

MALDI-TOF 质谱技术分析与鉴定病原细菌研究

其布勒哈斯^{1,2} 田世民^{2*} 邹明强² 贺银凤¹ 陈 艳² 赵贵明²

(1. 内蒙古农业大学 内蒙古 呼和浩特 010018)

(2. 中国检验检疫科学研究院 北京 100123)

摘 要: 本文通过基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术分析病原细菌的方法进行研究, 阐明影响分析结果的重要因素, 并建立了 MALDI-TOF-MS 分析病原细菌的标准方法。对不同属、种和亚种的 12 株植物病原细菌进行全细胞分析结果表明: MALDI-TOF-MS 能快速而准确的区分和鉴定病原细菌, 分析过程简单、灵敏度高。此法在细菌属、种、亚种和菌株水平上, 可快速、准确地区分和鉴定。

关键词: MALDI-TOF MS, 细菌质量指纹图谱, 鉴定, 病原细菌

Analysis and Identification of Pathogenic Bacteria by MALDI-TOF Mass Spectrometry

Qibulehasi^{1,2} TIAN Shi-Min^{2*} ZOU Ming-Qiang² HE Yin-Feng¹
CHEN Yan² ZHAO Gui-Ming²

(1. Inner Mongolian Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

(2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

Abstract: Based on Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) method for discrimination of pathogenic bacteria was developed. Established the standardization method for MALDI-TOF-MS analysis of bacteria and affecting elements of the analyzing result. The results obtained from twelve plants pathogenic bacteria of different genus, species and subspecies were analyzed by using MALDI-TOF showed that, MALDI-TOF-MS could be rapid and reliable identification of bacteria at the level of genus, species, and strains. Analytical process is simple, high sensitivity are advantages of this strategy.

Keywords: MALDI-TOF-MS, Bacteria mass finger-printing, Identification, Pathogenic bacteria

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)是近几年发展起来的用于微生物(细菌、酵母菌和真菌等)快速区分和鉴定的一项新技术, 其基本原理为: 将微生物样品

与等量的基质溶液混合或分别点加在样品板上, 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结晶体, 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, 将检测到的离子峰

为纵坐标, 离子质荷比(m/z)为横坐标, 形成质量图谱; 通过专用软件分析比较, 筛选并确定出特异性(指纹)图谱, 从而对目标微生物种或菌株的区分和鉴定^[1]。MALDI-TOF-MS 非常适合生物活性物质的快速、大规模、高通量筛选, 已成为临床诊断、环境治理和分类研究或者食品加工质量控制中, 其优点是待测组分中的杂质(如较高浓度的盐、非挥发性成分以及去垢剂)不影响目标物质的测定、信息直观、操作简单、快速、准确等^[2]。

目前, 菌体形态学观察、生理生化反应、酶联免疫吸附和PCR方法等用于对植物细菌的鉴定和检验, 但是, 这些方法通常操作复杂, 如革兰氏染色、氧化酶试验或抗体制备、选择PCR引物等, 而且有时难以达到对细菌种、菌株水平上的鉴定。因此, 迫切需要一种快速、准确地微生物鉴定新技术。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱具有以上优点而能满足快速鉴定的需要。刘海洪等综述了质谱鉴定细菌及分析成分和方法, MALDI-TOF-MS 能够完成细菌多种成分的分析, 包括蛋白质、脂类、脂多糖、多肽及其它能被离子化的分子^[3]。由于这些成分具有种属特征或与其分类位置密切相关, 可作为细菌分类的指标, 及作为生物标记物标志着某一类或某种细菌的存在。目前, 以蛋白质为靶分子, 利用MALDI-TOF-MS 鉴定食品和医学微生物的报道很多, 例如: 埃希氏菌大肠杆菌O157:H7、金黄色葡萄球菌和李斯特菌等的检测和鉴定研究, 质谱仪器公司也先后推出了配套的谱图分析软件(如BioTyper、Mascope等), 一些食品微生物的标准质量指纹图谱数据库正在建设中^[4-9]。

本研究首次采用 MALDI-TOF-MS对植物病原细菌的鉴定方法进行研究, 为进一步开展植物病原细菌的鉴定检验及相关数据库的建立提供科学依据。根据研究目的, 主要选择玉米、苜蓿、番茄、马铃薯和小麦等植物病原细菌。在我国, *Pseudomonas syringae*引起的玉米细菌性褐斑病和*Erwinia carotovora*引起的玉米细菌性茎腐病发生较为普遍; *Acidovorax avenae*引起的玉米细菌性叶疫病于2004年在南京首次报道; *Erwinia (Pantoea) stewartii* subsp. *stewartii*是引起玉米细菌性枯萎病的病害; *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*引起的玉米细菌性萎蔫病、*Clavibacter michiganensis* subsp.

