

论著

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测与鉴定食品真菌的研究

李凤琴¹ 吴多加¹ 武淑真² 李玉伟¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021;

2. 中国医学科学院基础医学研究所,北京 100730)

摘要:目的 对基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)检测与鉴定常见食品真菌进行探索。方法 对MALDI-TOF-MS检测食品真菌所用基质、基质与样品比例、上样方法等进行筛选,获得优化的实验条件,并对方法的重现性和实际应用进行研究。结果 MALDI-TOF-MS分析不同属真菌所需的最适基质各异,红曲霉属与镰孢菌属最适基质均是MBT;曲霉属、青霉属与酵母菌的最适基质均是IAA;上样的最适基质/样品比例为1:1;混合液滴干燥法为最佳上样方法。结论 MALDI-TOF-MS直接分析真菌的方法稳定、重现性好。

关键词:光谱法,质量,基质辅助激光解吸电离,真菌,化学,分析

Detection and Identification of Fungi by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

LI Feng-qin, WU Duo-jia, WU Shu-zhen, LI Yu-wei

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To examine and identify fungi with important significance in food safety by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). **Method** Sample preparation, screening of appropriate matrix for specific fungal analysis, suitable ratio of matrix to sample, methods for loading samples on mass spectrometer sample tray and repeatability were investigated to optimize the parameters for fungal detection and identification by MALDI-TOF-MS.

Results The results showed that different genus of fungi owned their proper matrix in sample preparation: MBT for both *Monascus* and *Fusarium* species, IAA for *Aspergillus* and *Penicillium* species as well as yeast, respectively. The optimum ratio of matrix to sample was 1:1 (v/v). Dried droplet is the best choice for applying sample on sample tray of the mass spectrometer. **Conclusion** MALDI-TOF-MS is of stability and repeatability characteristics in detecting and identifying fungus.

Key word: Spectrometry, Mass, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization; Fungi; Chemistry, Analytical

真菌的分类鉴定技术一直是国内外研究的焦点。根据大体形态和显微镜下特征进行真菌分类与鉴定是目前国内普遍使用的方法,该方法虽然直观、无需特殊仪器,但鉴定周期长、时效性差。近年来发展起来的免疫学和分子生物学技术虽然灵敏、快速,但交叉反应严重、假阳性或假阴性率高、缺乏特异性。此外,上述技术均不能对同一菌种产毒和非产毒、耐药和非耐药菌株进行鉴别,也不能对同一菌种不同株间的致病性和菌株本身的毒力特征进行确证,更不能揭示菌体细胞活动直接的分子基础,因此在一定程度上限制了在真菌研究中的应用和发展。

现代科学技术的发展使化学与微生物学间的学

科界限在逐渐缩小,化学技术手段越来越多地被用于解决微生物学问题。20世纪80年代末,以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)和电喷雾电离串联质谱为代表的生物质谱分析技术首次引入食品安全领域食源性疾病的监测和控制。即通过分析来源于完整细胞的生物标记物——标志蛋白和关键蛋白,获得目的微生物细胞完整、大量、动态的蛋白质谱图,根据微生物各自蛋白质谱的不同和蛋白质谱图的动态变化,对食物链中污染的各种致病性微生物进行筛选、分类、鉴定并对其特征进行描述。到目前为止,该技术已广泛用于生物战剂、食物中毒和血液中细菌和病毒的检测,而在真菌分类、鉴定及检测中的应用国外刚刚起步,国内未见报道^[1-5]。本研究对MALDI-TOF-MS检测与鉴定常见食物真菌进行探索。

基金项目:国家自然科学基金资助课题(30471456);国家“十一五”科技支撑计划资助课题(2006BAK02A27)。

作者简介:李凤琴 女 研究员

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

曲霉属 (*Aspergillus species*)

黄曲霉 (*A. flavus*) 黄曲霉 3.4408、黄曲霉 3.951,均购自中国科学院微生物研究所,黄曲霉 78-465、78-490、78-478、78-484、78-509、78-145、78-178、78-399、78-334、78-339、78-116、78-363、78-368、78-385、78-386、78-394、78-400、78-238、78-231、78-218,由本实验室从玉米样品中分离所得。

寄生曲霉 (*A. parasiticus*)

寄生曲霉 3.6155、寄生曲霉 3.124,购自中国科学院微生物研究所,寄生曲霉 ATCC2999 美国菌种保藏中心惠赠。

其他曲霉属菌种 酱油曲霉 (*A. sojae*) 3.494、赭曲霉 (*A. ochraceus*) 3.1409、米曲霉 (*A. oryzae*) 3.2792、黑曲霉 (*A. niger*) 3.4309、炭黑曲霉 (*A. carbonarius*) 3.3558。上述菌株均购自中国科学院微生物研究所。

青霉属 (*Penicillium species*)

纯绿青霉 (*P. verrucosum*) 3.4024、扩张青霉 (*P. expansum*) 3.3703、荨麻青霉 (*P. urticae*) 3.833 购自中国科学院微生物研究所,产黄青霉 (*P. chrysogenum*)、产紫青霉 (*P. purpurogenum*)、岛青霉 (*P. islandicum*)、皱褶青霉 (*P. rugulosum*) 为本实验室保藏菌株。

镰孢菌属 (*Fusarium species*)

禾谷镰孢 (*F. graminearum*) 3.3488、禾谷镰孢 3.4521、串珠镰孢 (*F. moniliforme*) 3.1756、三线镰孢 (*F. tritinctum*) 3.4731、增殖镰孢 (*F. proliferatum*) 3.4726、尖孢镰孢 (*F. oxysporum*) 3.1781和黄色镰孢 (*F. culmorum*) 3.4283,共 7 种,均购自中国科学院微生物研究所。

