌聚类分析图(MALDI-TOF MS)

Fig.3 Cluster analysis diagram of *Bacillus* (MALDI-TOF MS)

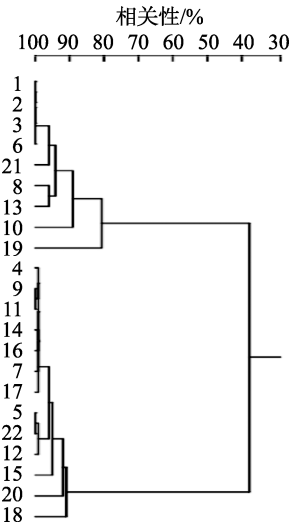


图 4 芽孢杆菌聚类分析图(16S rDNA)

Fig.4 Cluster analysis diagram of *Bacillus* (16S rDNA)

3 结论与讨论

本研究结果表明, MALDI-TOF MS 可对未知菌株进行鉴定, 但有部分菌株只鉴定到属水平, 相同属的芽孢杆菌在 MALDI-TOF MS 与 16S DNA 测得的进化树中, 亲缘关系有一定差异。有研究表明在通过 MALDI-TOF MS 与 16S DNA 得到的数据测得的微生物系统发育树中, 相同属的肠杆菌科细菌归类的亲缘位置与方向一致, 不同属的肠杆菌科细菌亲缘距离与位置还是差异较大^[39]。杨文辉^[40]研究表明 MALDI-TOF MS 和 16S rRNA 两种方法的分型基本一致, 但是 MALDI-TOF MS 比 16S rRNA 的分辨率更高, 区分度更细。

本研究对分离的 22 株芽孢杆菌的聚类分析也表明 MALDI-TOF MS 不仅可以对芽孢杆菌进行分类, 且对于芽孢杆菌的溯源分析具有重要意义, 满足细菌流行病学分析快速、高效的要求。MALDI-TOF MS 能够对芽孢杆菌进行快速鉴定分型, 对于芽孢杆菌鉴定、流行病学调查等具有重要意义。因此, 对某些微生物爆发流行时感染性病原体的溯源, MALDI-TOF MS 可以提供足够的技术支持, 应用前景广阔。

参考文献

[1] SNOWDEN JD, GONZALEZ A, MAROUN JW, *et al.* Complete genome of *Bacillus megaterium* podophage pascal [J]. *Genome Announc*, 2015, 3(1): e01429–14.

[2] YUN ZZ, WEN FC, MAO L, *et al.* *Bacillus endoradicis* sp. nov. an endophytic bacterium isolated from soybean root [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2012, 62(Pt 2): 359–363.

[3] PAOLA P, JOACHIM F. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis* [J]. *Infect Genet Evol*, 2018, 64: 115–125.

[4] HOANG TTH, DANG DA, PHAM TH, *et al.* Epidemiological and comparative genomic analysis of *Bacillus anthracis* isolated from northern Vietnam [J]. *PLoS One*, 2020, 15(2): e0228116.

[5] 王小璐, 杨永龙, 王美华, 等. 乳制品中芽孢杆菌的研究进展[J]. *食品科技*, 2021, 46(5): 5.

WANG XL, YANG YL, WANG MH, *et al.* Research progress of *Bacillus* in dairy products [J]. *Food Sci Technol*, 2021, 46(5): 5.

[6] 张晨星, 崔丽佼, 于有伟, 等. 浓缩苹果汁中酸土脂环酸芽孢杆菌检测及控制措施研究进展[J]. *中国果菜*, 2021, 41(1): 10.

ZHANG CX, CUI LJ, YU YW, *et al.* Advances in the detection and control of *Alicyclobacillus* spp. in apple juice [J]. *China Fruit Veg*, 2021, 41(1): 10.

[7] 张雪. 全自动细菌生化鉴定分析仪与细菌微量生化管鉴定细菌的结果 [J]. *中国医疗器械信息*, 2021, 27(1): 113–114.

ZHANG X. The results of identification of bacteria by automatic bacterial biochemical identification analyzer and bacterial microbiochemical tube [J]. *China Med Device Inform*, 2021, 27(1): 113–114.

[8] 沈莉萍, 王晓旭, 徐锋. 一株猫源溶血性大肠埃希菌的分离与鉴定[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2020, (4): 31–33, 39.