*sepedonicus*引起的马铃薯环腐病和*Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*引起的苜蓿萎蔫病, 在我国均尚未发生的报道, 已被列入2007年重新修订的对外检疫性有害生物名录(农业部公告第862号)。*Clavibacter fangii*是引起小麦细菌性枯苗病的病原菌, 1987年刘庆都等发现和鉴定的小麦上的一种新病害^[10]。随着我国从国外引进植物种子数量的增加, 和国内商业化制种的迅速发展而导致种子的大规模异地调运, 对这些病原细菌的准确、快速的检验鉴定的要求也愈来愈重要。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器: 本研究所用的标准品胰岛素(Insulin)、溶剂乙腈、甲酸和三氟乙酸(TFA)均购于Sigma公司, 色谱纯; 基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA)购自于美国ABI公司; 营养肉汤琼脂培养基(NBY)、普通营养琼脂培养基(NA)、luria bertani(LB)培养基购自北京陆桥技术有限责任公司; 质谱仪为美国ABI公司的MALDI-TOF/TOF 4700。

1.1.2 供试菌株和培养方法: 本研究所用的供试细菌的编号、名称、来源见表1。供试的标准菌株首先从冷冻干燥保存管转移到营养肉汤培养基上活化, 在斜面上转接培养后4℃下保存备用。选棒杆菌属密执安种(*Clavibacter michiganensis*)下的3个亚种IQCC11、IQCC15和IQCC16为模式菌株, 设取不同培养条件(3种培养基: NBY、NA和LB, 3种培养温度: 24℃、28℃和32℃, 3种培养时间: 24 h、48 h和72 h)。

研究观察培养条件对MALDI-TOF MS分析结果的影响。

1.2 基质溶液的配制

基质溶剂为: 水-乙腈(1:1, V/V), 每毫升基质溶剂中加0.1 μ L三氟乙酸(TFA)和10 mg α -氰基-4-羟基肉桂酸, 经超声波溶解后形成基质饱和溶液。此溶液在-20℃冰箱可保存1个月。

1.3 样品处理方法

1.3.1 直接分析法: 培养好的细菌, 用无菌牙签挑取单个菌落, 涂在样品板上, 室温下晾干后覆盖0.5 μ L基质溶液, 晾干进板后进行质谱分析。

表 1 供试菌株
Table 1 Bacterial strains of analyzed

菌株编号 No. of strains	菌株名 Name of strains	菌株来源 Source of strains
IQCC 3	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	China General Microbiological Culture Collection Center
IQCC 9	<i>Clavibacte fangii</i>	China General Microbiological Culture Collection Center
IQCC 6	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i>	Isolated from Nanjing
IQCC 15	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i>	American Type Culture Collection Center
IQCC 11	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	American Type Culture Collection Center
IQCC 8	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	The Institute of Plant Protection Chinese Academy of Agricultural Sciences
IQCC 16	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>tessellarius</i>	American Type Culture Collection Center
IQCC 1	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	The Institute of Plant Protection Chinese Academy of Agricultural Sciences
IQCC 10	<i>Erwinia (Pantoea) stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	Isolated from Nanjing
IQCC 2	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	The Institute of Plant Protection Chinese Academy of Agricultural Sciences
IQCC 4	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>holcicola</i>	Isolated from Shanghai
IQCC 5	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>holcicola</i>	American Type Culture Collection Center

1.3.2 单一溶剂处理：用无菌牙签挑取 1 mg~5 mg 细菌放入 1.5 mL E-cups 管里，先用 0.2% 的 TFA 洗 2 次，均在 10000 r/min 下离心 2 min 后，弃上清，沉淀菌体上加 50 μ L 0.2% 的 TFA，10000 r/min 下离心 2 min 后上清液转移到新 E-cups 管中备用。

1.3.3 混合溶剂处理：用无菌牙签挑取 1 mg~5 mg 细菌放入 1.5 mL E-cups 管里，加 300 μ L 纯水混匀，再加入 900 μ L 无水乙醇混匀，在 10000 r/min 下离心 2 min 并弃掉上清液，然后，向 E-cups 管中加入 50 μ L 70%甲酸和 50 μ L 纯乙腈，同上离心，最后，取上清液转移到新 E-cups 管中备用。

1.4 点样

取 0.5 μ L 处理好的上清液点加在 MALDI TOF 专用的样品板上，在室温条件下自然晾干(约需 3 min)，其上滴加 0.5 μ L 基质溶液覆盖，同法晾干后备用，每个样品重复 3 个孔。

1.5 质谱分析

采用氮激光源，波长为 337 nm，线性阳离子检测模式；加速电压为 15000 V；延迟时间为 300 ns；激光强度为 2500；每个样品点设激光随机射击 40 个点、每次射击 50 次，m/z 采集范围为 1000 D~20000 D。为了保证在 1000 D~20000 D 范围内蛋白质质荷比的准确性，用胰岛素(m/z 为 5734)进行内部校准，校正后获得的质荷比误差小于 6。采用仪器配置的 Data Explorer 4.0 软件对质谱图进行基线改正和默认平滑处理。每样品 3 个重复的蛋白质谱图叠加处理后作为样品的质谱图。