红曲霉属 (*Monascus species*)

红曲菌 (*Monascus ruber*) SJS-6、SJS-8、SJS-10、SJS-18、SJS-21、SJS-22、SJS-24、SJS-26、SJS-28 和 SJS-33 菌株由江西中德联合研究院许杨教授惠赠。

酵母菌属 (Yeast)

酵母菌 2.742 (购自中国科学院微生物研究所),酵母一号、FX-2、X-0203、啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 1 和酵母 2 为食品工业发酵用菌株,来自生产厂家。

1.1.2 培养基

麦芽提取粉琼脂培养基 (Malt Extract Agar,

MEA)、马铃薯 - 葡萄糖 - 琼脂培养基 (Potato Dextrose Agar, PDA)、麦芽汁琼脂培养基 (Malt Agar, MA)。上述培养基按食品卫生微生物学检验 (GB/T 4789.28—2003) 规定制备^[6]。

1.1.3 MALDI-TOF-MS 基质和溶剂系统

基质 2,5-二羟基苯甲酸 (2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB)、2-氨基-4-甲基-5-硝基吡啶 (2-amino-4-methyl-5-nitropyridine, 2a4m5n)、反式-3-吲哚丙烯酸 (trans-3-indoleacrylic acid, IAA)、2-巯基苯并噻唑 (2-mercaptobenzothiazole, MBT)、2-(4-羟基亚胺)苯甲酸 [2-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid, HABA]、2,6-二羟乙酰苯 (2,6-dihydroxyacetophenone, DHAP)、芥子酸 (Sinapinic acid, 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, SA)、-氰基-4-羟基肉桂酸 (-cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA, -cyano)、5-氯-2-巯基苯丙噻唑 (5-chloro-2-mercaptobenzothiazole, CMBT),上述试剂均购于美国 Sigma 公司。

溶剂 用于配置上述 9 种基质的溶剂为乙腈 + 0.1% 三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, TFA) 水溶液 (70+30, 体积分数)。MALDI-TOF-MS 基质溶液是用溶剂将 9 种基质分别配成饱和溶液,基质溶液现用现配。

1.1.4 仪器

美国应用生物系统公司 MALDI-TOF-MS 生物质谱工作站 (Voyager DETM PRO BiospectrometryTM Workstation), 仪器参数为:线性操作模式,延迟提取,分析离子带正电荷,加速电压:20 kV,离子延迟提取时间:400 ns,质量范围:900~25 000 Da,激光点击数:每图谱 100,激光频率:20.0 Hz,栅极电压:92.9%, Bin size:0.5 ns, Vertical scale:500 mV, Vertical offset:0.5%, Input bandwidth:500 MHz, Guide wire:0.05%。使用标准肽混合物 Angiotensin (分子量:1 296.685 3) 和 ACTH 18-39 片段 (分子量:2 465.198 9) 作为外标校准质谱的质量范围,分子量检测范围:350~15 000 Da。

1.2 方法

1.2.1 MALDI-TOF-MS 直接检测真菌孢子实验条件的优化 分别选取红曲霉属、曲霉属、青霉属、镰孢菌属、酵母菌的代表性菌株红曲霉 SJS-22、岛青霉、三线镰孢、寄生曲霉 3.124 和酵母菌 1 为模式菌株,对 MALDI-TOF-MS 直接分析不同属真菌的实验条件进行优化。

菌种(株)培养 将红曲霉 SJS-22 接种于 MEA 斜面培养基中,于 30℃ 培养 10 d;岛青霉和三线镰

孢3.4731分别接种于MA斜面培养基,寄生曲霉3.124接种于PDA斜面培养基中,于28℃培养7d后,立即进行孢子悬液制备。酵母菌1接种于PDA斜面培养基中,35℃培养24h后备用。

孢子悬液的制备 在培养好的菌种(曲霉、青霉、红曲霉、镰孢菌)斜面培养物中加入1ml无菌蒸馏水洗脱孢子,洗液移至1.5ml Eppendorf管中,4000 r/min离心5 min,弃上清后底层孢子团备用。

以无菌环钩取新鲜酵母菌菌落2环,转至盛有20μl基质溶液的1.0ml Eppendorf管中,混匀后备用。

最佳试样、基质体积比的筛选 以红曲霉SJS-22为模式菌株研究最佳试样、基质体积比。将上述获得的红曲霉SJS-22底层孢子团与基质溶液以不同体积比(1+2、1+1、2+1、4+1,体积分数)混合后,取1μl样液点于靶盘上。干燥后进行MALDI-TOF-MS分析。青霉属、曲霉属、镰孢菌属和酵母菌各选取一个代表性菌株按上述同样的比例混合后进行MALDI-TOF-MS分析。

点样方法的筛选 将红曲霉SJS-22离心后获得的孢子团按以下3种方法点样。

液滴干燥法 取1μl孢子悬液滴加到靶盘上,待液滴干燥后,将1μl的基质溶液覆盖其上,待基质完全干燥后进行MALDI-TOF-MS分析。

混合液滴干燥法 将孢子悬液与基质溶液等体积混合后,取1μl加到靶盘上,完全干燥后进行MALDI-TOF-MS分析。

夹心点样法 又称“三明治”法,先在靶盘上滴加1μl基质溶液,干燥后滴加1μl孢子悬液,干燥后再将1μl的基质溶液覆盖其上,待完全干燥后进行MALDI-TOF-MS检测。

