

实验技术与方法

水产品中溶藻弧菌基质辅助激光解吸电离
飞行时间质谱快速鉴定方法建立赵晓娟,汪琦,王紫薇,徐蕾蕊,刘莉,韩笑,曾静
(北京海关,北京 100026)

摘要:目的 建立水产品中溶藻弧菌的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)的快速鉴定方法。方法 以溶藻弧菌标准菌株(CICC 10889)为研究对象,采集不同样品处理方法(直接涂抹法和甲酸提取法)、激光强度和菌株传代次数的MALDI-TOF MS图谱并加以分析比较,探讨上述因素对方法准确性的影响。将溶藻弧菌标准菌株(CICC 10889)的MALDI-TOF MS图谱主产物(MSP)添加到数据库中,使用36株分离菌株及8株与溶藻弧菌近缘的弧菌标准菌株验证数据库的补充对鉴定结果可信度的影响。结果 甲酸提取法处理所得图谱特征峰多、基线平滑、信噪比高,图谱质量优于直接涂抹法;激光强度对MALDI-TOF MS图谱有影响,过高或过低均会导致图谱质量的下降;标准菌株补充数据库后可提高鉴定可信度,分离株的鉴定分值均达到2.300以上;传代次数对鉴定结果没有影响。结论 MALDI-TOF MS方法可将溶藻弧菌准确鉴定到种水平。该方法准确、可靠,可用于溶藻弧菌的快速鉴定。

关键词:溶藻弧菌;基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;鉴定;影响因素;水产品

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2018)06-0586-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2018.06.007

Rapid identification of *Vibrio alginolyticus* using matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry

ZHAO Xiaojuan, WANG Qi, WANG Ziwei, XU Leirui, LIU Li, HAN Xiao, ZENG Jing
(Beijing Customs, Beijing 100026, China)

Abstract: Objective To establish a rapid identification method of *Vibrio alginolyticus* using matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Methods** The effect of different sample pretreat method (direct smear method and formic acid extraction method), laser intensity and times of subculture on the quality of spectrum was investigate using the reference strain CICC 10889. The impact of database on identification result was evaluate by comparing the identification result (species and Logscore) of 36 isolated strains before and after adding the main spectra product (MSP) of CICC 10889 to the database. **Results** The formic acid extraction method was better than the direct smear method. Spectra of ethanol/formic acid treatment got more characteristic peak of protein with smooth baseline, less noise and higher signal-noise ratio. Laser intensity could affect spectra. High quality spectra could be obtained when the laser intensity was appropriate. Database was the most important impact factor. The Logscore of identification result was improved greatly by adding the in-house database, score of isolated strains were all above 2.300. Times of subculture had no effect on spectra. **Conclusion** MALDI-TOF MS could accurately identify *Vibrio alginolyticus* to the species level. The established MALDI-TOF MS method was accurate and constant and could be used to identify *Vibrio alginolyticus* rapidly.

Key words: *Vibrio alginolyticus*; matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry; identification; influencing factors; aquatic products

收稿日期:2018-09-17

基金项目:“十三五”国家重点研发计划(2016YFD0401102);国家质检总局科技计划项目(2017IK145);北京检验检疫技术中心自立科研课题(2017JK008)

作者简介:赵晓娟 女 工程师 研究方向为食品安全与微生物检测 E-mail:zhaobj@bjciq.gov.cn

通信作者:曾静 女 研究员 研究方向为食品安全与微生物检测 E-mail:zengj@bjciq.gov.cn

溶藻弧菌广泛存在于河口、海湾、近岸海域的海水和海洋动物体内,是海水养殖鱼、虾、贝类等海洋动物的重要病原菌^[1-3]。人类进食被溶藻弧菌污染的食品能够引起急性胃肠炎,严重者还可引起败血症^[4-5]。由溶藻弧菌引起的暴发型食物中毒事件时有发生^[6],因此,作为一种致腹泻菌和影响食品安全的病原菌,溶藻弧菌日益受到重视。