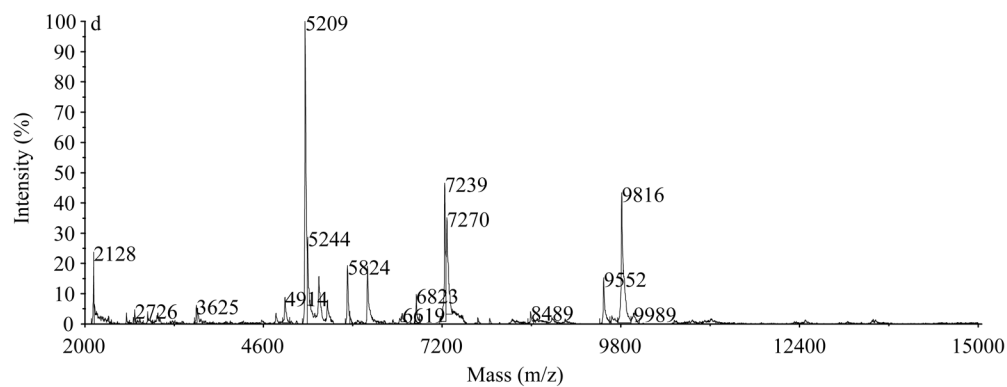
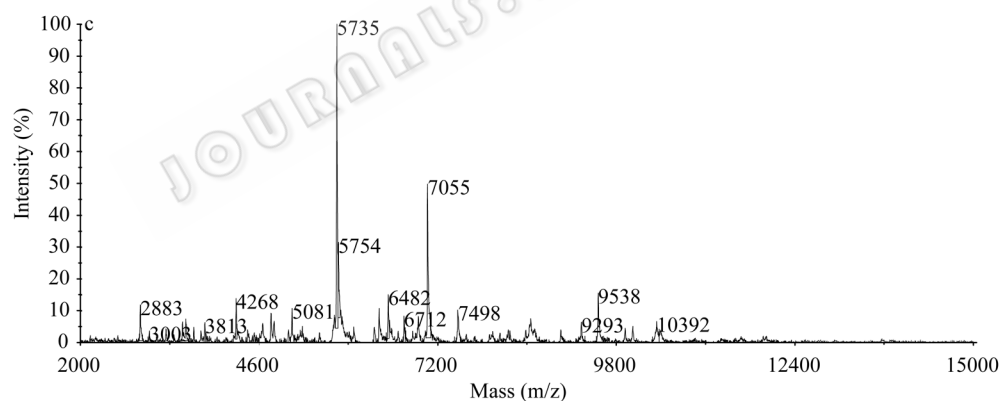
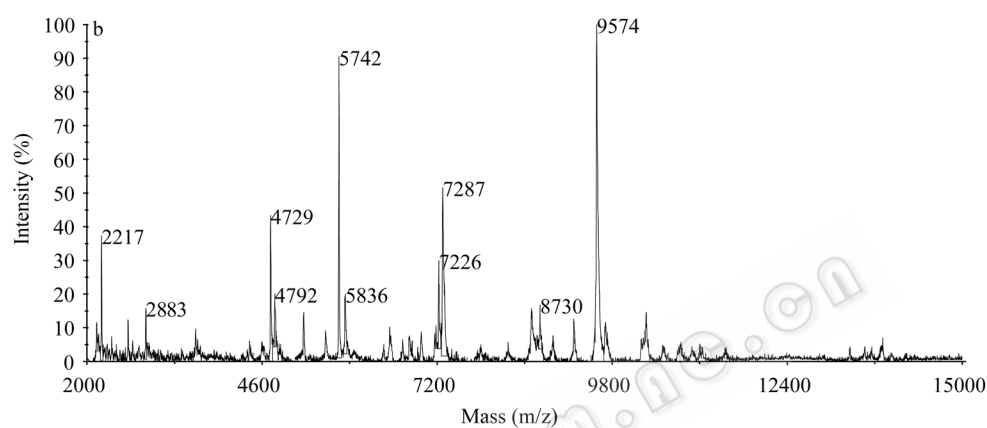
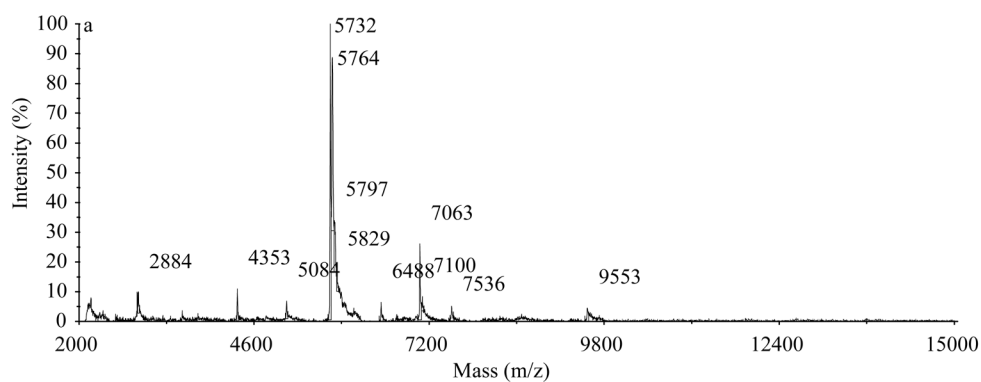
2 结果与分析