1.2.2 MALDI-TOF-MS直接检测真菌孢子方法的重现性研究 将红曲霉SJS-22于3个不同时间点转种于MEA培养基中,培养7d后分别按前述实验方法制备孢子悬液,于相同的实验条件下进行MALDI-TOF-MS分析。

1.2.3 方法应用 利用优化出的实验条件对同一属菌中的其他菌株进行MALDI-TOF-MS分析。

2 结果

2.1 MALDI-TOF-MS分析真菌最佳基质的筛选

红曲霉SJS-22孢子团分别与9种基质溶液按文献报道的1+1体积比混合后进行MALDI-TOF-MS分析的质谱图见图1。质谱图的横坐标为样品离子的质荷比(m/z),纵坐标为离子丰度。由图1可见,在所有基质溶液中,红曲霉在MBT基质中具有出峰好、噪音小、基线稳定的特点,且在 m/z 4030附近出

现丰度较好的特征性质谱峰,其他基质的质谱图中均无有意义的质谱峰出现,因此MBT为MALDI-TOF-MS分析红曲霉的最佳基质。

2.2 最佳试样、基质体积比的筛选

将红曲霉SJS-22孢子团与筛选出的最佳基质溶液MBT分别以1+2、1+1、2+1、4+1(体积分数)的比例混合后进行MALDI-TOF-MS分析,结果见图2。由图2可见,试样、基质溶液的体积比在1+1时出峰最好,噪音小、信噪比高,说明试样与基质体积比为1+1时形成的共结晶最好,这与文献报道结果一致。用青霉属、曲霉属、镰孢菌属和酵母菌的分析结果也显示,试样、基质最佳比例为1+1时出峰结果最好。因此后续的研究中将试样、基质液等体积混合后点样。

2.3 点样方法的筛选

红曲霉SJS-22孢子团按液滴干燥法、混合液滴干燥法、夹心点样法3种方法点样获得的质谱图见图3。由图3可见,夹心法所获得的质谱图丰度低、噪音大、基线干扰明显,在 m/z 4030附近没有出现有意义的特征性质谱峰;液滴干燥法虽然基线干扰较夹心法小,但也无有意义的质谱峰出现;而混合液滴干燥法在 m/z 4030附近出现特征性质谱峰,噪音较液滴干燥法和夹心法小,因此混合液滴干燥法优于液滴干燥法和夹心法,是MALDI-TOF-MS分析食品真菌的最佳点样方法。

2.4 MALDI-TOF-MS分析曲霉属、青霉属、镰孢菌属和酵母菌最佳基质的筛选

将模式菌株岛青霉、三线镰孢3.4731和寄生曲霉3.124三个菌株按照上述优化出的试样+基质最佳比例(1+1)与9种基质混合、采用混合液滴干燥法点样后进行MALDI-TOF-MS分析,结果见图4、图5、图6。由图可见,寄生曲霉3.124在以IAA为基质时获得的质谱图信噪比好、丰度高且出峰数量最多(分别在 m/z 3378、 m/z 6095、 m/z 6263、 m/z 6422附近出现特征性质谱峰),岛青霉在以IAA为基质时获得的谱图有丰度较高的质谱峰出现(分别在 m/z 4431、 m/z 6527、 m/z 9326和 m/z 10221附近出现特征性质谱峰),三线镰孢以MBT为基质获得的质谱图具有丰度高、噪音小的特点(分别在 m/z 1152、 m/z 1382、 m/z 1759和 m/z 1990附近出现特征性离子峰),其他基质均无有意义的质谱峰出现或信噪比太低,故对曲霉属、青霉属、镰孢菌属进行MALDI-TOF-MS分析时,IAA和MBT为最佳基质。实验结果还显示,酵母菌分析的最佳基质也为IAA。