目前,我国国家标准中还没有溶藻弧菌的检测

方法。水产品中溶藻弧菌的检测主要采用传统的微生物鉴定方法和分子生物学方法^[7-8]。常用的分离培养基有硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖(TCBS)琼脂培养基和科玛嘉弧菌显色培养基,溶藻弧菌在TCBS琼脂平板上的典型菌落呈圆形、凸起、光滑、边缘整齐黄色菌落;在科玛嘉弧菌显色培养基上的典型菌落呈圆形、扁平的白色菌落^[9]。传统的细菌培养鉴定方法结果准确、可靠,但耗时长,不适合高通量检测。自动微生物检测仪在鉴定弧菌时易出现假阳性、假阴性,常常无法准确鉴定^[10]。近年来很多学者应用普通聚合酶链式反应(PCR)和荧光定量PCR方法对溶藻弧菌进行快速检测,例如SN/T 1870—2016《出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光PCR法》^[11]中对溶藻弧菌的实时荧光PCR法鉴定,这些方法敏感性高,特异性强。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是近年来发展的一种新型的微生物鉴定技术^[12]。通过分析待测菌株蛋白质组成获得特征性的指纹图谱,与数据库中标标准菌株指纹图谱进行比较,从而鉴定细菌至属、种,乃至亚种的水平^[13],因此数据库中是否存在与待测菌相同菌种的谱图,是准确鉴定的基本条件。MALDI-TOF MS方法具有操作简单、快速、高通量、准确度高等优点,已广泛应用于病原微生物的诊断和监测。但MALDI-TOF MS鉴定结果受样品处理方法、仪器参数设置以及数据

库完善程度等因素影响。为保证鉴定结果的准确,需优化试验条件,以减少上述因素的影响^[14-15]。已有研究^[16-18]表明样品处理方法,如细菌的培养条件和时间、蛋白质提取方法步骤以及点样的方法等均会造成质谱图中峰点和峰强度、信噪比等参数的差异。MATSUDA等^[19]研究MALDI-TOF MS对临床葡萄球菌菌种鉴定方法,发现样品制备方法是影响蛋白质图谱的重要因素,不同样品制备方法差异明显($P < 0.05$);江连洲等^[20]以蜡样芽胞杆菌为研究对象,探究不同样品处理方法及数据库的补充对MALDI-TOF MS鉴定结果的影响,发现不同样品处理方法对蛋白质指纹图谱影响较大,数据库的补充可提高该菌鉴定可信度。本试验拟通过比较样品处理方法、数据库完善和传代次数对溶藻弧菌鉴定结果的影响,加深对MALDI-TOF MS方法的理解并建立准确可靠的溶藻弧菌MALDI-TOF MS鉴定程序。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

本试验所用菌株包括9株标准菌株和36株溶藻弧菌分离菌株。标准菌株信息详见表1。36株分离菌株为实验室从水产品中分离得到,经*rpoB*基因测序确定为溶藻弧菌^[9]。

表1 标准菌株信息表

Table 1 Information of reference strains

菌株编号	名称	菌株来源
CICC 10889	溶藻弧菌 (<i>Vibrio alginolyticus</i>)	中国工业微生物菌种保藏管理中心
ATCC 17802	副溶血性弧菌 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	美国微生物菌种保藏中心
CGMCC 1.1997	副溶血性弧菌 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	中国普通微生物菌种保藏管理中心
ATCC 27562	创伤弧菌 (<i>Vibrio vulnificus</i>)	美国微生物菌种保藏中心
CGMCC 1.1758	创伤弧菌 (<i>Vibrio vulnificus</i>)	中国普通微生物菌种保藏管理中心
CGMCC 1.1969	拟态弧菌 (<i>Vibrio mimicus</i>)	中国普通微生物菌种保藏管理中心
CGMCC 1.1612	弗尼斯弧菌 (<i>Vibrio furnissii</i>)	中国普通微生物菌种保藏管理中心
CGMCC 1.1611	河弧菌 (<i>Vibrio fluvialis</i>)	中国普通微生物菌种保藏管理中心
CICC 23794	霍乱弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>)	中国工业微生物菌种保藏管理中心

1.1.2 主要仪器与试剂

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(Microflex LT,德国Bruker)、恒温培养箱、台式离心机。

血平板(美国赛默飞世尔)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid, CHCA,美国Sigma)、细菌检测标准品(德国Bruker)、甲酸、乙腈、无水乙醇。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养条件

依据陈峰等^[18]的研究结果,当菌株培养条件与

建库条件一致时,MALDI-TOF MS的鉴定效果最佳。参照布鲁克数据库中溶藻弧菌标准菌株建库时的培养条件,所有菌株培养条件为血平板30℃培养24h。

1.2.2 样品处理方法选择

MALDI-TOF MS有两种常用样品处理方法,直接涂抹法和甲酸提取法。分别采取这两种方法对溶藻弧菌标准菌株(CICC 10889)的培养物进行处理,评估这两种样品处理方法对鉴定结果的影响。