2.1 细菌培养条件和样品处理方法的标准化

以 IQCC11、IQCC15 和 IQCC16 为模式菌株，3 种培养基、3 种不同培养时间和培养温度下培养后分析的图谱没有明显差异(结果略)，且 2000 D 以下和 15000 D 以上未发现有效的离子峰。观察发现在 NBY 培养基上细菌生长较快，所以，选定 NBY、28℃ 培养箱里 24 h 培养条件作为细菌的最佳培养条件。在最佳条件下培养的以上 3 个模式菌株进行直接分析、单一溶剂处理后分析和混合溶剂处理后分析的结果表明，混合溶剂处理后的细菌质量图谱的离子峰最多、信噪比最高。表 1 中的所有细菌在最佳培养条件下用混合溶剂处理为标准方法进行质谱分析。

2.2 MALDI-TOF 分析结果

2.2.1 棒杆菌属 6 个病原菌的 MALDI-TOF 分析结果：棒杆菌属(*Clavibacter*)的 6 个病原菌的 MALDI-TOF 分析结果如下(图 1 和表 2)。6 个菌株分别有 10 到 30 个离子峰，直接对比细菌质量指纹图谱很容易辨别不同菌株间的差异。根据表 2 中 6 个菌株的质量图谱信息具体的比较结果如下：对比棒杆菌属 6 个菌株的指纹图谱信息，未发现属的特征峰。图谱 a、b、c、和 f 的比较显示，棒杆菌属密执安种(*Clavibacter michiganensis*)下的 4 个亚种有一个共同的离子峰，m/z 为 2884，可作为棒杆菌密执安种的生物标记物；4 个菌株分别有 2 到 15 个亚



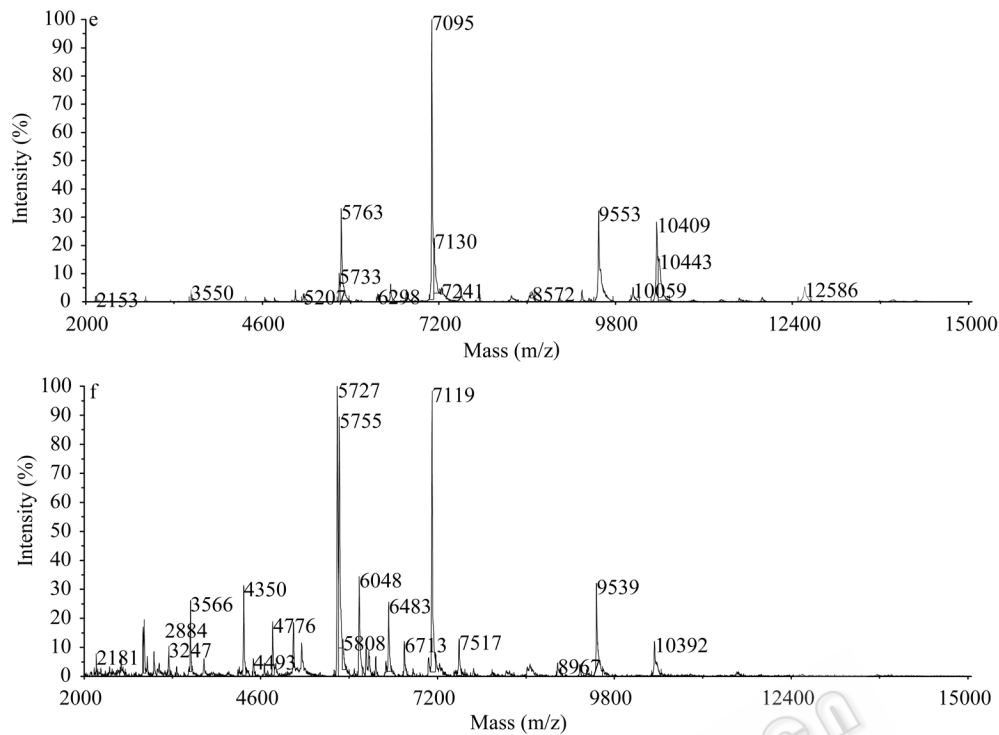


图 1 棒杆菌属 6 个菌株的质量图谱

Fig. 1 Mass spectrometric profiles of six species of genus *Clavibacter*

Note: a: IQCC11; b: IQCC8; c: IQCC16; d: IQCC9; e: IQCC6 ; f: IQCC15.