2.5 MALDI-TOF-MS直接检测真菌孢子方法重现性分析和应用

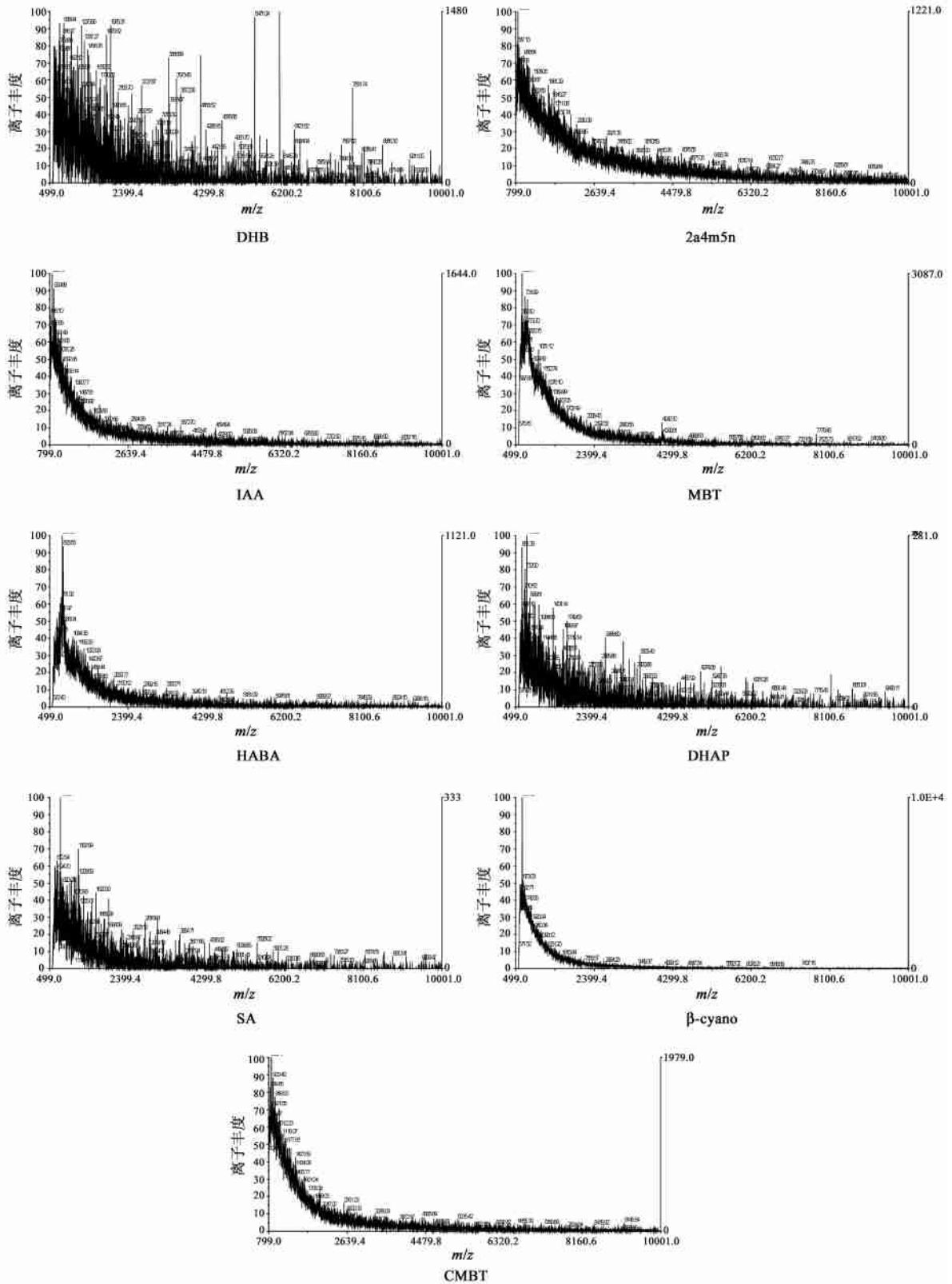


图1 红曲霉 SJS-22 在 9 种基质溶液中的质谱图

红曲霉 SJS-22 于 3 个不同时间点转种培养 7 d 后的 MALDI-TOF-MS 分析结果见图 7。由图可见,同一菌株在 3 个不同的实验时间使用相同的培养基和检测方法进行 MALDI-TOF-MS 分析,其质谱图的出峰数量和出峰位置保持一致,均在 m/z 4030 附近出现相

同的特征性质谱峰。将优化出的方法应用于曲霉属、青霉属、镰孢菌属和酵母菌中其他菌株的检测,所获质谱峰与模式菌株一致,因此使用 MALDI-TOF-MS 直接分析真菌孢子的方法稳定,重现性好。

