

- [16] 邓青,张晓梅. 气相色谱/质谱联用分析测定螺旋藻脂肪酸组成[J]. 云南民族学院学报:自然科学版,2003, 12(1): 37-38.
- [17] 可成友,吴晓芳. 不饱和脂肪酸的气相色谱法同时测定[J]. 中国卫生检验杂志,2005, 15(5): 528-530.
- [18] 李永利,张炎. 邻苯三酚自氧化法测定 SOD 活性[J]. 中国卫生检验杂志,2000, 10(6):673.
- [19] 张宏,谭竹钧. 四种邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性方法的比较[J]. 内蒙古大学学报:自然科学版,2002, 33(6):677-681.
- [20] 杨红文,艾玲,雒秋江. 大蒜等 12 种中草药的体外抑菌实验[J]. 时珍国医国药,2009, 20(9): 2209-2210.
- [21] 吴新正,何迎春,刘红萍,等. 红景天复方对小鼠免疫、耐缺氧和抗疲劳能力的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2008, 28(1):29-31.
- [22] 国果,吴建伟,付萍,等. 家蝇幼虫分泌物抗菌肽对小鼠血清溶菌酶含量的影响[J]. 贵阳医学院学报,2007, 32(6): 586-588.
- [23] 韩广金,杨桂芹,邹兴淮. 不同鹿胎及胎盘制剂对老年雄性大鼠免疫功能影响的研究[J]. 畜牧与兽医,2006,38(1):8-10.
- [24] 中华人民共和国科学技术委员会. GB/T 16919—1997 食用螺旋藻粉[S]. 北京:中国标准出版社,1997.
- [25] ERIKSEN N T. Production of phycocyanin-a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine[J]. Microbiol Biotechnol, 2008,80:1-14.
- [26] MORTEN L, WALSTED A, LARSEN R, et al. Enhancement of human adaptive immune responses by administration of a high-molecular-weight polysaccharide extract from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*[J]. J Med Food, 2008, 11(2): 313-322.
- [27] SCHWARTZ J, SHKLAR G, REID S, et al. Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina-Dunaliella* algae [J]. Nutr Cancer, 1988, 11:127-134.
- [28] JUAREZ M A, MASCHER D, TORRES P V, et al. Effects of dietary *Spirulina* on vascular reactivity[J]. J Med Food, 2009, 12(1):15-20.
- [29] PARK H J, LEE Y J, RYE H K, et al. A randomized double-blind, placebo-controlled study to establish the effects of spirulina in elderly Koreans [J]. Ann Nutr Metab, 2008, 52(4): 322-328.
- [30] JOHNSON P, SHUTERT E. Availability of iron to rats from spirulina, a blue-green alga[J]. Nutr Res, 1986, 6: 86.
- [31] MIKI W, YAMAGUCHI K, KONOSU S. Carotenoid composition of *Spirulina maxima*[J]. Bull Jap Soci Scienti Fisher, 1986, 52(7): 1225-1227.

## 论著

# MALDI-TOF-MS 鉴定 2008 年辽宁省食源性疾病监测系统检出的沙门菌的初步研究

吕佳<sup>1</sup>, 卢行安<sup>2</sup>, 刘淑艳<sup>2</sup>, 蒋丹<sup>2</sup>, 宋惠君<sup>2</sup>, 侯君<sup>3</sup>, 胡英<sup>4</sup>

(1. 大连工业大学生物工程学院, 辽宁 大连 116034; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 辽宁 大连 116015; 3. 大连市疾病预防控制中心, 辽宁 大连 116021; 4. 辽宁省疾病预防控制中心, 辽宁 沈阳 110005)

**摘要:**目的 应用 MALDI-TOF-MS 技术对 2008 年辽宁省食源性疾病监测检出的 24 株沙门菌和 2 株沙门菌标准菌株进行鉴定,并对其中 4 种血清型的 16 株沙门菌进行种水平的鉴定。通过 MALDI-TOF-MS 的相关性分析,研究 MALDI-TOF-MS 与血清分型结果的相关性及 MALDI-TOF-MS 对实验的沙门菌的分型能力。方法 考察并确定既适合菌株生长又适宜 MALDI-TOF-MS 分析的沙门菌培养基后,应用 MALDI-TOF-MS 的相关软件对沙门菌进行数据采集和图谱比对,所得鉴定结果与血清分型结果进行比较。对属于 4 个种的 4 株沙门菌的蛋白峰信息进行比较分析。通过生化鉴定及 MALDI-TOF-MS 的聚类分析及主成分分析讨论 4 株肠炎沙门菌同源关系。结果 MALDI-TOF-MS 技术分别在属和种的水平上准确鉴定了沙门菌株,并且在种的鉴定水平上与血清分型结果具有极大相关性。MALDI-TOF-MS 区分了属于 4 个种的 4 株沙门菌的蛋白峰之间的微小差异。而且,对相同血清型的 4 株肠炎沙门菌的聚类分析及主成分分析显示出其同源程度的差异。结论 MALDI-TOF-MS 技术在属水平上鉴定沙门菌具有很高的准确性,在种水平上的鉴定也有着很好的应用前景。MALDI-TOF-MS 技术可能为沙门菌分型溯源提供一种新的手段。

**关键词:**沙门菌;MALDI-TOF-MS;血清型;质谱图;鉴定

**中图分类号:**R378.22 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2011)01-0061-09

收稿日期:2010-07-05

作者简介:吕佳 女 硕士生 研究方向为食源性致病菌检测与鉴定 E-mail: chaneljia095@hotmail.com

通信作者:卢行安 男 研究员 研究方向为食源性致病菌检测与鉴定 E-mail: luxa@lnciq.gov.cn

## Discrimination of *Salmonella* isolated from the foodborne disease monitoring system of Liaoning province in 2008 by MALDI-TOF-MS

Lü Jia, Lu Xing'an, Liu Shuyan, Jiang Dan, Song Huijun, Hou Jun, Hu Ying

(School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Liaoning Dalian 116034, China)

**Abstract: Objective** A rapid method based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) for the identification of intact bacterial cells was used for the discrimination of *Salmonella* strains at genus and species level. The aim of this study was to discuss the relationship of the result from MALDI-TOF-MS analysis and serotyping, and the typing ability of MALDI-TOF-MS to *Salmonella* strains through relative soft wares.