表 2 棒杆菌属 6 个菌株的 MALDI-TOF-MS 分析结果

Table 2 Peaks obtained from the analysis of six species of genus *Clavibacter* with MALDI-TOF-MS

<i>C. m. subsp. nebraskensis</i> IQCC 11		<i>C. m. subsp. sepedonicus</i> IQCC 8		<i>C. m. subsp. tessellarius</i> IQCC 16		<i>C. fangii</i> IQCC 9		<i>C. m. subsp. insidiosum</i> IQCC 6		<i>C. m. subsp. insidiosum</i> IQCC 15	
Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity
						2128	22.83			2180	11.79
2215	2.16	2216	36.11								
		2609	11.76			2607	3.54				
						2726	4.64				
2867	13.01									2869	17.93
2883	7.34	2883	15.04	2883	13.44			2882	2.01	2883	19.33
						2915	4.11				
				3003	5.99					3030	12.26
										3246	12.73
				3487	9.02						
3535	2.89			3536	10.19			3549	4.12	3565	22.92
				3650	7.84	3640	5.05				
				3813	9.36					3765	7.94
				4268	17.35						
4352	12.80							4352	1.86	4350	29.21
										4492	7.38
								4636	1.42		
		4728	41.46								

续表

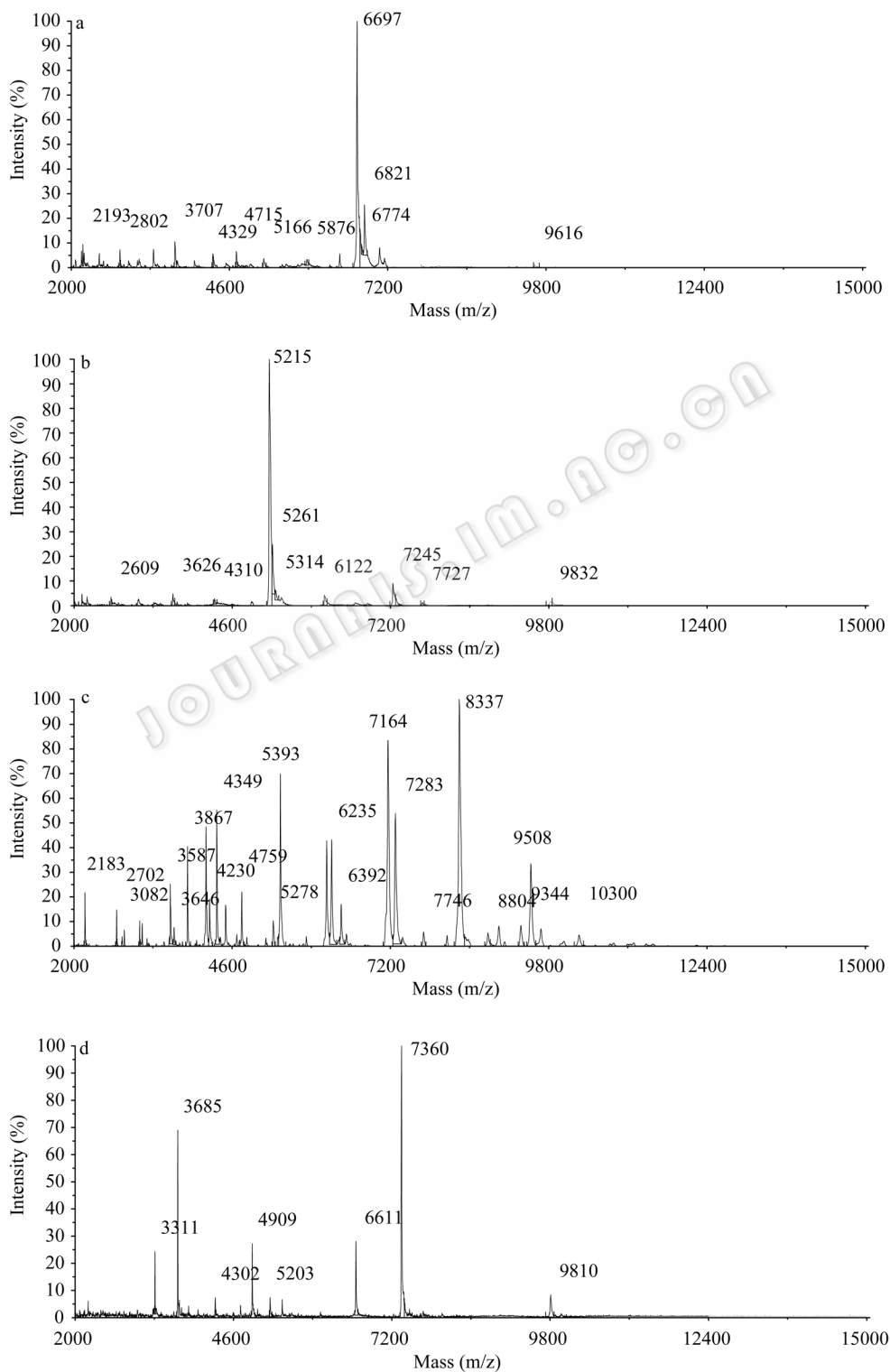
<i>C. m. subsp. nebraskensis</i> IQCC 11		<i>C. m. subsp. sepedonicus</i> IQCC 8		<i>C. m. subsp. tessellarius</i> IQCC 16		<i>C. fangii</i> IQCC 9		<i>C. m. subsp. insidiosum</i> IQCC 6		<i>C. m. subsp. insidiosum</i> IQCC 15	
Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity
		4791	18.36	4776	14.63	4784	3.33	4779	1.49	4775	16.23
						4914	8.82				
5084	8.08			5081	15.87			5085	4.26	5082	17.97
		5218	14.33			5208	100.50	5207	2.60	5201	8.64
						5243	28.56				
						5283	6.47				
						5410	15.71				
						5532	7.95				
5732	98.00	5742	89.67	5735	98.77			5732	10.14	5726	87.23
5764	89.90			5754	35.11			5763	32.64	5756	82.54
5797	35.61									5807	16.76
		5835	19.40			5823	18.89				
										6049	37.54
						6116	18.69			6149	14.66
										6193	12.56
				6280	9.68			6297	2.79	6291	10.23
				6350	14.89						
										6443	8.68
6488	9.01			6482	19.35			6489	6.36	6482	27.97
						6618	3.43				
				6712	11.92			6721	4.13	6713	13.75
						6823	9.87				
				6918	11.36						
7063	24.20			7055	48.17			7094	95.99	7068	10.88
7100	23.95							7129	22.14	7119	97.75
		7225	25.30			7239	45.01	7240	4.89		
		7286	50.62			7269	34.71				
				7498	12.75						
7536	6.58							7526	4.52	7516	15.53
						8489	3.91				
		8606	14.28					8571	3.66	8558	6.28
		8729	14.10	8994	5.96					8965	7.07
		9235	10.85	9293	7.69			9307	3.95	9294	5.66
9553	5.54	9574	94.74	9538	15.55	9552	14.49	9553	29.42	9539	34.55
						9816	41.62				
				9930	6.09	9988	3.44				
				10042	5.81			10059	5.07		
				10392	6.64			10408	26.75	10392	10.57
								10442	15.25		