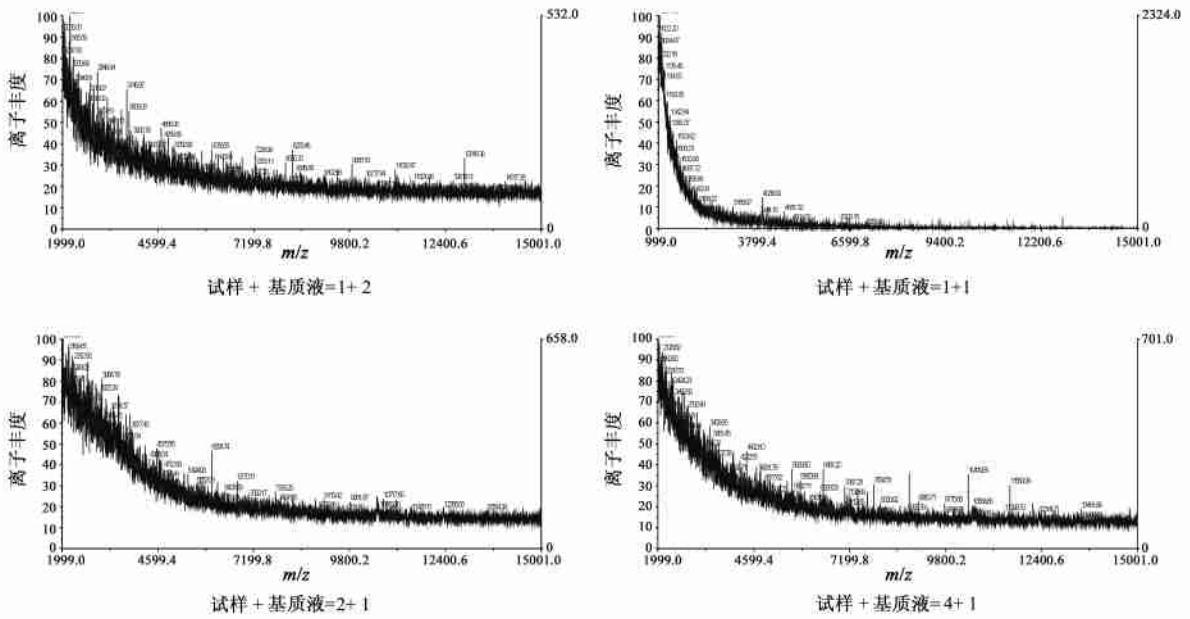


图2 红曲霉 SJS-22 试样和 MBT 基质溶液在不同体积比的质谱图

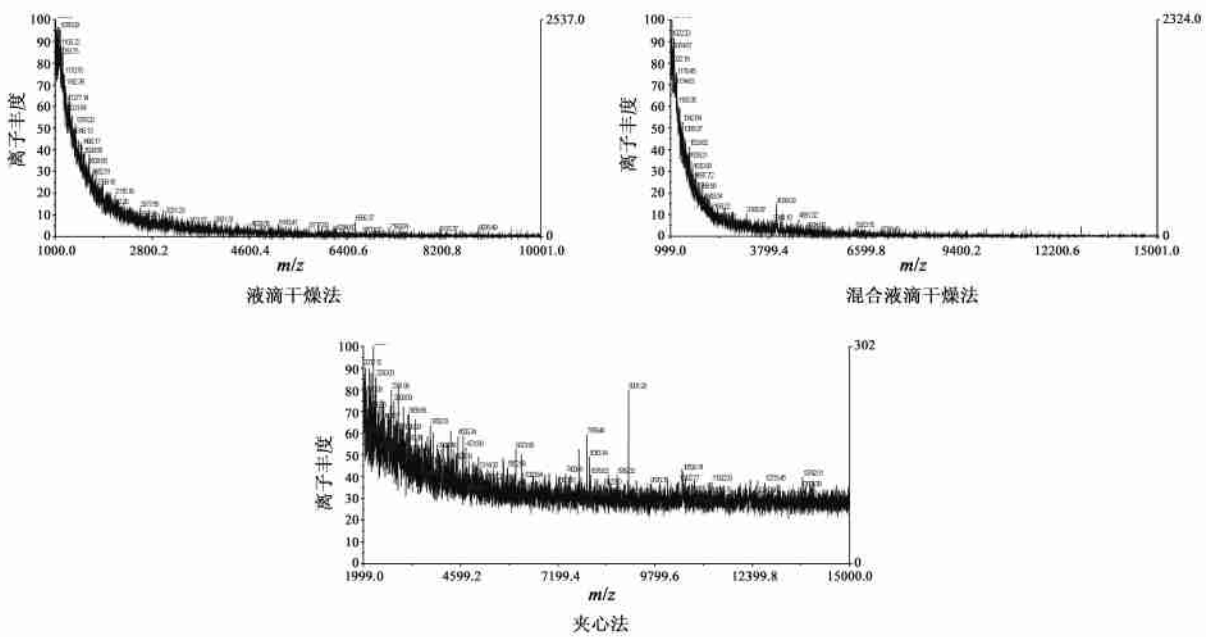


图3 红曲霉 SJS-22 经不同点样方法获得的质谱图

3 讨论

MALDI-TOF-MS 分析鉴定真菌具有样品用量少、简单、快速、准确等特点,在真菌检测和鉴定中具有传统方法、免疫学方法以及分子生物学方法无可比拟的优越性,其最终结果是获得一张指纹谱图,通过对代表某种真菌特定表型或基因型特性的特征性生物标志物进行分离、丰度分析和鉴定,创建新的蛋白质谱指纹图谱数据库,或利用已有蛋白质谱指纹图谱数据库中的信息、或比较待测真菌与标准参考菌株的质谱图而对微生物的种属进行归类。

MALDI-TOF-MS 直接分析真菌孢子中离子峰越

多越有利于真菌的分类和鉴定,基质溶剂系统是关系到细胞壁成分溶于基质中多寡,从而影响质谱图中离子峰出现与否和出现多少的关键。溶剂系统选择的原则是不能溶解结晶膜^[7]。基质溶剂中 TFA 为样品结晶提供了一个酸性环境,蛋白质分子中的 NH₂ 基团在酸性环境下很容易质子化,形成蛋白质分子的正离子,其机理至今不明。有研究显示,提高基质溶液中 TFA 的浓度,可使蛋白质分子的立体结构发生改变,即折叠的蛋白质分子伸展开,从而可以接受更多的质子而带更多的电荷,提高其离子化程度,但同时会增加测量的相对误差^[8]。MALDI-TOF