直接涂抹法:取少量菌体,均匀涂布在靶板的一个靶点上,形成一个薄层。待菌体室温干燥后覆

盖 1 μl CHCA 溶液并自然晾干。

甲酸提取法:取 3~5 个溶藻弧菌单克隆,重悬于 300 μl 去离子水。加入 900 μl 无水乙醇,振荡器上混匀。12 000 $\times g$ 离心 2 min,倒出上清液后继续 12 000 $\times g$ 离心 1 min。吸弃上清液,室温放置 5 min 以干燥沉淀。在沉淀中加入 30~50 μl 70% 甲酸溶液,充分重悬细菌沉淀,再加入等体积乙腈。振荡器混匀后 12 000 $\times g$ 离心 2 min。取 1 μl 上清液点到靶板上,待干燥后在靶点上加 1 μl CHCA 溶液。自然干燥后上机操作。

1.2.3 仪器激光强度的设置

将溶藻弧菌标准菌株(CICC 10889)划线培养,甲酸提取法提取蛋白质后点样。在不同激光强度(20%,30%,40%,50%)下采集图谱。

1.2.4 MALDI-TOF MS 数据采集及结果判定

运用 FlexControl 软件采集样品数据[选择线性操作模式,正离子模式;检测范围:2 000~20 000 Da;激光点击数:每图谱 40 次(6 次激光累积);激光频率:60.0 Hz;离子源加速电压:20 kV;质量为 2~20 kDa],获得样品质谱图谱。BioTyper 软件将采集样品图谱与数据库中标标准图谱比对,根据匹配度得分判定结果。得分 2.300~3.000 表示菌种鉴定可信度较高,2.000~2.299 表示可信的菌属鉴定和可能的菌种鉴定,1.700~1.999 表示可能菌属鉴定,0.000~1.699 表示鉴定结果不可信。

1.2.5 MALDI-TOF MS 数据库的补充

甲酸提取法提取溶藻弧菌标准菌株(CICC 10889)的蛋白质,重复点样 8 次,每个靶点采集 3 张质谱图,使用 FlexAnalysis 软件分析获得的 24 张质谱图,除去低质量图谱,应用 BioTyper OC 软件将 20 张以上有效图谱(若 < 20 张,重复试验)形成主

产物(main spectra product, MSP)并添加到自建库中。

1.2.6 传代次数对 MALDI-TOF MS 鉴定结果的影响

将溶藻弧菌标准菌株(CICC 10889)划线接种血平板,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 条件下传代培养 3 次,每次传代后均取 3 个单菌落用最佳样品处理方法处理,以比较同批次及不同批次 MALDI-TOF MS 鉴定一致性。

1.3 统计学分析

本试验采用 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 样品处理方法选择

直接涂抹法和甲酸提取法处理得到的溶藻弧菌标准菌株(CICC 10889)可信度得分均在 2.000~2.299 之间,未能达到准确鉴定至种的水平。统计学分析结果表明,甲酸提取法与直接涂抹法比较在数据库补充前的可信度得分差异无统计学意义($P > 0.05$),但蛋白质峰数量差异有统计学意义($P < 0.05$)(见表 2),且甲酸提取法得到的蛋白质指纹图谱基线平滑、峰强度高、信噪比高(见图 1),因此,选用甲酸提取法作为样品蛋白质提取方法。

表 2 不同处理方法下 MALDI-TOF MS 鉴定结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Detection results of MALDI-TOF MS by different pre-treatments

样品处理方法	蛋白质峰数量	数据库补充前可信度分数	数据库补充后可信度分数
直接涂抹法	80.83 \pm 8.86	2.064 \pm 0.079	2.217 \pm 0.100
甲酸提取法	91.33 \pm 6.68*	2.139 \pm 0.059	2.551 \pm 0.045*

注:以直接涂抹法为对照组,*表示蛋白质峰数量及数据库补充后可信度得分差异有统计学意义($P < 0.05$)