种的特征峰。e 和 f 的比较显示, 棒杆菌属密执安种 *insidiosus* 亚种的标准菌株 IQCC15 和分离菌株 IQCC6 有 9 个共同的离子峰, m/z 分别为 2884、4352、4775、5085、5201、5732、6291、6482、和 6713, 可作为菌株的特征峰; 图谱 e 有 14 个特征峰; 图谱 f 有 19 个特征峰。由此可看出, MALDI-TOF-MS 能

区分和鉴定同一属内不同种的细菌、同一种内的不同亚种和同一亚种内的不同菌株。

2.2.2 玉米病原菌的 MALDI-TOF 分析结果: 采用标准化方法, 分析 6 个玉米病原菌的 MALDI-TOF 分析结果如图 2 和表 3 所示。

图谱 a 与 b 比较显示欧文氏菌属(*Erwinia*)不同



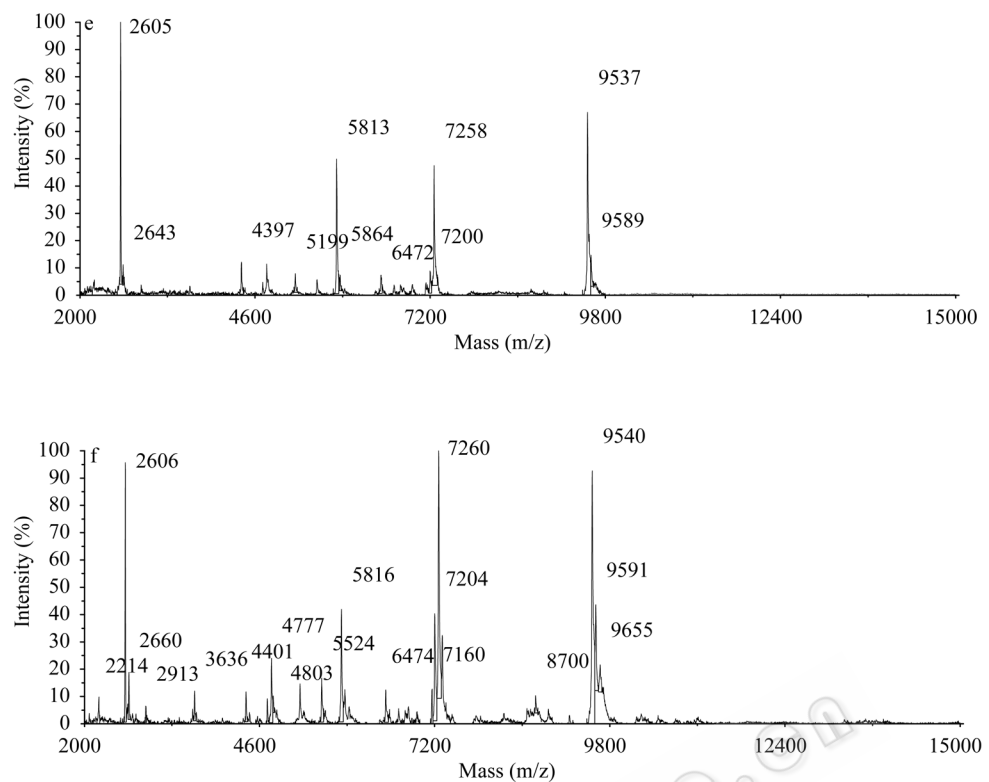


图 2 六个玉米病原菌的质量图谱

Fig. 2 Mass spectrometric profiles of six species of corn pathogenic bacteria

Note: a: IQCC1; b: IQCC10; c: IQCC2; d: IQCC3; e: IQCC4; f: IQCC5.