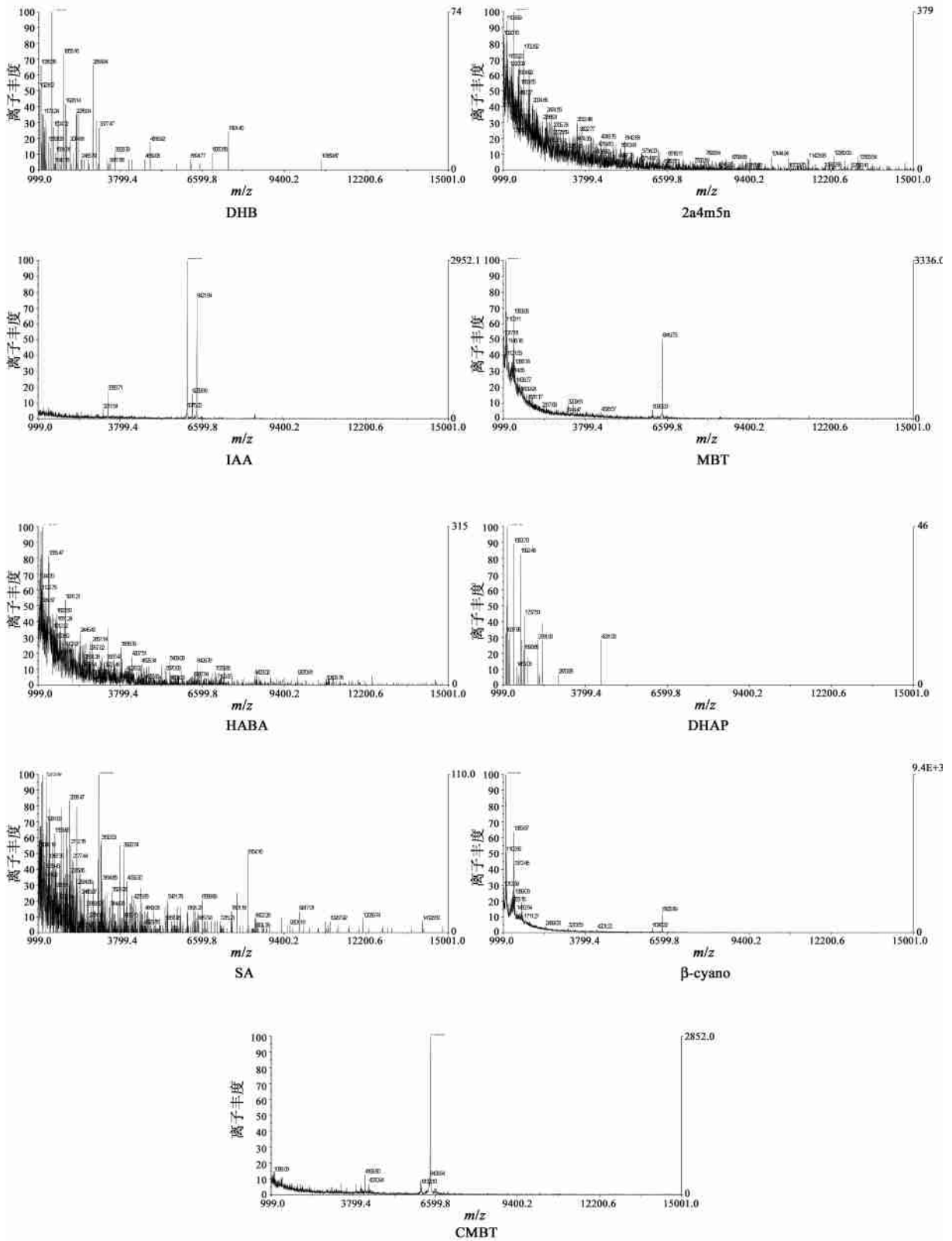


图4 寄生曲霉 3.124 在 9 种基质溶液中的质谱图

MS 分析过程中基质的作用是：吸收激光能量并有效地转化成样品分子共振吸收能；使生物多聚分子解离。适宜基质的选择对质谱检测结果起着决定性作用。MALDI-TOF-MS 基质的一般要求是可溶性、光吸收性和低的反应活性。不同的基质辅助解

吸生物大分子的电离情况不同，所获得的质谱图各异，因此在进行 MALDI-TOF-MS 分析时，适宜的基质溶剂系统是实验成败的关键。由于基质辅助解吸生物大分子电离的机理尚不完全清楚，对于基质的选择至今还没有明确、具体的规定，目前基质的正确选