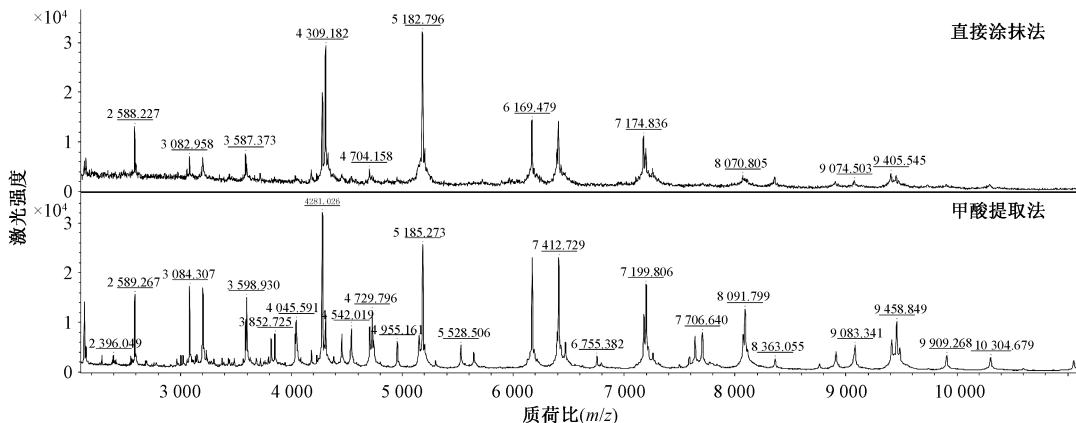


图 1 不同处理方法对溶藻弧菌标准菌株蛋白质指纹图谱的影响

Figure 1 Effect of different pre-treatments on protein mass spectrometric profiles of *Vibrio alginolyticus*

2.2 激光强度的选择

不同激光强度下采集的图谱如图 2 所示,激光强度过小,可导致谱峰信号值低、基线较高,特征峰

被淹没;激光强度过大,则蛋白质谱峰信号过高,可导致主峰过饱和,使谱峰变形,且浪费光源。溶藻弧菌在激光强度 35%~45% 条件下,图谱一致性最

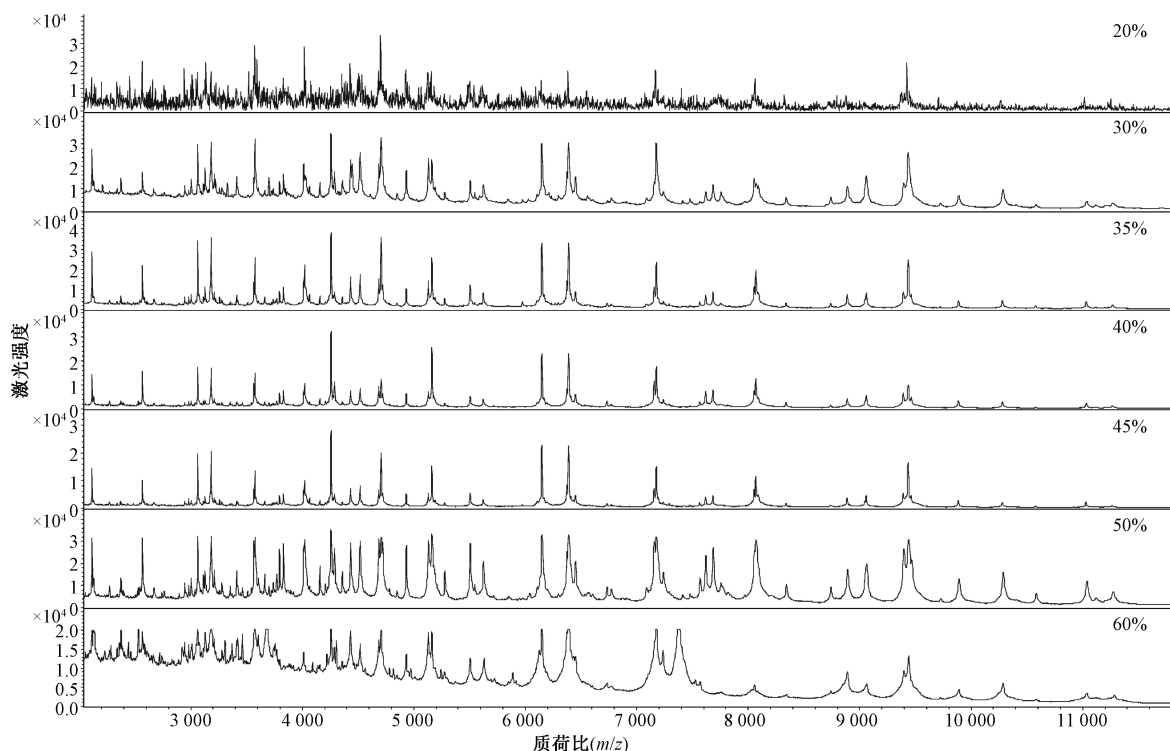


图2 不同激光强度对溶藻弧菌标准菌株蛋白质指纹图谱的影响

Figure 2 Effect of different laser intensity on protein mass spectrometric profiles of *Vibrio alginolyticus*