**Methods** Twenty-four *Salmonella* strains isolated from the Foodborne Disease Monitoring System of Liaoning Province in 2008 and 2 standard strains purchased from ATCC were used in the study. Sixteen *Salmonella* strains belonging to four serotypes were applied on MALDI-TOF-MS for the identification of *Salmonella* at species level. A detailed analysis on mass spectrometric profiles and the information of protein peaks were obtained from four different *Salmonella* species. The homology of these 4 *Salmonella enteritidis* was also discussed through biochemical test and relative analysis with MALDI-TOF-MS. After an optimum medium suitable for both the growth of *Salmonella* strains and MALDI-TOF-MS analysis was selected, 26 *Salmonella* strains were tested to verify the accuracy of MALDI-TOF-MS in genus levels, and 16 of 26 *Salmonella* species, which belonging to 4 different serotypes, were also typed in species level. Relative software was used to collect data and compare the peaks obtained from four *Salmonella* species. The biochemical test, MALDI-TOF-MS dendrogram analysis and Principal Component analysis were adopted to confirm the homologous diversity of 4 *Salmonella enteritidis* from different locations. **Results** The identification results of MALDI-TOF-MS on 26 *Salmonella* in genus level were matched with their classic biochemical identification results, and the discrimination results of 16 *Salmonella* in species level were also matched with their serotypes. Slight differences among 4 *Salmonella* species were also discovered through the peaks lists of them by MALDI-TOF-MS successfully. Furthermore, the homologous diversity of 4 *Salmonella enteritidis* was demonstrated obviously. **Conclusion** MALDI-TOF-MS can be used to discriminate *Salmonella* strains used in this study rapidly and exactly on genus level. It has also a potential ability on typing *Salmonella* species and will be a powerful tool for rapid and accurate identification of foodborne pathogens.

**Key words:** *Salmonella*; matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS); serotype; mass spectrometric profile; identification

沙门菌(*Salmonella*)分属肠杆菌科,是一种重要的肠道致病菌,可引起人类的相关疾病与感染,并引起人和动物发生沙门菌病。其感染人群 1/3 以上需要住院治疗,约 3% 的病例死亡<sup>[1]</sup>。食物传播是人类感染沙门菌的主要途径,肉类(尤其是禽肉)、蛋类及蛋制品、未经巴氏消毒的牛奶及奶制品、海产品等很多食品都与沙门菌病有关<sup>[2]</sup>。最易感人群是年幼儿童、虚弱者、年长老人、免疫缺陷者等<sup>[3]</sup>。在世界各地的食物中毒中,沙门菌引起的中毒病例占首位或第 2 位,因而受到了人们的强烈关注。2007 年 9 月,美国原料花生受到沙门菌污染,导致美国 44 个州发生沙门菌疫情,造成 637 人染病,至少 9 人死亡。2008 年 6 月,圣保罗沙门菌感染美国红番茄,导致沙门菌疫情持续上升,沙门菌疫情蔓延 23 个州,228 人感染,1 人死亡。在我国的细菌性食物中毒中,70% ~ 80% 是由沙门菌引起的<sup>[4]</sup>。根据中国疾病控制信息系统“疾病监测信息报告管理系统”中相关数据显示,2009 年我国共有 26 个地区累计出现 621 例沙门菌感染病例,占细菌

性感染病例总数的 27.13%<sup>[5]</sup>。因此,探索快速有效的沙门菌检测及鉴定方法已成为沙门菌检验研究的核心所在。

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)是一种新型的软电离技术。将样品与基质溶液按一定比例点加在样品板上,溶剂挥发后形成样品与基质的共结晶,利用激光作为能量来源辐射共结晶体,基质从激光中吸收能量使样品解吸电离,经过飞行时间检测器,将不同质荷比( $m/z$ )的离子分开。离子的质荷比( $m/z$ )为横坐标,离子峰强度为纵坐标,两者构成质谱图<sup>[6]</sup>。离子的质荷比( $m/z$ )近似反映蛋白峰的相对分子质量。利用 MALDI-TOF-MS 鉴定细菌得到的质谱图与数据库图谱比对,可以达到鉴定区分各种细菌的目的。衡量质谱图中蛋白峰相对强度的参数是信噪比( $S/N$ ),当蛋白峰信号强而杂质峰信号相对弱时,信噪比( $S/N$ )便非常理想。本研究将应用 MALDI-TOF-MS 技术对 2008 年辽宁省食源性疾

病监测检出的 24 株沙门菌和 2 株沙门菌标准菌株在属水平上进行鉴定,并将种水平上的鉴定结果与其血清分型结果进行比较,研究 MALDI-TOF-MS 鉴定结果与沙门菌血清型的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验菌株

本研究使用的菌株包括 2008 年辽宁省食源性疾病监测系统检出的 24 株沙门菌和 2 株 ATCC 标准菌株。所有实验菌株均依据 GB 4789.4—2010

《食品微生物学检验 沙门氏菌检验》<sup>[7]</sup>进行准确的生化鉴定及血清分型。实验菌株信息见表 1。

#### 1.1.2 培养基

营养琼脂 (nutrient agar, NA),安科生物制品(上海)有限公司,产品编号:AKF002。CHROMagar 沙门菌显色培养基,法国 CHROMagar 公司,产品批号:988。HE 琼脂 (Hektoen-Enterogagar, HE),产品批号:7113311。XLD 琼脂 (XLD),产品批号:9075196,美国 BD 公司。细菌生化鉴定培养基及相关试剂,北京陆桥技术有限责任公司,产品编号:S005, CM1004, CM211, CM214, CM216, M057。