表 3 玉米病原菌的 MALDI-TOF-MS 分析结果											
Table 3 Peaks obtained from the analysis of corn pathogenic bacteria with MALDI-TOF-MS											
<i>E. c. subsp. carotovora</i> IQCC 1		<i>E. s. subsp. stewartii</i> IQCC 10		<i>P. s. subsp. syringae</i> IQCC 2		<i>A. a. subsp. avenae</i> IQCC 3		<i>X. c. subsp. holcicola</i> IQCC 4		<i>X. c. subsp. holcicola</i> IQCC 5	
Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity
2170	11.43										
2192	13.59			2182	13.68						
								2214	14.79	2214	2.05
2461	10.13										
		2608	3.33					2606	93.23	2604	99.82
								2660	21.89	2642	4.08
				2702	9.54						
2802	9.04			2793	2.54						
				2828	4.30						
								2912	10.27		
2945	5.04										
3089	4.93			3082	6.72						
3116	5.49			3122	5.91						
3353	9.08					3311	24.91				
				3587	16.53			3607	8.39		
		3625	4.73	3646	4.97	3685	67.67	3636	14.31		
3707	11.88										
3745	4.31			3867	26.38						
4026	3.81										

续表

<i>E. c. subsp. carotovora</i> IQCC 1		<i>E. s. subsp. stewartii</i> IQCC 10		<i>P. s. subsp. syringae</i> IQCC 2		<i>A. a. subsp. avenae</i> IQCC 3		<i>X. c. subsp. holci-cola</i> IQCC 4		<i>X. c. subsp. holci-cola</i> IQCC 5	
Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity	Avg. m/z	Avg. intensity
				4171	31.76						
				4230	12.52						
4329	6.93	4309	2.75			4302	7.55				
4343	4.61			4348	36.17						
								4400	13.45	4397	13.15
				4494	10.75						
4715	8.78							4716	12.23	4713	6.27
				4759	14.58			4777	25.45	4774	12.92
								4802	13.54		
						4909	25.74				
5165	5.31	5214	100.00			5202	7.32	5201	16.39	5198	6.19
		5260	24.86	5277	6.67						
		5313	5.89								
				5392	45.78	5400	6.67				
								5523	17.46	5522	6.19
								5815	41.17	5813	48.36
5875	3.51							5868	14.15	5863	7.92
		6122	4.16	6153	28.08						
				6234	28.35						
				6392	11.18						
6412	6.82							6474	14.67	6472	8.41
6697	99.45					6611	27.74	6666	8.61	6664	4.84
6749	16.81										
6774	10.44										
6821	27.02							6810	10.66		
6873	7.25										
										6935	5.75
7067	10.03										
7149	5.73			7163	54.73			7159	19.41	7135	6.27
								7203	44.08	7200	10.51
		7244	8.98					7260	97.32	7258	45.19
		7292	2.77	7283	35.24						
						7359	92.16	7312	37.57		
7750	1.58	7726	1.21	7745	3.77						
				8337	65.25						
								8700	11.02		
				8803	3.46						
								8891	7.03		
				8980	5.26						
				9343	5.41						
				9508	21.7			9539	83.82	9536	59.03
								9591	41.12	9589	12.45
9615	1.08			9673	4.54			9655	21.72		
								9704	14.91		
		9832	1.58			9809	7.37				
		9864	1.25								

种的菌株间没有共同的离子峰, 图谱 a 有 19 个特征离子峰, 图谱 b 有 10 个特征离子峰, 这些特征离子峰可作为同属不同种间的区分依据。e 与 f 比较显示黄单胞菌属(*Xanthomonas*)两个菌株间有 15 个共同的离子峰, m/z 为 2214、2606、4400、4716、4774、5201、5523、5815、5868、6472、6664、7203、7260、9539、9591, 可作为辨别菌株的生物标记物, 标准菌株 IQCC5 和分离菌株 IQCC4 间相似性很大, 但仍有差异, 图谱 e 有 12 个特征离子峰 m/z 分别为 2660、2912、3607、3635、4802、6810、7159、7312、8700、8891、9655 和 9704; 图谱 f 有 2 个特征离子峰 m/z 分别为 2642、6935; 可作为辨别菌株来源的依据。

菌株 IQCC5 和 IQCC4 的重复 10 次 MALDI-TOF 分析的质荷比数据, 进一步利用 Matlab R-2007a (Matlab Com., USA) 软件进行主成分分析结果如下 (图 3), 菌株 IQCC 4 和菌株 IQCC 5 之间的差异明显, 10 次重复实验结果的稳定性和一致性均很好。