高。激光强度对图谱质量存在影响,因此,在采集图谱前,应确定最适激光强度范围。

2.3 MALDI-TOF MS 数据库补充对鉴定结果的影响

从表2结果可以看出,即使用效果较好的甲酸提取法处理,溶藻弧菌标准菌株(CICC 10889)的鉴定分值仍然低于2.300。36株溶藻弧菌分离菌株的可信度得分也较低,32株菌株得分在2.300以下,达不到准确鉴定到种的要求(见表3),说明布鲁克原有的数据库并不能满足溶藻弧菌的鉴定要求。

这是由于布鲁克提供的数据库中溶藻弧菌的图谱与本试验采集到的溶藻弧菌标准菌株(CICC 10889)及36株溶藻弧菌分离菌株的图谱差异较大造成的。在布鲁克公司提供的最新的数据库中,与CICC 10889图谱最相近的标准菌株是DSM 2171T。CICC 10889图谱与DSM 2171T图谱中大部分蛋白质峰一致,但是CICC 10889的蛋白质峰明显比DSM 2171T多(见图中红色蛋白质峰),见图3;因此,采集溶藻弧菌标准菌株(CICC 10889)的图谱信息补充数据库。

表3 36株分离菌株和8株标准菌株MALDI-TOF MS鉴定结果

Table 3 Detection results of 36 strains and 8 standard strains of isolates by MALDI-TOF MS

菌株编号	鉴定结果	可信度得分	
		数据库补充前	数据库补充后
32株分离菌株	溶藻弧菌(<i>Vibrio alginolyticus</i>)	1.941~2.294	2.311~2.564
4株分离菌株	溶藻弧菌(<i>Vibrio alginolyticus</i>)	2.307~2.397	2.380~2.511
ATCC 17802	副溶血性弧菌(<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	2.187	2.187
CGMCC 1.1997	副溶血性弧菌(<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	2.118	2.118
ATCC 27562	创伤弧菌(<i>Vibrio vulnificus</i>)	2.403	2.403
CGMCC 1.1758	创伤弧菌(<i>Vibrio vulnificus</i>)	2.432	2.432
CGMCC1.1969	拟态弧菌(<i>Vibrio mimicus</i>)	1.748	1.748
CGMCC 1.1612	弗尼斯弧菌(<i>Vibrio furnissii</i>)	2.097	2.097
CGMCC 1.1611	弗尼斯弧菌(<i>Vibrio furnissii</i>)	1.997	1.997
CICC 23794	易北河弧菌(<i>Vibrio albensis</i>)	1.536	1.536

数据库补充后,36株溶藻弧菌分离菌株及8株与溶藻弧菌近缘的弧菌标准菌株鉴定结果见表3。36株分离菌株均准确鉴定为溶藻弧菌,且鉴定得分均在2.300以上,满足了将溶藻弧菌鉴定到种的要

求。8株与溶藻弧菌近缘的弧菌标准菌株虽然有些鉴定结果与预期不符,如河弧菌(CG MCC 1.1611)错误鉴定为弗尼斯弧菌、霍乱弧菌(CICC 23794)错误鉴定为易北河弧菌,但是都没有错误鉴定为溶藻

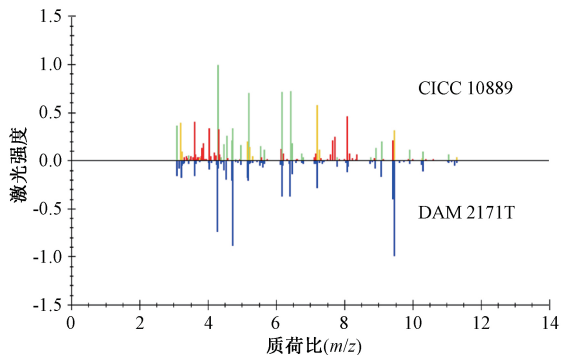


图3 溶藻弧菌标准菌株(CICC 10889)图谱与布鲁克数据库比对结果

Figure 3 Comparison of *Vibrio alginolyticus* CICC 10889 and Bruker database maps