表 1 实验菌株信息

Table 1 The basic information of *salmonella* strains used in this study

序号	菌株代码	菌株名称	血清型	来源	来源地代号
1	LN-24	<i>Salmonella thompson</i>	O <sub>6,7</sub> H <sub>k</sub>	食品	a
2	LN-31	<i>Salmonella derby</i>	O <sub>4,12</sub> H <sub>g,f</sub>	食品	a
3	LN-32	<i>Salmonella derby</i>	O <sub>4,12</sub> H <sub>g,f</sub>	食品	a
4	SY-60	<i>Salmonella enteritidis</i>	O <sub>1,9,12</sub> H <sub>g,m</sub>	食品	b
5	AS-1	<i>Salmonella chandans</i>	O <sub>11</sub> H <sub>D</sub>	食品	c
6	AS-25	<i>Salmonella agona</i>	O <sub>4,12</sub> H <sub>g,f,s</sub>	食品	c
7	AS-27	<i>Salmonella nchanga</i>	O <sub>3,10</sub> H <sub>V</sub> H <sub>1,2</sub>	食品	c
8	AS-37	<i>Salmonella enteritidis</i>	O <sub>1,9,12</sub> H <sub>g,m</sub>	食品	c
9	TL-30	<i>Salmonella nchanga</i>	O <sub>3,10</sub> H <sub>V</sub> H <sub>1,2</sub>	食品	d
10	TL-54	<i>Salmonella kottbus</i>	O <sub>6,8</sub> H <sub>e,h</sub> H <sub>1,5</sub>	食品	d
11	AS-B	<i>Salmonella rissen</i>	O <sub>7</sub> H <sub>g,f</sub>	食源性疾病监测点	c
12	AS-C	<i>Salmonella rissen</i>	O <sub>7</sub> H <sub>g,f</sub>	食源性疾病监测点	c
13	LN-CG-2	<i>Salmonella typhi</i>	O <sub>9,12</sub> ,V <sub>i</sub> H <sub>d</sub>	食源性疾病监测点	e
14	LN-CG-3	<i>Salmonella typhi</i>	O <sub>9,12</sub> ,V <sub>i</sub> H <sub>d</sub>	食源性疾病监测点	e
15	LN-CG-4	<i>Salmonella blegdam</i>	O <sub>9,12</sub> H <sub>g,m,q</sub>	食源性疾病监测点	e
16	LN-6	<i>Salmonella blegdam</i>	O <sub>9,12</sub> H <sub>g,m,q</sub>	食源性疾病监测点	a
17	LN-CG-X	<i>Salmonella typhi</i>	O <sub>9,12</sub> ,V <sub>i</sub> H <sub>d</sub>	食源性疾病监测点	e
18	LN-CG-5	<i>Salmonella enteritidis</i>	O <sub>1,9,12</sub> H <sub>g,m</sub>	食源性疾病监测点	e
19	LN-1-1	<i>Salmonella derby</i>	O <sub>4,12</sub> H <sub>g,f</sub>	食源性疾病监测点	a
20	LN-7	<i>Salmonella derby</i>	O <sub>4,12</sub> H <sub>g,f</sub>	食源性疾病监测点	a
21	LN-1-2	<i>Salmonella enteritidis</i>	O <sub>1,9,12</sub> H <sub>g,m</sub>	食源性疾病监测点	a
22	DL-27	<i>Salmonella blegdam</i>	O <sub>9,12</sub> H <sub>g,m,q</sub>	食物中毒患者粪便	f
23	LN-1-3	<i>Salmonella derby</i>	O <sub>4,12</sub> H <sub>g,f</sub>	食源性疾病监测点	a
24	LN-29	<i>Salmonella thompson</i>	O <sub>6,7</sub> H <sub>k</sub>	食品	a
25	ATCC 13076	<i>Salmonella enteritidis</i>	O <sub>1,9,12</sub> H <sub>g,m</sub>	标准菌株	美国标准菌种保藏中心
26	ATCC 35640	<i>Salmonella abaeetuba</i>	O <sub>11</sub> H <sub>K</sub>	标准菌株	美国标准菌种保藏中心

#### 1.1.3 溶剂与试剂

甲酸 (formic acid, FA) 和三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA),购自 Dikmapure,色谱纯;乙腈 (acetonitrile, ACN),Fisher 公司,色谱纯;无水乙醇,上海哈勃化学技术有限公司,色谱纯;校准肽干粉 (peptide calibration standard)、校准蛋白干粉 (protein calibration standard I)、基质 2-氰基-4-羟基肉桂酸 ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA),德国布鲁克公司 (Bruker Daltonics)。沙门菌 O、H

血清,美国 BD 公司。

#### 1.1.4 实验仪器

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (Microflex™ MALDI-TOF),德国布鲁克公司。BD 全自动细菌生化鉴定仪 (PHOENIX™ 100),美国 BD 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 适宜培养基的选择

考察的培养基为沙门菌的强选择性培养基

XLD 琼脂 (XLD)、HE 琼脂 (HE)、CHROMagar 沙门菌显色培养基以及非选择性培养基营养琼脂 (NA)。以肠炎沙门菌 (*Salmonella enteritidis*) ATCC 13076 作为实验菌株,36 °C 培养 24 h 后进行适宜培养基的选择实验。根据下述条件确定适宜培养基:4 种培养基上生长的菌株,分别进行 10 次 MALDI-TOF-MS 的鉴定和图谱匹配性分析,对得到的 4 组数据平均分进行统计学分析 (*t* 检验)来评价图谱匹配程度高低,匹配性最高的确定为适宜培养基。

### 1.2.2 菌株处理及 MALDI-TOF-MS 鉴定分析和相关生化鉴定

#### 1.2.2.1 细菌培养

将实验菌株接种于 1.2.1 确定的适宜培养基上,36 °C 培养 24 h,生长的菌落用于 MALDI-TOF-MS 鉴定分析。

#### 1.2.2.2 基质溶液与标准品配制

基质溶液:50% ACN、2.5% TFA 和超纯水的混合溶液,加入 CHCA 粉末至形成过饱和溶液。-20 °C 保存备用。混合标准品溶液:125 μl 30% 乙腈 (含 0.1% TFA) 溶解蛋白干粉;500 μl 30% 乙腈 (含 0.1% TFA) 溶解肽干粉;两者以 5:1 比例混合。-20 °C 保存备用。

#### 1.2.2.3 样品处理与点靶

用无菌棉棒挑取适量细菌 (约 5mg) 放入 1.5 ml Eppendorf 管,加 300 μl 纯水混匀,再加入 900 μl 无水乙醇混匀,12 000 r/min 离心 2 min 弃上清,向 Eppendorf 管中加入 50 μl 70% FA 和 50 μl ACN,同上离心后,取上清液转移到新 Eppendorf 管。取 1 μl 处理好的上清液点加在 MALDI-TOF-MS 的样品靶上,在室温条件下自然晾干 (约需 3 min),其上滴加 1 μl 基质溶液均匀覆盖,自然晾干后备用。以同样的方法处理校正混合标准品。