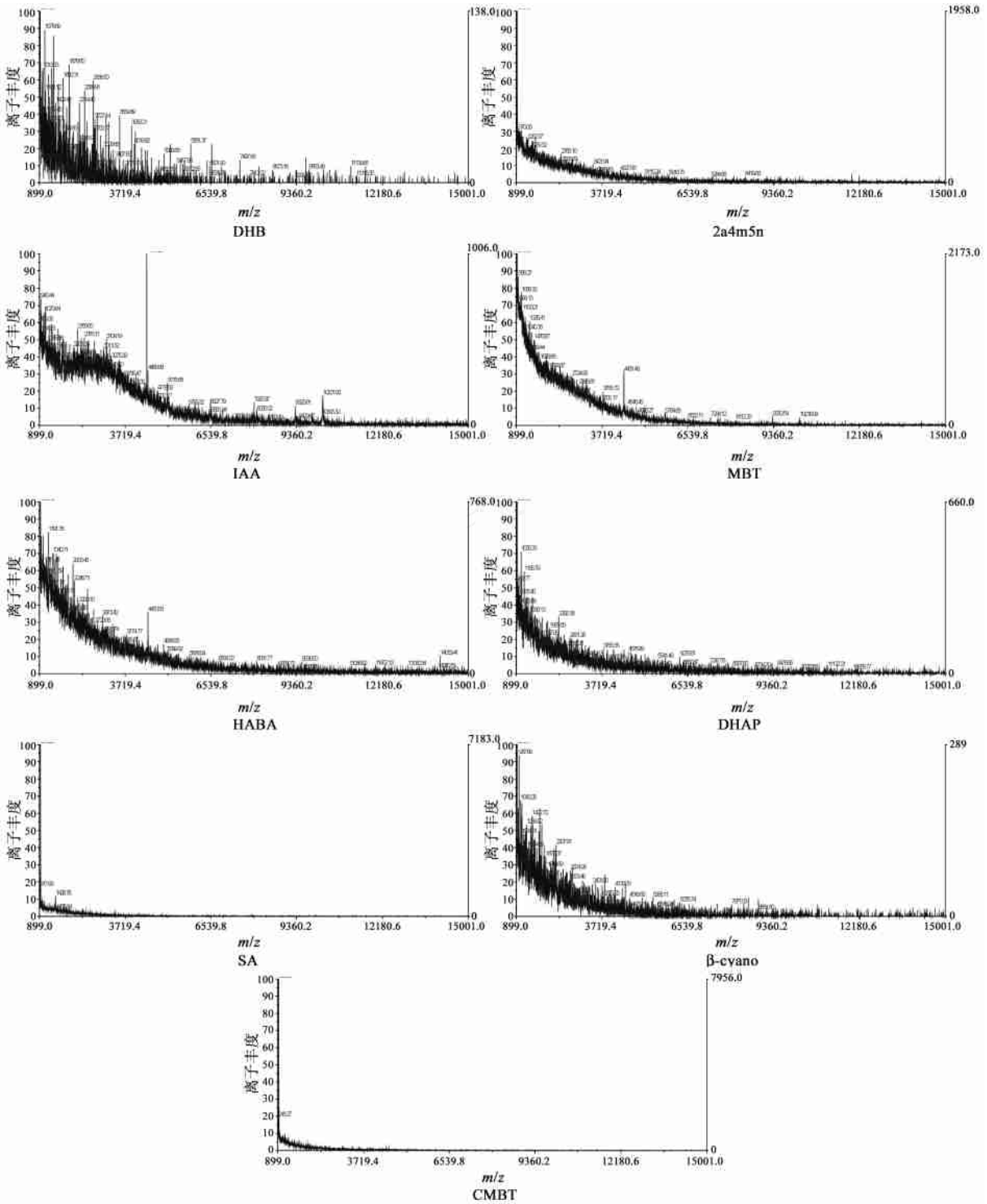


图5 岛青霉在9种基质溶液中的质谱图

择主要凭经验,同时还需要大量的实验摸索,这也是本研究进行MALDI-TOF-MS分析不同属真菌时要对最适基质进行筛选的原因。

目前MALDI-TOF-MS分析最常采用的是固相基质^[7],本实验探讨的9种基质均是固相基质,固相基质的缺点是制样时因分析物不能很好地分散在固相基质中,会导致样品点不均匀、重复性较差。使用液相基质则可以克服上述缺点从而更有利于离子的形成、分子离子在溶液中溶解和分散状态降低解吸所

需的能量,气相过程的去溶剂化能带走分子离子的过剩能量,液体在激光辐照下产生爆炸现象有利于解吸等。有报道采用甘油为基质进行MALDI-TOF-MS分析,具有重复性高、质量精密度高的优点^[8]。然而液相基质因其固有的挥发性使基质在质谱过程中处于动态变化中,在实验条件下较难控制其挥发速度,并且一般液相基质不含紫外吸收基团,若在紫外激光条件下使用液相基质,需加入其他能吸收紫外光的物质。综合固相和液相基质的优缺点和国内

