

单增李斯特氏菌 MALDI-TOF-MS 鉴定与分型研究

王耀^{1,2}, 曹际娟^{2,*}, 赵昕², 郑秋月², 王刚², 田卓³, 史媛媛⁴, 曹远银¹

(1. 沈阳农业大学植物保护学院植物免疫研究所, 辽宁 沈阳 110161; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 辽宁 大连 116001; 3. 庄河出入境检验检疫局, 辽宁 庄河 121013; 4. 营口出入境检验检疫局, 辽宁 营口 115000)

摘要: 为建立单增李斯特氏菌的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)快速鉴定与分型方法, 实验收集 37 株单增李斯特氏菌分离株, 应用 MALDI-TOF-MS 采集图谱, 获取独特的蛋白质指纹图谱, 汇总成标准图谱, 建立单增李斯特氏菌鉴定数据库。采用单增李斯特氏菌标准菌株进行验证, 表明鉴定结果的可信度很高。在数据库信息的基础上, 对 37 株单增李斯特氏菌分离株进行聚类分型。分型结果表明, 在蛋白质水平上, MALDI-TOF-MS 可把 37 株单增李斯特氏菌分成 9 个型别。

关键词: 单增李斯特氏菌; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS); 鉴定; 分型

Identification and Subtyping of *Listeria monocytogenes* by MALDI-TOF-MS

WANG Yao^{1,2}, CAO Ji-juan^{2,*}, ZHAO Xin², ZHENG Qiu-yue², WANG Gang²,
TIAN Zhuo³, SHI Yuan-yuan⁴, CAO Yuan-yin¹

(1. Institute of Plant Immunology, College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China; 3. Zhuanghe Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuanghe 121013, China; 4. Yingkou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yingkou 115000, China)

Abstract: In order to establish a matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) method for the rapid identification and subtyping of *Listeria monocytogenes*, 37 *Listeria monocytogenes* isolates were tested using MALDI-TOF-MS and characteristic protein fingerprints from their spectra were acquired and summarized into standard spectra to construct a database for the identification of *Listeria monocytogenes*. The method was highly reliable as demonstrated by the results obtained by the method for standard *Listeria monocytogenes* strains. Based on the identification database constructed, the *Listeria monocytogenes* isolates were classed into 9 subtypes at the protein level.

Key words: *Listeria monocytogenes*; matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF-MS); identification; subtyping

中图分类号: Q503

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)03-0194-05

单增李斯特氏菌为典型的胞内寄生菌, 能在巨噬细胞和上皮细胞、内皮细胞和肝细胞内增殖, 是一种人畜共患病原菌^[1-2]。该菌可引起人和动物患脑膜炎、脑炎、败血症及造成孕妇流产、死胎等疾病^[3]。孕妇、新生儿、老年人和免疫缺陷者是易感人群^[4]。食源性李斯特氏菌发病率虽不高, 但死亡率可高达 20%~50%^[5]。WHO 在 20 世纪 90 年代已将其列为食品四大致病菌之一^[6]。该菌在自然界分布广泛, 以家畜、家禽为主要宿主,

很容易污染食品而引起食物中毒和李斯特病暴发^[7]。肉类、蛋类、禽类、海产品、乳制品、蔬菜等都被证实是李斯特氏菌的感染源^[8]。

经典的单增李斯特氏菌检测方法是进行增菌、选择性分离培养、初筛、鉴定等步骤。这种方法耗时长, 程序繁琐, 试剂和人力成本均较高。此外, 还有免疫磁性分析法^[9]、PCR 法^[10]、实时 PCR 法^[11]等许多快速检测方法。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-

收稿日期: 2011-03-11

基金项目: 国家质检总局科研项目(2010IK175); 国家质检公益性行业科研项目(200910270)

作者简介: 王耀(1982—), 男, 博士, 研究方向为有害生物与环境安全。E-mail: wangyao_00@126.com

* 通信作者: 曹际娟(1968—), 女, 研究员, 博士, 研究方向为食品安全检验。E-mail: cjj0909@163.com

assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)是近几年发展起来的一种新型软电离生物质谱。它能完成细菌多种成分的分析,包括蛋白质、脂类、脂多糖和脂寡糖、DNA、多肽及其他能被离子化的分子。细菌含有一些成分,能给出唯一的质荷比,因此可作为生物标志分子进行细菌的特异性鉴定。由于其具有快速、准确、灵敏、分辨率高和高质量检测范围等优点, MALDI-TOF-MS 已经逐渐成为临床诊断、食品生产、环境检测以及军事领域研究的一种有力手段^[12]。但是细菌比对标准数据库的资源不足是其局限性之一^[13]。目前, Biotyper 数据库仍需要不断补充单增李斯特氏菌的特征谱图。因此,本研究利用 MALDI-TOF-MS 软件支持用户自定义数据库的特点,按统一的建库标准,采集 37 株单增李斯特氏菌分离株的数据并获得特征指纹图谱,添加创建质谱图数据库,并进一步开展单增李斯特氏菌鉴定和分子分型研究。