样品上清液晾干后应尽快点基质溶液,以防止上清液中的蛋白在空气中氧化。

#### 1.2.2.4 MALDI-TOF-MS 鉴定与数据采集分析

仪器参数:氮气激光光源,激光波长 370 nm,线性正离子 (LP-BioTyper) 采样模式,基质抑制偏转模式,加速电压 20.00 kV,延迟提取电压 18.25 kV,设定质量范围 1 000 ~ 12 000 Da,激光发射电压 2 500 mV,激光频率 30 Hz。每次实验前都要在设定的质量范围内用混合标准品 (肽与蛋白混合溶液) 进行质量校正,以保证获得数据误差小于 ±5 Da。

数据的采集分析:采用 MALDI-TOF-MS 的数据采集软件 Flexcontrol™3.0 进行样品孔的数据采集,26 株沙门菌平行 3 个样品孔,每孔取 10 个不同位置进行激光点击,即:每一菌株的激光点击为 3 000

效次 (100 Hz × 30 次)。采用 MALDI-TOF-MS 的鉴定软件 Biotyper™2.0 对形成图谱进行数据的匹配性分析并得到鉴定结果与分值,其中 2.3 ~ 3.0 分为匹配好,2.0 ~ 2.3 分为匹配较好,2.0 分以下为匹配一般。再通过 MALDI-TOF-MS 的分析软件 Flexanalysis™3.0 获取 4 株属于 4 个种的沙门菌蛋白峰信息。最后,通过 Biotyper™2.0 进行 4 株肠炎沙门菌 AS-37、LN-CG-5、LN-1-2 和 SY-60 的聚类分析及主成分分析。

### 1.2.2.5 BD 全自动细菌生化鉴定仪鉴定 4 株肠炎沙门菌

以 BD 全自动细菌生化鉴定仪对 4 株肠炎沙门菌 AS-37、LN-CG-5、LN-1-2 和 SY-60 进行相应生化指标的分析。比较 4 株菌株的生化鉴定结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 适宜培养基的确定

分别选择 NA、HE、XLD、CHROMagar 沙门菌显色培养基作为实验菌株肠炎沙门菌 (*Salmonella enteritidis*) ATCC 13076 的考察培养基,36 °C 培养 24 h,沙门菌在 4 种培养基生长较好,如 1.2.1 中相关步骤所述,分别对 4 种培养基上的菌株进行 10 次 MALDI-TOF-MS 鉴定和图谱匹配性分析后得到结果如下:4 种培养基生长的菌株经过 MALDI-TOF-MS 鉴定后均为肠炎沙门菌。4 种培养基的菌株图谱经匹配性分析后得到的 10 个分值的平均值分别是:2.61 (NA), 2.33 (HE), 2.35 (XLD), 2.31 (CHROMagar 沙门菌显色培养基)。对得到的数据进行 *t* 检验分析,NA 组分值均值最高且与其他 3 组分值均值的差异显著性最大,即:NA 培养基的菌株图谱与数据库相对最匹配。所以,确定适宜的培养基是 NA。

### 2.2 实验菌株的 MALDI-TOF-MS 鉴定

#### 2.2.1 MALDI-TOF-MS 属水平的鉴定

采用 1.2.2 中所述方法对 26 株实验菌株进行预处理后,用 MALDI-TOF-MS 鉴定软件 Biotyper™2.0 对所有菌株进行属水平的鉴定,结果显示:26 株菌株均被 MALDI-TOF-MS 鉴定为沙门菌属,鉴定分值均在 2.3 分以上。

#### 2.2.2 MALDI-TOF-MS 种水平的鉴定

采用 1.2.2 中所述方法对实验菌株进行预处理后,用 MALDI-TOF-MS 鉴定软件 Biotyper™2.0 对分别属于 4 种血清型 O<sub>9,12,vi</sub> H<sub>d</sub>、O<sub>1,9,12</sub> H<sub>g,m</sub>、O<sub>4,12</sub> H<sub>g,f</sub>、O<sub>9,12</sub> H<sub>g,m,q</sub> 的 16 株沙门菌进行种水平的鉴定。结果见表 2。

表 2 结果显示,4 种不同血清型的 16 株沙门

菌,经过 MALDI-TOF-MS 鉴定后其分型结果与血清分型结果一致。其中,SY-60, LN-1-2, LN-CG-5, AS-37 为肠炎沙门菌;LN-CG-2, LN-CG-3, LN-CG-X 为伤寒沙门菌;LN-31, LN-32, LN-7, LN-1-3, LN-1-1 为德尔卑沙门菌;LN-CG-4, LN-6, DL-27 为布利丹沙门菌。其中仅 LN-7 分值低于 2.3, 匹配程度较好,其

他分值均高于 2.3 分,匹配程度好。

### 2.3 沙门菌 4 个种的 MALDI-TOF-MS 分析结果

MALDI-TOF-MS 准确鉴定了 16 株属于 4 个种的沙门菌。所以,选取 ATCC 13076, LN-CG-2, LN-1-1 和 DL-27 属于 4 个种的沙门菌,分析由 Flexanalysis™3.0 得到蛋白峰信息,见表 3。

表 2 4 种血清型沙门菌的 MALDI-TOF-MS 鉴定结果

Table 2 The results of four serotypes of *salmonellae* identified by MALDI-TOF-MS