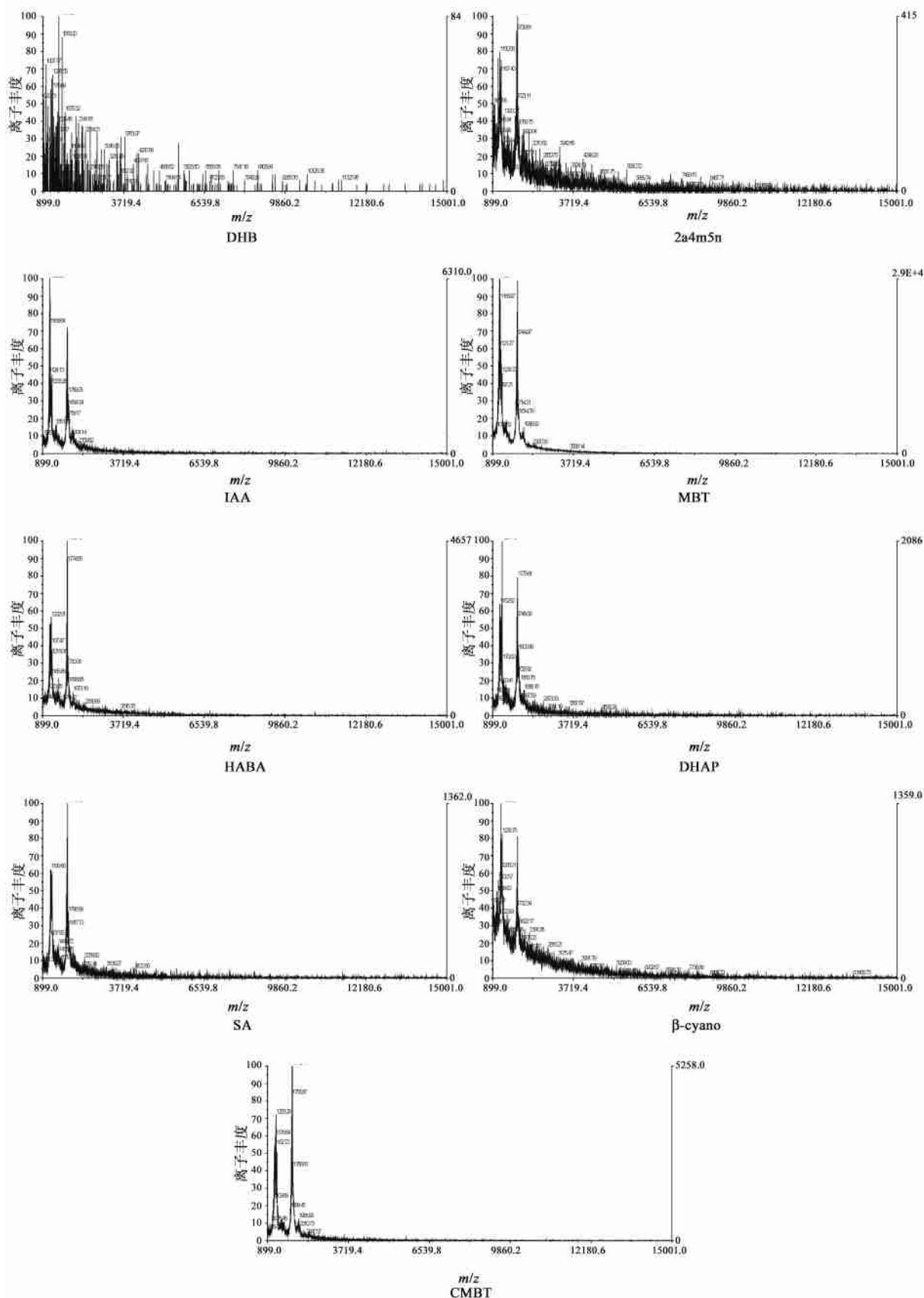


图6 三线镰孢3.4731在9种基质溶液中的质谱图

外资料,本研究选用固相基质。

在样品制备过程中,样品与基质能否形成共结晶是决定能否获得高质量质谱图的关键因素。只要

能与基质形成良好的晶型,即使样品的量或浓度很低,通过仪器的信号累加功能,同样可获得一张高分辨率和高质量的质谱图,这是MALDI-TOF-MS的一

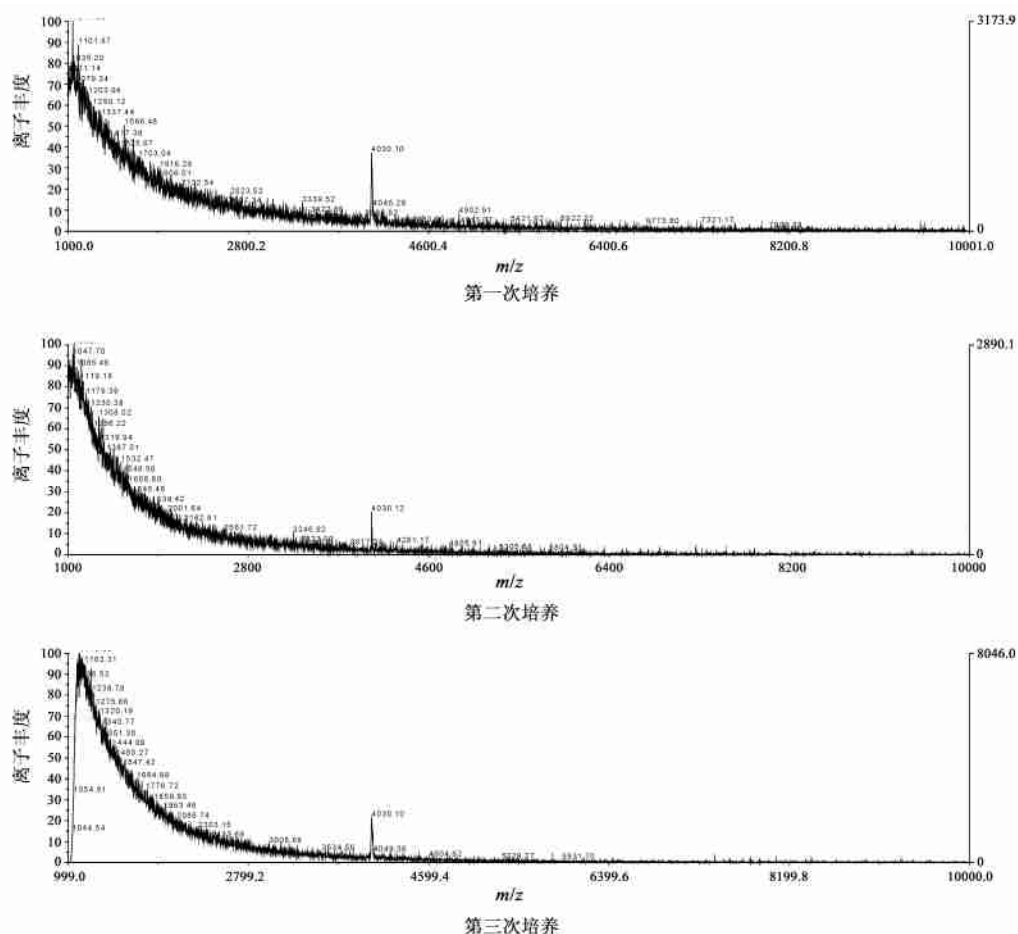


图7 红曲霉 SJS-22 在 MEA 培养基中三个不同时间点的质谱图

大优势。而样品与基质的摩尔比对质谱信号有很大影响,适宜的比例取决于样品性质、基质及仪器条件。样品与基质的摩尔比一般为 1 100 ~ 1 5 000。本实验通过对样品、基质的体积比的考查,发现二者 1 + 1(体积分数)混合时可获得最佳的质谱图,样品/基质以 1 + 2、2 + 1和 4 + 1(体积分数)混合时图谱的基线高、噪音较大,均没有出现有意义的质谱峰。究其原因,可能是试样量过多时,易形成簇分子离子和多电荷离子,解吸难度增加而难以出现理想的离子峰;而试样量过少又不能得到足够的信噪比,因此试样/基质 1 + 1(体积分数)的比例是获得高质量、可重复图谱的重要保障。

参考文献

[1] 孙宗科,张伟,陈西平.应用飞行时间质谱仪快速鉴定细菌的初步研究[J].卫生研究,2004,33(5):552-554.
 [2] 何大澄,肖雪媛.差异蛋白质组学及其应用[J].北京师范大学

学报,2002,38(4):558-562.
 [3] WELHAM KJ,DOMIN M A,JOHNSON K, et al. Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom,2000,14:307-310.
 [4] NANCY B VALENTINE, JON H WAHL, MARK T KINGSLEY, et al. Direct surface analysis of fungal species by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom,2002,16:1352-1357.
 [5] BIJAN AMIRI ELIASI, CATHERINE FENSLAU. Characterization of Protein Biomarkers Desorbed by MALDI from Whole Fungal Cells[J]. Anal Chem,2001,73(21):5228-5231.
 [6] GB/T 4789.28—2003. 食品微生物学检验 染色法、培养基和试剂[S].
 [7] 周丽华,邓慧敏,邓芹英.基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱在脱氧核糖核酸分析中的样品制备与纯化方法及进展[J].分析化学,2004,32(12):1683-1688.
 [8] 石磊,季怡萍,邢俊鹏,等.蛋白质分子量测定过程中的酸效应[J].分析化学,2002,30(8):938-941.

[收稿日期:2007-05-16]

中图分类号:R15;Q949.32;O657.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2007)05-0385-09