1 材料与方法

1.1 材料

37 株单增李斯特氏菌分离株用于建立 MALDI-TOF-MS 鉴定数据库,具体信息见表 1。标准菌株单增李斯特氏菌 1a 血清型 ATCC 19111、2a 血清型 ATCC 19112、4a 血清型 ATCC 19114、4b 血清型 ATCC 19115、4e 血清型 ATCC 19118、不溶血型 ATCC 15313、ATCC BAA-751、ATCC 7644 购自美国典型菌种保藏中心(ATCC);不溶血

型 NCTC 10890 购自中国国家标准菌库(NCTC),用于验证所建立数据库的鉴定可信度。

1.2 试剂与仪器

α - 氰 -4- 羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid, CHCA)、乙腈(acetonitrile, ACN)、三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)、肽标准品、蛋白标准品 德国 Bruker Daltonik GmbH 公司;营养琼脂(nutrient agar, NA)、检测样品配制基质的溶剂为 ACN、TFA、水(体积比 50:2.5:47.5)、标准肽溶液配制基质的溶剂为 ACN、TFA、水(体积比 30:0.1:69.9)、MALDI-TOF-MS 基质溶液(用溶剂将基质配成饱和溶液,基质溶液现用现配)美国 BD 公司; API-20E 生化鉴定试剂盒 法国梅里埃公司。

Microflex LRF20 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 德国 Bruker Daltonik GmbH 公司; PHOENIX-100 全自动细菌生化分析仪 美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 分离菌株的鉴定

本研究对收集到的单增李斯特氏菌分离株,经 API-20E 生化鉴定和全自动细菌生化分析仪鉴定,37 株分离菌株均具有单增李斯特氏菌典型的生化特性,生长旺盛,可用于建立 MALDI-TOF MS 鉴定数据库。对这 37 株单增李斯特氏菌进行唯一性编号,用于建立 MALDI-TOF MS 鉴定数据库。

1.3.2 MALDI-TOF-MS 检测

1.3.2.1 样品处理与点样

表 1 单增李斯特氏菌分离株信息一览表
Table 1 Details of 37 *Listeria monocytogenes* isolates tested in this study

序号	菌株编号	样品名称	样品来源	分离日期	序号	菌株编号	样品名称	样品来源	分离日期
1	DD-L20	冻鲑鱼	中国丹东	2009-03	20	SD-L-A5-15	冻猪耳	美国	2008-10
2	DD-L21	冻章鱼	朝鲜	2004-09	21	SD-L-A5-6	猪耳	欧洲	2009-11
3	DD-L25	冻海螺	朝鲜	2005-06	22	SD-L-DAH1-11	冻带鱼	新西兰	2007-04
4	DD-L26	冻青柳蛤	朝鲜	2004-03	23	SD-L-F1-1	山东出入境检验检疫局	不详	2009-03
5	DD-L29	冻章鱼	朝鲜	2006-09	24	GD-L5	广东出入境检验检疫局	不详	2006-07
6	DD-L31	冻鲑鱼	中国丹东	2006-03	25	GD-L6	广东出入境检验检疫局	不详	2005-09
7	DD-L32	冻章鱼	朝鲜	2005-06	26	GD-L9	三文鱼	挪威	2004-12
8	DD-L33	冻章鱼	朝鲜	2004-09	27	GD-L10	泥猛鱼	广州	2006-09
9	DD-L35	冻章鱼	朝鲜	2004-12	28	GD-L12	冻猪耳	加拿大	2006-12
10	DD-L36	冻河螺	朝鲜	2004-12	29	GD-L14	冻虾仁	广东	2007-09
11	DD-L37	紫石房蛤	朝鲜	2004-12	30	GD-L15	冻鸡爪	美国	2010-01
12	DD-L44	冻鲑鱼	朝鲜	2006-07	31	GD-L16	冻鸡翅	美国	2010-01
13	DD-L51	海鲜组合	中国丹东	2009-08	32	GD-L17	冻鱼	挪威	2009-12
14	DD-L52	冻煮鲑鱼	中国丹东	2009-04	33	GD-L18	冻猪脚	丹麦	2008-04
15	DD-L54	鲑鱼	中国丹东	2008-09	34	GD-L19	冻猪脚	丹麦	2009-06
16	DD-L55	冻杂色蛤	中国丹东	2008-12	35	GD-L26	鳗鱼	广东	2005-08
17	DD-L58	鲑鱼	中国丹东	2009-12	36	GD-L27	冻刀鱼	印度	2007-05
18	SD-L-A2-5	冻鸡肉	挪威	2007-06	37	GD-L28	鸭翅	法国	2007-05
19	SD-L-A5-5	山东出入境检验检疫局	不详	不详					