弧菌。

数据库补充前后溶藻弧菌分离株 MALDI-TOF MS 可信度得分差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 识别能力提高 88.89% (32/36)。说明 MALDI-TOF MS 数据库的补充可提高溶藻弧菌鉴定可信度, 而溶藻弧菌数据库的补充对其他近缘弧菌标准菌株得分没有影响。

2.4 传代次数对 MALDI-TOF MS 鉴定结果的影响

溶藻弧菌标准菌株 (CICC 10889) 同一传代次数不同菌落及不同传代次数鉴定结果见表 4。同一传代次数 3 个菌落平行样可信度得分接近, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 不同传代次数可信度得分也差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 MALDI-TOF MS 方法稳定性较好, 同批次及不同批次鉴定结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表4 不同传代次数 MALDI-TOF MS 鉴定结果

Table 4 MALDI-TOF MS identification results of different generations

菌落平行样	不同传代次数溶藻弧菌可信度得分		
	1	2	3
1	2.576	2.512	2.522
2	2.569	2.579	2.586
3	2.553	2.521	2.549

3 讨论

以细菌表面蛋白质为检测对象的 MALDI-TOF MS 技术是近年来发展起来的一种全新的微生物检测技术, 因其具有操作简单、快速、低成本和高通量等优点, 已成为临床诊断、环境监测以及食品加工质量控制的重要方法^[21]。在绝大多数情况下, MALDI-TOF MS 方法可正确鉴定微生物到属、种甚至是亚种水平, 且具有可重复性, 满足微生物实验室鉴定的需求。在某些情况下, 如近源菌株图谱相似程度较高时, MALDI-TOF MS 方法也会出

现匹配分数较低甚至是鉴定错误的情况^[22]。此外, 样品处理方法、仪器参数设置、尤其是数据库的完善程度对鉴定结果影响较大。

数据库的完善程度对于 MALDI-TOF MS 鉴定结果的准确性最为重要。数据库中图谱的质量、数量都将直接影响鉴定的成功率与准确率。在没有补充数据库前, 虽然溶藻弧菌标准菌株和分离菌株都能鉴定为溶藻弧菌, 而与溶藻弧菌近源的 8 株其他弧菌的标准菌株都没有鉴定为溶藻弧菌, 但是由于本试验采集的溶藻弧菌图谱与布鲁克数据库中溶藻弧菌标准菌株的图谱存在差异, 导致溶藻弧菌标准菌株 (CICC 10889) 和 88.89% (32/36) 的分离菌株的鉴定分值介于 2.000 ~ 2.299 之间。按照布鲁克的判定标准, 为准确的属的鉴定, 可能的种的鉴定, 达不到鉴定到种的水平。而用溶藻弧菌标准菌株 (CICC 10889) 补充数据库后, 36 株溶藻弧菌分离菌株都能被准确鉴定到种。这也再次验证了实验室在原有数据库基础上补充建立本地病原微生物的质谱指纹图谱库, 不仅可以提供更多的可供比对的菌株图谱, 还可以降低仪器和试剂带来的影响, 可以有效提高鉴定成功率。目前用更多的标准菌株扩充数据库已成为提高鉴定效果的一种常规手段^[23-26]。

除数据库外, 样品处理方法也会影响鉴定结果。直接涂抹法的优点是操作简单、省时, 缺点是受涂布菌量的多少和均匀程度的影响, 图谱重复性不好, 鉴定结果不稳定, 有时由于图谱质量差还会导致鉴定错误和无法鉴定的情况出现。甲酸提取法虽然操作较直接涂抹法复杂, 但样品蛋白质与基质的结晶均一, 图谱蛋白质峰数量、重复性及可信度分值均好于直接涂抹法。此外, 当数据库不完善时, 甲酸提取法的鉴定效果与直接涂抹法的鉴定效果差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但是当数据库完善后, 甲酸提取法的鉴定效果明显优于直接涂抹法。

质谱仪的激光强度也会影响图谱质量。不同种类的菌株所需的最适激光强度有差别, 而且随着仪器使用的时间和频率, 质谱仪的激光器会发生损耗导致激光强度降低, 因此, 建议在大规模采集数据之前, 先预先摸索菌株的最适激光强度, 确保图谱质量。