菌株代码	MALDI-TOF-MS 鉴定结果	MALDI-TOF-MS 鉴定分值	菌株血清型
SY-60	<i>salmonella</i> sp ( <i>enteritidis</i> )	2.38( + + + )	O <sub>1,9,12</sub> H <sub>g,m</sub>
LN-1-2	<i>salmonella</i> sp ( <i>enteritidis</i> )	2.48( + + )	O <sub>1,9,12</sub> H <sub>g,m</sub>
LN-CG-5	<i>salmonella</i> sp ( <i>enteritidis</i> )	2.30( + + + )	O <sub>1,9,12</sub> H <sub>g,m</sub>
AS-37	<i>salmonella</i> sp ( <i>enteritidis</i> )	2.61( + + + )	O <sub>1,9,12</sub> H <sub>g,m</sub>
ATCC 13076	<i>salmonella</i> sp ( <i>enteritidis</i> )	2.65( + + + )	O <sub>1,9,12</sub> H <sub>g,m</sub>
LN-CG-2	<i>salmonella</i> sp ( <i>typhi</i> )	2.32( + + + )	O <sub>9,12,vi</sub> H <sub>d</sub>
LN-CG-3	<i>salmonella</i> sp ( <i>typhi</i> )	2.32( + + + )	O <sub>9,12,vi</sub> H <sub>d</sub>
LN-CG-X	<i>salmonella</i> sp ( <i>typhi</i> )	2.36( + + + )	O <sub>9,12,vi</sub> H <sub>d</sub>
LN-31	<i>salmonella</i> sp ( <i>derby</i> )	2.41( + + + )	O <sub>4,12</sub> H <sub>g,f</sub>
LN-32	<i>salmonella</i> sp ( <i>derby</i> )	2.30( + + + )	O <sub>4,12</sub> H <sub>g,f</sub>
LN-7	<i>salmonella</i> sp ( <i>derby</i> )	2.23( + + + )	O <sub>4,12</sub> H <sub>g,f</sub>
LN-1-3	<i>salmonella</i> sp ( <i>derby</i> )	2.36( + + + )	O <sub>4,12</sub> H <sub>g,f</sub>
LN-1-1	<i>salmonella</i> sp ( <i>derby</i> )	2.39( + + + )	O <sub>4,12</sub> H <sub>g,f</sub>
LN-CG-4	<i>salmonella</i> sp ( <i>blegdam</i> )	2.46( + + + )	O <sub>9,12</sub> H <sub>g,m,q</sub>
LN-6	<i>salmonella</i> sp ( <i>blegdam</i> )	2.35( + + + )	O <sub>9,12</sub> H <sub>g,m,q</sub>
DL-27	<i>salmonella</i> sp ( <i>blegdam</i> )	2.45( + + + )	O <sub>9,12</sub> H <sub>g,m,q</sub>

表 3 沙门菌 4 个种的蛋白峰信息

Table 3 Protein peaks of four *Salmonella* species obtained from MALDI-TOF-MS

ATCC 13076 (O <sub>1,9,12</sub> H <sub>g,m</sub> )		LN-CG-2 (O <sub>9,12,vi</sub> H <sub>d</sub> )		DL-27 (O <sub>9,12</sub> H <sub>g,m,q</sub> )		LN-1-1 (O <sub>4,12</sub> H <sub>g,f</sub> )	
<i>m/z</i>	<i>S/N</i>	<i>m/z</i>	<i>S/N</i>	<i>m/z</i>	<i>S/N</i>	<i>m/z</i>	<i>S/N</i>
3047.81	55.9	3048.26	49.3	3047.76	38	3048.02	29.5
3079.67	4.7	3081.1	5.7	3080.16	4.2	3080.41	2.2
3159.37	6	3158.93	4.1	3158.87	7.3	3159.91	8.1
3174.85	2.4	3175.06	6	3174.88	5.6	3174.76	2.1
		<b>3259.26</b>	<b>5.1</b>				
				3320.72	9.3	3320.92	4.2
3336.85	2.1	3337.31	2.3	3336.73	12.1	3337.01	5.4
<b>3623.21</b>	<b>2.2</b>						
3631.22	3.3	3631.87	6.5	3631.35	9.3	3631.57	5.3
		3639.98	3.7			3639.22	3.3
		3660.33	3.9	3660.47	3.6		
3831.56	3.7	3832.44	2.7	3831.83	3.6	3832.33	3.6
4165.11	12.5	4165.82	8.5	4165.15	10.4	4165.38	5.6
4172.49	6.3	4173.76	5.9	4172.43	4.7	4173.05	3.3
4188.41	5.8	4185.56	4.5	4186.1	5.6	4187.99	3.9
<b>4364.24</b>	<b>5.5</b>						
		4450.42	2.3	4449.68	3.2	4450.58	2.1
				<b>4497.72</b>	<b>4</b>	<b>4460.70</b>	<b>2.7</b>
4549.42	7.5	4550.51	5.9			4549.49	4.7
4617.28	18.5	4621.29	19.1	4620.36	14.5	4619.43	15.2
4761.64	11.7	4762.17	27.3	4761.81	26.4	4761.76	15.1
4963.98	6.1			4964.08	5.3	4964.56	2.4
						<b>5010.64</b>	<b>3.1</b>

续表 3  
Table 3 (Cont)

ATCC13076 (O <sub>1,9,12</sub> H <sub>g,m</sub> )		LN-CG-2 (O <sub>9,12,vi</sub> H <sub>d</sub> )		DL-27 (O <sub>9,12</sub> H <sub>g,m,q</sub> )		LN-1-1 (O <sub>4,12</sub> H <sub>g,f</sub> )	
m/z	S/N	m/z	S/N	m/z	S/N	m/z	S/N
<b>5034. 71</b>	<b>3. 9</b>						
5081. 6	13. 7	5082. 18	2. 6	5081. 6	2	5081. 92	4. 4
				<b>5143. 58</b>	<b>9. 5</b>		
5370	15. 6			5370. 21	18. 4	5370. 47	14. 6
5486. 25	8. 4	5486. 99	4			5486. 28	3. 6
<b>5613. 31</b>	<b>57. 9</b>						
5635. 96	11. 1			5636. 68	3. 5	5636. 66	17. 5
5674. 77	4	5672. 63	6. 8			5674. 49	6. 3
		<b>5713. 91</b>	<b>153. 9</b>				
5778. 43	2. 4	5774. 88	13. 3				
		<b>5884. 90</b>	<b>4</b>				
		<b>5903. 75</b>	<b>2. 6</b>				
<b>5953. 34</b>	<b>5. 2</b>					<b>6009. 71</b>	<b>45. 1</b>
6066. 09	18. 3			6069. 63	91. 1		
				<b>6094. 66</b>	<b>77. 8</b>		
6116. 87	24. 2	6117. 66	14. 7	6115. 24	14. 3	6116. 96	13. 9
				<b>6241. 88</b>	<b>7. 2</b>		
						<b>6256. 05</b>	<b>16. 1</b>
6316. 59	4. 4	6317. 33	7. 2	6316. 55	12. 7		
6384. 67	3. 1	6385. 75	4. 2			<b>6484. 13</b>	<b>4. 6</b>
				<b>6513. 25</b>	<b>5. 7</b>		
		6574. 3	2. 9	6572. 3	2. 5	6573. 3	2. 6
<b>6698. 25</b>	<b>9. 2</b>						
7111. 21	3. 8	7112. 06	2	7111. 04	3. 2	7111. 78	3. 8
7261. 78	7. 1	7262. 69	12. 8	7261. 81	18. 9	7262. 35	13. 7
7322. 15	2. 7	7323. 07	4. 2	7321. 93	4. 6	7322. 64	4. 5
7662. 21	9. 5	7663. 1	5. 1	7662. 12	5. 2	7662. 41	8. 1
7677. 93	3. 7	7679. 15	2. 8			7678. 64	3. 6
<b>7718. 28</b>	<b>2. 3</b>						
7946. 85	2. 5			7944. 22	3. 5	7948. 5	2. 8
				<b>8151. 38</b>	<b>2. 3</b>		
8329. 76	23. 9	8330. 73	16. 3	8329. 52	19. 6	8330. 48	12. 7
8376. 82	10. 8	8378. 18	11. 1	8375. 63	8. 9	8376. 93	7. 7
9240. 87	17	9241. 8	32. 5	9240. 52	24. 4	9241. 66	20. 3
9522. 72	26. 8	9523. 51	52. 6	9522. 86	51. 2	9523. 34	33. 9
		9562. 8	6. 4	9561	6. 5		
10068. 02	2. 5	10068. 99	4	10067. 81	8. 2	10069. 07	4. 5
11238. 67	7	11239. 45	5. 4	11238. 24	7. 1	11239. 32	8. 6