根据 GB4789.30—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》取单增李斯特氏菌新鲜培养物, 在 Eppendorf 管中加入 300 μL 纯净水, 挑取适量(5~10mg)菌体, 混匀, 再加入 900 μL 无水乙醇, 混匀后以 13000r/min 离心 2min, 弃去上清液, 加入 50 μL 70% 甲酸, 混匀, 再加入 50 μL 乙腈, 混匀, 同样以 13000r/min 离心 2min, 吸取上清液, 涂布于 96 孔样品板上, 自然晾干 1h 后, 用基质溶液(CHCA)覆盖菌苔, 用标准肽溶液覆盖校准孔, 每孔 1 μL 。晾干 5min 后进样。

MALDI-TOF-MS 仪器参数为: 线性操作模式, 正离子模式; 检测分子质量范围: 3000~13000D; 激光点击数: 每个图谱 50; 激光频率: 30.0Hz; 离子源加速电压: 20kV。采用氮激电源, 质荷比(m/z)数据采集范围为 800~17378D。

1.3.2.2 数据采集

将上样的样品板小心置于板孔中, 加有样品一面朝上。盖上盖子, 抽真空。打开仪器控制软件 FlexControl, 调好仪器参数, 校准仪器。采集标准品及样品的质谱图。对采集的数据进行保存, 每次实验前都要在采集数据的质量范围内使用肽标准品进行校准, 校正后进行质谱数据采集, 通过 Biotyper 软件进行分析鉴定。

1.3.2.3 建立数据库

将单增李斯特氏菌分离株分别接种于 NA 培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24h, 得到新鲜菌株培养物。取每个菌株培养物再分别平行接种 5 个 NA 斜面, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24h, 得到 5 个平行样品。按 1.3.2.1 节的方法进行样品处理与点样, 每个平行样品重复点两个样品孔。每株菌共点 10 个样品孔。按 1.3.2.2 节的方法校准仪器后, 点击样品孔采集数据, 每个样品孔点击 10 次, 采集 2 个质谱图。每株菌可以采集 20 个质谱图。使用 BioTyper 软件, 分别调入所采集的每株单增李斯特氏菌的 20 个质谱图, 将此 20 个质谱图汇总生成整合图谱, 对所得的图谱进行分析统一化, 该图谱便作为单增李斯特氏菌质谱图数据库的标准图谱。

1.3.3 结果判断

鉴定结果给出数据库中与鉴定菌种最为匹配的 10 个菌株种属, 并给出相对应的分数。匹配分数在 2.300~3.000 之间, 标记为(+++), 表示菌种鉴定的可信度很高; 在 2.000~2.299 之间, 标记为(++), 表示保守的菌属鉴定或可能的菌种鉴定; 在 1.700~1.999 之间, 标记为(+), 表示可能的菌属鉴定; 在 0.000~1.699 之间, 标记为(-), 表示不可信的鉴定。

2 结果与分析

2.1 单增李斯特氏菌 MALDI-TOF-MS 鉴定数据库的建立

本研究对供试 37 株单增李斯特氏菌分离株全部进行了采集与图谱汇总, 建立标准图谱, 最终建成包含 37 株单增李斯特氏菌信息的独立的鉴定数据库, 将其标注编号为 No.LMLNCJJ20100503。这 37 株单增李斯特氏菌分离株的主要离子峰基本一致, 非常稳定。以单增李斯特氏菌(SD-L-A5-6)为例, 如图 1 所示, 经 MALDI-TOF-MS 分析, 单增李斯特氏菌(SD-L-A5-6)主要离子峰为: m/z 3252.30、3702.88、4325.83、4878.28、6365.26、7405.70、9263.51、9757.97、10241.49。