综上所述, 本试验比较了溶藻弧菌样品处理方法、激光强度和数据库完善对鉴定结果的影响。试验显示, 数据库是否完善是将细菌准确鉴定到种的关键因素, 而甲酸提取法的鉴定效果明显优于直接涂抹法。补充数据库后, 使用甲酸提取法, 可将溶藻弧菌准确鉴定到种的水平。该方法准确、稳定, 可用于溶藻弧菌的快速鉴定。

参考文献

- [1] CHANG C C, YEH M S, LIN H K, et al. The effect of *Vibrio alginolyticus* infection on caspase-3 expression and activity in white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25(5):672-678.
- [2] LIU P C, LIN J Y, HSIAO P T, et al. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2004, 44(1):23-28.
- [3] RIQUELME C, TORANZO A E, BARJA J L, et al. Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*) [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1996, 67(3):213-218.
- [4] DUNN J D, REID G E, BRUENING M L. Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry [J]. Mass Spectrometry Reviews, 2010, 29(1):29-54.
- [5] CUI M, ZHANG Q, YAO Z, et al. Immunoglobulin M gene expression analysis of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, following heat shock and *Vibrio alginolyticus* challenge [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 29(6):1060-1065.
- [6] 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, 15(4):331-334.
- [7] 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.
- [8] 汪笑宇, 周遵春, 关晓燕, 等. 仿刺参及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.
- [9] 赵晓娟, 汪琦, 王紫薇, 等. 海产品中溶藻弧菌的分离及多种方法鉴定效果的比较[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(6):671-675.
- [10] 郭静, GADAFII L, 郭安南, 等. 溶藻弧菌相关分离株的分子及 VITEK 鉴定[J]. 水产学报, 2012, 36(3):383-389.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法:SN/T 1870—2016[S]. 北京:中国标准出版社, 2016.
- [12] PATEL R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases[J]. Clin Chem, 2015, 61(1):100-111.
- [13] DOERN C D. Integration of technology into clinical practice[J]. Clin Lab Med, 2013, 33(3):705-729.
- [14] VELOO A C M, ELGERSMA P E, FRIEDRICH A W, et al. The influence of incubation time, sample preparation and exposure to oxygen on the quality of the MALDI-TOF MS spectrum of anaerobic bacteria[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2014, 20(12):1091-1097.
- [15] 赵贵明, 刘洋, 陈颖, 等. 克罗诺杆菌 MALDI-TOF-MS 数据库的建立及应用[J]. 食品科学, 2014, 35(8):105-110.
- [16] VALENTINE N, WUNSCHER S, WUNSCHER 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.
- [17] LOFF M, MARE L, DE KWAADSTENIET M. 3M™ molecular detection system versus MALDI-TOF mass spectrometry and molecular techniques for the identification of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. & *Listeria* spp. [J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 101(3):33-43.
- [18] 陈峰, 张丹丽, 宛宝山, 等. 不同培养基与前处理方法对副溶血弧菌 MALDI-TOF MS 鉴定结果的影响评估[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(4):264-267.
- [19] MATSUDA N, MATSUDA M, NOTAKE S, et al. Evaluation of a simple protein extraction method for species identification of clinically relevant *Staphylococci* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(12):3862-3866.
- [20] 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胞杆菌研究与应用[J]. 东北农业大学学报, 2016, 47(12):56-64.
- [21] 龚艳清, 陈信忠, 郭书林, 等. MALDI-TOF-MS 方法检测、鉴定副溶血性弧菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(2):521-527.
- [22] WANG Q, ZHAO X J, WANG Z W, et al. Identification of *Cronobacter* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry with an optimized analysis method[J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 139(5):172-180.
- [23] XIAO D, YE C, ZHANG H, et al. The construction and evaluation of reference spectra for the identification of human pathogenic microorganisms by MALDI-TOF MS [J]. PLoS One, 2014, 9(9):e106312.
- [24] ERLER R, WICHELS A, HEINEMEYER E A, et al. VibrioBase: a MALDI-TOF MS database for fast identification of *Vibrio* spp. that are potentially pathogenic in humans [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2015, 38(1):16-25.
- [25] OLIVEIRA M M E, SANTOS C, SAMPAIO P, et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex [J]. Research in Microbiology, 2015, 166(2):102-110.
- [26] SOGAWA K, WATANABE M, ISHIGE T, et al. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using MALDI-TOF mass spectrometry [J]. Biocontrol Science, 2015, 22(3):163-169.