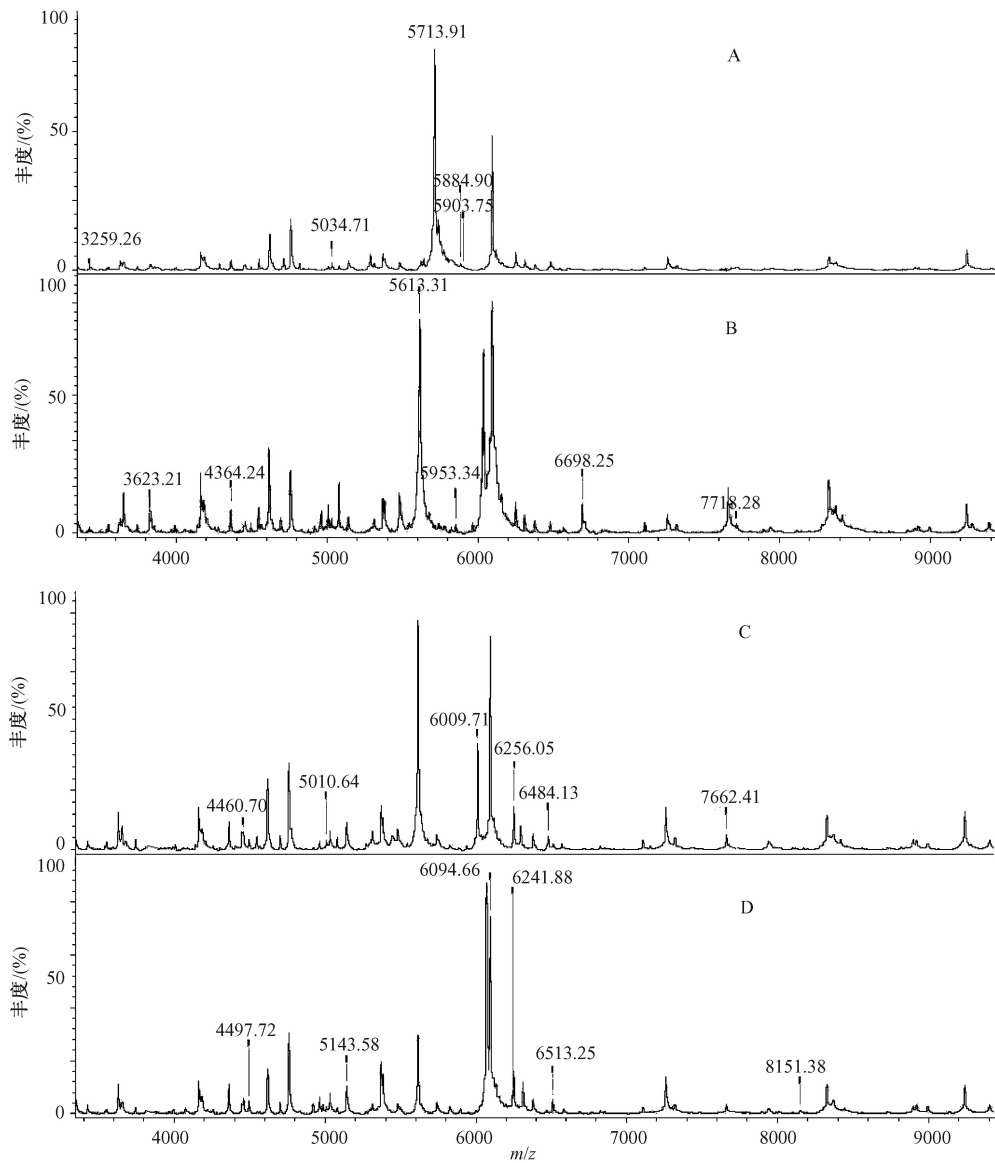
注:实验菌株中属于 4 个种的独有峰以粗体表示。

通过 MALDI-TOF-MS 分析后仍可以发现属于 4 个种的沙门菌蛋白峰信息存在微小差异。LN-CG-2 的蛋白峰 3 259. 26、5 034. 71 Da、5 713. 91、5 884. 90、5 903. 75 Da 是其他 3 株菌株没有的; ATCC 13076 的蛋白峰 3 623. 21、4 364. 24、5 613. 31、5 953. 34、6 698. 25、7 718. 28 Da 是其他 3 株菌株没有的; LN-1-1 的蛋白峰 4 460. 70、5 010. 64、

6 009. 71、6 256. 05、6 484. 13 Da 是其他 3 株菌株没有的; DL-27 的蛋白峰 4 497. 72、5 143. 58、6 094. 66、6 241. 88、6 513. 25、8 151. 38 Da 是其他 3 株菌株没有的。4 个种的沙门菌的质谱图见图 1。