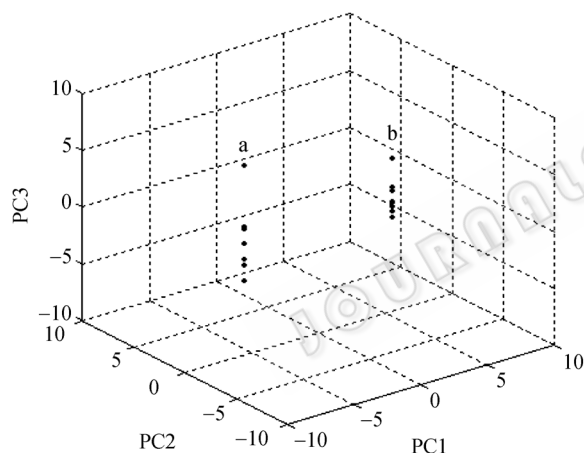


图3 黄单胞菌属两个菌株的3个主成分分数的三维散点分布图

Fig. 3 Three-dimensional scatter plot of the Principal component analysis of two *X. c. pv. holcicola* strains

Note: a: IQCC 4; b: IQCC 5.

该研究结果初步表明, MALDI-TOF 质谱分析技术可进行不同属的细菌、同属内不同种的细菌、同种内不同亚种和不同菌株间的区分和鉴定。

3 讨论

本研究通过对 12 种植物病原菌的 MALDI-TOF 质谱分析结果表明, 细菌质量指纹图谱法可以进行对不同细菌属、种、亚种和菌株的区分和鉴定, 这

将对快速、准确鉴定植物病原细菌及其来源具有重要意义。

通过本研究表明, 样品处理方法对 MALDI-TOF 质谱分析结果非常关键。从分析的过程来看, 直接分析具有简单、快速的优点, 但直接分析获得的 MALDI 图谱提供的信息量少不能满足区分和鉴定的要求。经过分析比较单一溶剂和组合溶剂处理的细菌质量图谱后, 组合溶剂处理后分析得到的图谱提供的信息量多、离子峰的个数和强度均较好, 从而确定交好的试验方法。这可能是由于组合溶剂处理过程中, 水能够洗掉培养基中水溶性杂质, 乙醇能洗掉培养基中的其它类杂质, 也因此不同培养基对细菌质量图谱的影响很小。甲酸能够保护分析物质、避免分解、并有利于获得稳定的结果。

本研究中, 供试细菌的同属不同种间有明显差异, 而没有属的特征离子峰, 这与 Mazzeo 等报道的食源型耶尔森氏菌的 MALDI-TOF 分析结果相一致^[11]。本研究还进行了标准菌株 IQCC5 和分离菌株 IQCC4 质谱鉴定的研究, 结果显示 2 个菌株之间不仅具有很大的相似性, 而且还有明显的差异。所以, 在应用 MALDI-TOF 进行未知的分离菌株的分类和鉴定将具有很大的可行性。

本文着重研究建立应用 MALDI-TOF 技术区分鉴定植物病原细菌的方法, 鉴于目前菌种来源的限制, 下一步将基于已建立的此方法进行更多标准菌株进行 MALDI-TOF 分析, 实现对植物及食品中的病原菌质量指纹图谱数据库的建立及通过快速搜索实现对测试菌的鉴定发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 2001, 20(4): 157-171.
- [2] 吴多加, 李凤琴. 在食品微生物检测和鉴定应用的一种质谱新技术. *中华预防医学杂志*, 2005, 39(5): 361-363.
- [3] 刘海洪, 杜宗敏, 杨瑞馥. MALDI-TOF-MS 在细菌检测和鉴定中的应用. *微生物学免疫学进展*, 2003, 31(2): 47-53.
- [4] Phan-Thanh L, Mahouin F. A proteomic approach to study the acid response in *Listeria monocytogenes*. *Electrophoresis*, 1999, 20(11): 2214-2224.
- [5] Bernardo K, Pakulat N, Macht M, et al. Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using

- matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proteomics*, 2002, **2**(6): 747–753.
- [6] Johanna EC, Faith AH. Discrimination between wild- type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, **389**(5): 1558–1565.
- [7] Demirev PA, Lin JS, Pineda F, *et al.* Bioinformatics and mass spectrometry for microorganism identification: proteome-wide post-translational modifications and database search algorithms for characterization of intact *H. pylori*. *Analytical Chemistry*, 2001, **73**(19): 4566–4573.
- [8] Liu YC, Li YB. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic separation and absorbance measurement. *Journal of microbiological methods*, 2002, **51**(3): 369–377.
- [9] Wunschel SC, Jarman KH, Petersen CE, *et al.* Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry: an inter-laboratory comparison. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2005, **16**(4): 456–462.
- [10] 葛云英, 郭坚华. 小麦苗枯病菌的 ITS 分析及 PCR 检测. *植物病理学报*, 2003, **33**(3): 198–202.
- [11] Mazzeo MF, Sorrentino A, Gaita M, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(2): 1180–1189.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,原“高等院校教学”,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其它实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“精品教学”版块,原“名师讲堂”。邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿!欢迎对本栏目多提宝贵意见!