- SHEN LP, WANG XX, XU F. Isolation and identification of a cat-derived hemolytic *Escherichia coli* strain [J]. Shanghai J Anim Husb Vet Med, 2020, (4): 31–33, 39.
- [9] GARCÍA-SALGUERO C, CULEBRAS E, ALVAREZ-BUYLLA A, *et al.* Usefulness of MALDI-TOF and REP-PCR against PFGE for the epidemiological study of *Acinetobacter baumannii* [J]. Rev Esp Quimioter, 2021, 34(3): 207–213.
- [10] TANIDA K, HAHN A, FRICKMANN H. Comparison of two commercial and one in-house real-time PCR assays for the diagnosis of bacterial gastroenteritis [J]. Eur J Microbiol Immunol, 2020, 10(4): 210–216.
- [11] RODRIGUEZ-TEMPORAL D, RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ B, ALCAIDE F. Evaluation of MALDI biotyper interpretation criteria for accurate identification of nontuberculous mycobacteria [J]. J Clin Microbiol, 2020, 58(10): e011103–20.
- [12] 黄阿环, 陈文标, 陈清清, 等. MALDI-TOF MS 技术和 AFLP 技术在肺炎链球菌同源性分析中的应用[J]. 医学动物防制, 2022, 38(3): 265–270.
- HUANG AH, CHEN WB, CHEN QQ, *et al.* Application of MALDI-TOF MS technology and AFLP technology in homology analysis of *Streptococcus pneumoniae* [J]. Med Anim Control, 2022, 38(3): 265–270.
- [13] NAOMI T, SATOMI N, AKANE F, *et al.* Discrimination of psychrotolerant *Bacillus cereus* group based on MALDI-TOF MS analysis of ribosomal subunit proteins [J]. Food Microbiol, 2020, 91: 103542.
- [14] 孟令缘, 牛沁雅, 廉鲁昕, 等. 基于 16S rDNA 序列、MALDI-TOF-MS 和 VITEK 的沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的鉴定[J]. 中国食品学报, 2021, 21(10): 197–205.
- MENG LY, NIU QY, LIAN LX, *et al.* Identification of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* based on 16S rDNA sequence, MALDI-TOF-MS and VITEK [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2021, 21(10): 197–205.
- [15] 王刚. 基于 MALDI-TOF MS 快速检测肺炎克雷伯菌耐药性的研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2021.
- WANG G. Rapid detection of drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* based on MALDI-TOF MS [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2021.
- [16] D'INZEO T, FIORI B, LIOTTI FM, *et al.* Direct MALDI-TOF MS testing from positive blood cultures for rapid identification of bloodstream infection-causing anaerobic bacteria [J]. J Clin Microbiol, 2021. DOI: 10.1128/JCM.00521–21
- [17] LI YX, WANG T, WU JM. Capture and detection of urine bacteria using a microchannel silicon nanowire microfluidic chip coupled with MALDI-TOF MS [J]. Analyst, 2021, 146(4): 1151–1156.
- [18] HOU TY, CHIANG-NI C, TENG SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology [J]. J Food Drug Anal, 2019, 27(2): 404–414.
- [19] DOERN, CHRISTOPHER D. Integration of technology into clinical practice [J]. Clin Lab Med, 2013, 33(3): 705–729.
- [20] 王伟, 赵红阳, 卢雁, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术对阪崎克罗诺杆菌的鉴定及溯源[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(2): 125–131.
- WANG W, ZHAO HY, LU Y, *et al.* Identification and traceability of *Cronobacter sakazaki* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Chin J Food Hyg, 2018, 30(2): 125–131.
- [21] 谢思. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药性及同源性研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2017.
- XIE S. Study on drug resistance and homology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2017.
- [22] 江连洲, 曹飞扬, 陈颖, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱快速鉴定蜡样芽孢杆菌研究与应用[J]. 东北农业大学学报, 2016, 47(12): 56–64.
- JIANG LZ, CAO FY, CHEN Y, *et al.* Research and application of rapid identification of *Bacillus cereus* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. J Northeast Agric Univ, 2016, 47(12): 56–64.
- [23] 陈志敏, 张亦琴, 胡连霞, 等. 金黄色葡萄球菌基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱的鉴定与聚类分型[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 83–89.
- CHEN ZM, ZHANG YQ, HU LX, *et al.* Identification and cluster typing of *Staphylococcus aureus* by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(18): 83–89.
- [24] 孙晓霞, 张亦琴, 王旭旭, 等. 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱法对铜绿假单胞菌的鉴定与聚类分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 6047–6054.
- SUN XX, ZHANG YQ, WANG XX, *et al.* Identification and cluster analysis of *Pseudomonas aeruginosa* by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(18): 6047–6054.
- [25] 武静, 陈英剑, 李继霞, 等. MALDI-TOF-MS 检测哈维弧菌前处理条件的探索及聚类分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(1): 14–17.
- WU J, CHEN YJ, LI JX, *et al.* Exploration and cluster analysis of pretreatment conditions for detection of *Vibrio harveyi* by MALDI-TOF-MS [J]. Int J Lab Med, 2020, 41(1): 14–17.
- [26] 杨祖顺, 汤晓召, 邹颜秋硕, 等. 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱法溯源分析云南省肉制品中金黄色葡萄球菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(22): 7494–7501.
- YANG ZS, TANG XZ, ZOUYAN QS, *et al.* Traceability analysis of *Staphylococcus aureus* in meat products in Yunnan Province by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(22): 7494–7501.
- [27] 吕佳, 卢行安, 刘淑艳, 等. MALDI-TOF-MS 技术鉴定食源性致病菌的影响因素[J]. 分析仪器, 2011, (2): 12–17.
- LV J, LU XAN, LIU SY, *et al.* MALDI-TOF-MS technology to identify the influencing factors of food-borne pathogens [J]. Anal Instrum, 2011, (2): 12–17.
- [28] 刘莉, 韩笑, 王紫薇, 等. 霍乱弧菌基质辅助激光解吸飞行时间质谱数据库的建立与应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(14): 4773–4782.
- LIU L, HAN X, WANG ZW, *et al.* Establishment and application of the database of *Vibrio cholerae* matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(14): 4773–4782.
- [29] 梁世周, 蔡文品, 曾云祥, 等. 三种前处理在基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定假丝酵母菌属中的应用比较[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(10): 1203–1209.
- LIANG SZ, CAI WP, ZENG YX, *et al.* Application comparison of three kinds of pretreatments in the identification of *Candida* species by

- matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Chin J Microecol, 2020, 32(10): 1203–1209.
- [30] MARTINY D, BUSSON L, WYBO I, *et al.* Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Clin Microbiol, 2012, 50: 1313–1325.
- [31] HANDAL N, JRGENSEN SB, TUNSI HS, *et al.* Anaerobic blood culture isolates in a Norwegian university hospital: Identification by MALDI-TOF MS vs 16S rRNA sequencing and antimicrobial susceptibility profiles [J]. APMIS, 2015, 123(9): 749–758.
- [32] 畅晓晖, 万晓楠, 张捷, 等. 北京地区食源性单增李斯特菌基因分型分析[J]. 中国公共卫生, 2022, 38(1): 105–109.
- CHANG XH, WAN XN, ZHANG J, *et al.* Genotyping analysis of food-borne *Listeria monocytogenes* in Beijing area [J]. Chin J Public Health, 2022, 38(1): 105–109.
- [33] 康立超, 钱晶, 杜冬冬, 等. 新疆食源性单增李斯特菌 MLST 分型及耐药性分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(15): 6255–6261.
- KANG LC, QIAN J, DU DD, *et al.* MLST typing and drug resistance analysis of food-borne *Listeria monocytogenes* in Xinjiang [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(15): 6255–6261.
- [34] RODRIGUEZ-TEMPORAL D, RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ B, ALCAIDE F. Evaluation of MALDI biotyper interpretation criteria for accurate identification of nontuberculous mycobacteria [J]. J Clin Microbiol, 2020, 58(10): e01103–20.
- [35] LI P, XIN W, XIA S, *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry-based serotyping of *V. parahaemolyticus* isolated from the Zhejiang Province of China [J]. BMC Microbiol, 2018, 18(1): 185.
- [36] 宗凯, 周莉质, 李云飞, 等. 基于 MALDI-TOF-MS 质谱技术对蜂蜜中芽孢杆菌的鉴定与分型[J]. 安徽农业科学, 2016, (8): 107–109.
- ZONG K, ZHOU LZ, LI YF, *et al.* Identification and typing of *Bacillus* in honey based on MALDI-TOF-MS mass spectrometry [J]. J Anhui Agric Sci, 2016, (8): 107–109.
- [37] MENCACCI A, MONARI C, LELI C, *et al.* Typing of nosocomial outbreaks of *acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. J Clin Microbiol, 2012, 51(2): 603–606.
- [38] 李赫婧, 王立平, 杨红莲, 等. 沙门氏菌鉴定和分型方法对比研究[J]. 现代食品, 2021, (14): 146–150.
- LI HJ, WANG LP, YANG HL, *et al.* *Salmonella* identification and typing method comparison study [J]. Mod Food, 2021, (14): 146–150.
- [39] 魏超, 代晓航, 郭灵安, 等. MALDI-TOF MS 与 16S rDNA 方法对肠杆菌科微生物鉴定比较分析[J]. 质谱学报, 2018, 39(2): 209–215.
- WEI C, DAI XH, GUO LAN, *et al.* Analysis and comparison of MALDI-TOF MS and 16S rDNA for the identification of enterobacteriaceae [J]. J Chin Mass Spectr Soc, 2018, 39(2): 209–215.
- [40] 杨文辉. 基于基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱研究耐药性细菌和霍乱弧菌的分型[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2014.
- YANG WH. Study on the typing of drug-resistant bacteria and *Vibrio cholerae* based on matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2014.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



吴丽娜, 硕士, 主要研究方向为食品微生物检测。

E-mail: wuln0901@163.com



贾俊涛, 研究员, 主要研究方向为微生物检测。

E-mail: jiajt@tom.com