2. 4 4 株肠炎沙门菌相关生化鉴定和 MALDI-TOF-MS 聚类分析与主成分分析

通过 BD 全自动细菌生化鉴定仪鉴定 AS-37、



A: LN-CG-2 ( $O_{9,12},V_iH_d$ ); B: ATCC 13076 ( $O_{1,9,12}H_{g,m}$ ); C: LN-1-1 ( $O_{4,12}H_{g,t}$ ); D: DL-27 ( $O_{9,12}H_{g,m,q}$ )

图1 沙门菌4个种的蛋白质图谱

Figure 1 Mass spectrometric profiles of four *Salmonella* species obtained from MALDI-TOF-MS

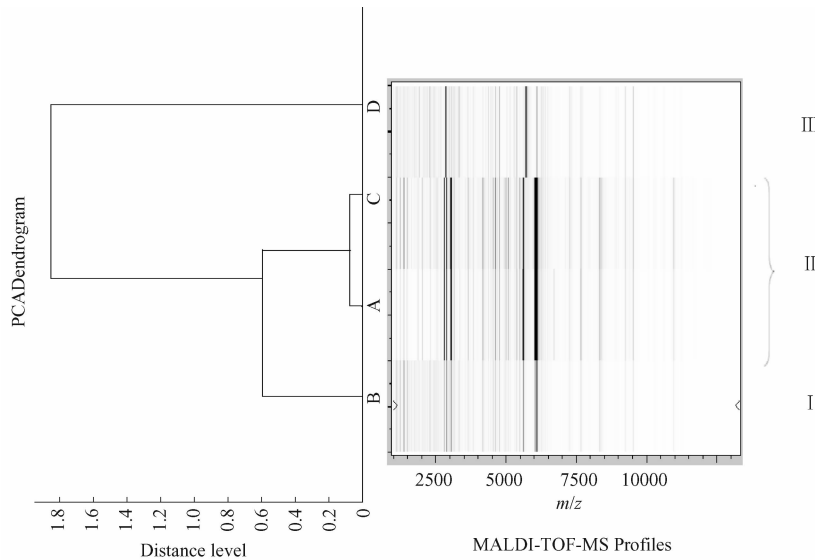
LN-CG-5、LN-1-2 和 SY-60 的 46 项生化特征的比较发现,4 株菌株的某些生化鉴定结果存在一定差异,其中 AS-37 与 LN-CG-5 的生化鉴定结果基本一致, LN-1-2 有 5 项生化鉴定结果(甘氨酸、*D*-甘露醇、半乳糖醛酸、*L*-阿拉伯糖、鸟苷酸)与其他 3 株不一致, SY-60 有 4 项生化鉴定结果(*L*-精氨酸、*L*-谷氨酸、乙酸、枸橼酸)与其他 3 株不一致。即:AS-37 和 LN-CG-5 生化特征相近, LN-1-2, SY-60 分别与 AS-37 和 LN-CG-5 有一定差异。

经过血清分型后确定 SY-60、AS-37、LN-1-2、LN-CG-5 均为  $O_{1,9,12}H_{g,m}$ , 其中 SY-60 和 AS-37 分离自食品, LN-1-2 和 LN-CG-5 来自食源性疾病监测点, 并且它们来自辽宁省不同地区, 其来源地代码分别为 a、c、e、b(表 1)。根据这一特殊性, 应用 MALDI-TOF-MS 的鉴定软件 Biotyper™ 对 4 株肠炎

沙门菌进行基于蛋白质图谱的聚类分析, 见图 2。观察其聚类分析图发现: 4 株菌株被分为 3 个 MALDI-TOF 型。其中, AS-37 与 LN-CG-5 属于 MALDI-TOF 型 II, LN-1-2 属于 MALDI-TOF 型 I, SY-60 属于 MALDI-TOF 型 III。

应用 MALDI-TOF-MS 的鉴定软件 Biotyper™ 对上述 4 株肠炎沙门菌进行重复性为 3 次的主成分分析, 见图 3。分析结果表明, 4 株菌株分属 3 个不同平面, 其中 AS-37 与 LN-CG-5 处于同一平面, 并与 LN-1-2 和 SY-60 在空间上相隔较远。所以, 4 株菌株之间是存在差异的。由此推断, AS-37、LN-CG-5 与 LN-1-2 和 SY-60 可能不是同一菌株来源, 但 AS-37 与 LN-CG-5 亲缘关系相对较近, AS-37、LN-CG-5 与 LN-1-2 和 SY-60 差异较大。

生化鉴定结果和 MALDI-TOF-MS 聚类分析及

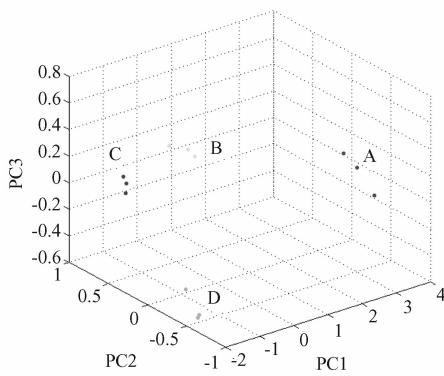


A:AS-37; B:LN-1-2; C:LN-CG-5; D:SY-60

注:图中左侧为 4 株肠炎沙门菌的聚类分析图,右侧为蛋白剖面图。

图 2 4 株肠炎沙门菌 MALDI-TOF-MS 的聚类分析与蛋白剖面图

Figure 2 MALDI-TOF-MS profiles and dendrogram of four *Salmonella enteritidis*



A:LN-1-2; B:AS-37; C:LN-CG-5; D:SY-60

图 3 4 株肠炎沙门菌的重复性为 3 次的主成分分析三维散点图

Figure 3 Principal Component analysis of *Salmonella enteritidis*

主成分分析结果具有一致性。由此推断 AS-37 与 LN-CG-5 亲缘关系相对较近, AS-37、LN-CG-5 与 LN-1-2 和 SY-60 可能不是同一菌株来源, 4 株肠炎沙门菌存在差异。由上述实验结果初步推断 MALDI-TOF-MS 可以准确鉴定 4 株肠炎沙门菌, 并能区分同种菌株间的微小差异。所以, MALDI-TOF-MS 技术可能为沙门菌分型溯源提供一种新的手段。

### 3 讨论

4 种沙门菌的培养基获得的图谱经匹配性分析后, NA 的平均分值高于其他 3 种培养基, 经统计学数据分析后, 表明用 NA 培养的菌株其图谱与数据库匹配程度相对高。所以, 确定 NA 为适宜 MALDI-

TOF-MS 分析的沙门菌培养基。由此, 笔者认为是否能成为适宜 MALDI-TOF-MS 分析的细菌培养基主要取决于所得质谱图与数据库的匹配程度。MALDI-TOF-MS 对 26 株沙门菌在属水平的鉴定结果反映了 MALDI-TOF-MS 具备对属以上菌株鉴定的能力。对沙门菌而言, 血清型与种的含义等同, 即沙门菌血清学分型就是在种水平上的鉴定。本实验对 2008 年辽宁地区食源性疾病监测系统的 16 株沙门菌进行 MALDI-TOF-MS 的种水平鉴定, 鉴定结果与其血清分型结果一致。国内相关文献中王晔茹等<sup>[8]</sup>对腹泻患者粪便分离的 88 株沙门菌进行 MALDI-TOF-MS 分型、血清分型、耐药谱分型、PFGE 分型之间的结果比较。主要结论是: MALDI-TOF-MS 分型与血清型的符合率不如 PFGE 与血清型的符合率。由于 MALDI-TOF-MS 分析的主要是细菌细胞表面的蛋白和多糖, 而血清分型分析的主要是细菌表面的蛋白, 所以理论推测两者的分析结果应当很接近, 本文的结论也初步验证了这一点。但是, 目前基质解吸的机制尚未明确, 各型号 MALDI-TOF-MS 质谱仪鉴定水平的差异可能导致王晔茹文中的血清型结果与 MALDI-TOF-MS 鉴定结果不符的情况。因此, MALDI-TOF-MS 基质解吸机制和 MALDI-TOF-MS 菌株数据库资源扩增等影响鉴定的因素尚需深入研究。对 4 种血清型的菌株进行 MALDI-TOF-MS 的蛋白峰信息的分析, 发现了 4 个种的菌株蛋白峰的微小差异, 4 株菌株的不同蛋白峰值揭示了同属不同种间的差异。国外相关报道中 Dieckmann 等<sup>[9]</sup>, 对属于沙门菌属的 3 个种的 128 株菌株进行 MALDI-TOF-MS 的快速分型和鉴



定,建立了快速获得鉴定结果的方法,并筛选了沙门菌中,“属、种、亚种的特异性生物标记”。由于本研究受到菌株数量限制,某些菌株的独有蛋白峰是否可以称之为其“种的特异性生物标记”有待扩大菌株数量后进一步确证。4 株肠炎沙门菌的生化鉴定结果显示:4 株肠炎沙门菌有差异。MALDI-TOF-MS 的聚类分析与主成分分析结果与生化鉴定结果相近。4 株肠炎沙门菌总体存在差异,并且分布于辽宁省 4 个不同地区,所以其同源关系较远,属于散在的分布,没有集中趋势,尚未构成流行病暴发的威胁。这对辽宁地区沙门菌的分型溯源意义重大。本研究结果初步显示,MALDI-TOF-MS 技术能够准确鉴定实验菌株至种水平,MALDI-TOF-MS 的鉴定结果与血清分型结果具有极大的相关性,可能是一种有效的沙门菌的分型鉴定手段。

沙门菌血清型有 2000 多种,致病性强,是食品安全的隐患。目前,沙门菌的检测和鉴定方法有很多,主要是传统的细菌生化鉴定及分子生物学方法等。尽管如此,这些方法仍无法满足当今对微生物准确、快速、高通量的鉴定要求。相比之下,MALDI-TOF-MS 技术的优势十分明显,不但样品的解吸具有极高的稳定性,而且在数据库资源充足的前提下,还可以实现菌株鉴定的全能性。另外,菌株的预处理过程快速简便,仪器自动化程度高,可以实现 96 孔的高通量分析,每孔鉴定结果的获得不超过 5min,操作简便安全,结果准确。以上这些优点,是现存任何一种方法都无法比拟的。但是,在 MALDI-TOF-MS 技术的应用中,某些因素会制约鉴定结果的准确性。如样品处理标准化、基质的选择、培养条件的控制、数据库的构建和完善以及开发实用的

生物信息学工具软件等问题<sup>[10]</sup>的影响。可以预言,那些制约及影响 MALDI-TOF-MS 分析的问题一旦解决,该技术将在食源性致病菌鉴定领域发挥潜能,并且必将在食品安全检测、食品安全控制、环境污染控制、微生物保藏的质量控制、兽医和医学诊断等领域发挥重要作用,为人类生命健康造福。

#### 参考文献

- [1] 李业鹏. 美国食品安全系统[J]. 中国食品卫生杂志, 2001, 13(4): 44-49.
- [2] 黄文字,柳陈坚. 食源性沙门氏菌检测方法的研究进展[J]. 生物技术, 2009, 19(3): 95-98.
- [3] 张河战. 沙门氏菌的分类、命名及中国沙门氏菌型分布[J]. 微生物免疫学进展, 2002, 30(2): 74-76.
- [4] 董军华,段袁旭. 沙门氏菌检测方法的探讨[J]. 应用技术, 2004, 25(2): 184-185.
- [5] 马莉,高永军,王子军,等. 2009 年全国其他感染性腹泻报告病例分析[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(7): 658-661.
- [6] FENSELAU C, DEMIREV P A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry [J]. Mass Spectrometry Reviews, 2001, 20(4): 157-171.
- [7] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789. 4—2010 食品微生物学检验沙门氏菌检验[S]. 北京:中国标准出版社, 2010.
- [8] 王晔茹,崔生辉,李凤琴. 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱在沙门菌检测和鉴定分型中的应用研究[J]. 卫生研究, 2008, 37(6): 685-689.
- [9] DIECKMANN R, HELMUTH R, ERHARD M, et al. Rapid classification and identification of *Salmonellae* at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry [J]. App Environ Microbiol, 2008, 74(24): 7767-7778.
- [10] 其布勒哈斯,田世民,邹明强,等. MALDI-TOF 蛋白质指纹图谱在食源性致病菌鉴定中的应用[J]. 化学试剂, 2008, 30(增刊): 103.

### 公告栏

## 中华人民共和国卫生部公告

2010 年第 16 号

根据《中华人民共和国食品安全法》规定,经审核,现批准葡萄皮红等 18 种食品添加剂扩大使用范围、使用量。

特此公告。

附件:葡萄皮红等 18 种扩大使用范围、使用量的食品添加剂(略)

二〇一〇年十月二十一日