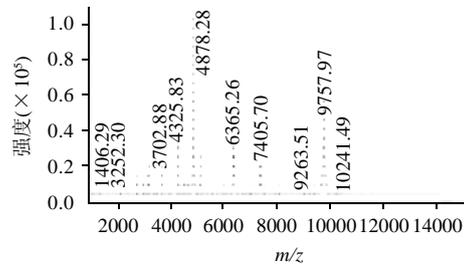


图 1 MALDI-TOF-MS 分析单增李斯特氏菌(SD-L-A5-6)的主要离子峰图谱

Fig.1 MALDI-TOF-MS spectrum of *Listeria monocytogenes* showing major ion peaks

为验证单增李斯特氏菌数据库的鉴定效果, 将 9 株单增李斯特氏菌标准菌株(ATCC 19111、ATCC 19112、ATCC 19114、ATCC 19115、ATCC 19118、ATCC 15313、ATCC BAA-751、ATCC 7644、NCTC 10890) 分别进行 MALDI-TOF-MS 鉴定, 分析在数据库中的匹配结果。经鉴定, 9 株标准菌株的匹配分数全部大于 2.300, 均报告为单增李斯特氏菌, 表明鉴定结果的可信度很高。

2.2 37 株单增李斯特氏菌 MALDI-TOF-MS 聚类分型鉴定结果

通过模式匹配计算新数据库(No.LMLNCJJ20100503)中 37 株单增李斯特氏菌主要谱图的相似性, 采用相似分值构建系统树, 对 37 株菌进行聚类分型分析。37 株单增李斯特氏菌聚类分型树状图如图 2 所示。差异水平代表彼此间的亲缘关系, 其值在 0 到 1.6 之间。差异为 0 表示两个 MALDI-TOF-MS 质谱图完全相同, 可归属为同一类; 差异为 1.6 时表示两株菌之间的亲缘关系最远。所选择的差异水平不同, 则单增李斯特氏菌被分型的数目

不一。在差异水平为 0.7~0.8 之间时, MALDI-TOF-MS 分型结果将 37 株菌分成 4 个型; 在差异水平为 0.5 时, 将 37 株菌分成 7 个型; 在差异水平为 0.3~0.4 之间时, 将 37 株菌分成 9 个型。

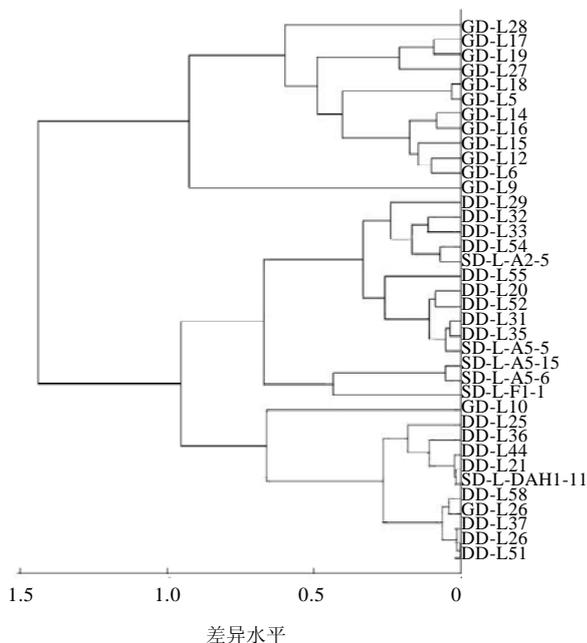


图2 37株单增李斯特氏菌 MALDI-TOF MS 聚类分型树状图
Fig.2 Clustering dendrogram of 37 *Listeria monocytogenes* isolates

由图 2 可见, 从朝鲜进口的冻章鱼、海螺、青柳蛤、河螺、紫石房蛤、鱿鱼中分离出来的单增李斯特氏菌(编号为 DD-L21、DD-L25、DD-L26、DD-L36、DD-L37、DD-L44)与从中国丹东的海鲜组合、鱿鱼中分离出来的单增李斯特氏菌(编号为 DD-L51、DD-L58)属于同一型, 亲缘关系非常近, 表明这些菌株可能为同一个污染源, 都来源于中国丹东和朝鲜边境的鸭绿江水域。而从新西兰进口的冻带鱼(SD-DAH1-11)、中国广东的鳗鱼(GD-L26)中分离出来的单增李斯特氏菌, 从分型结果来看, 也与上述菌株具有比较近的亲缘关系。

从中国丹东的鱿鱼、杂色蛤等 5 个样品中分离出来的单增李斯特氏菌(编号为 DD-L20、DD-L31、DD-L52、DD-L54、DD-L55), 与从朝鲜进口的 4 个冻章鱼样品中分离出来的单增李斯特氏菌(编号为 DD-L29、DD-L32、DD-L33、DD-L35), 属于同一型, 亲缘关系非常近, 表明这些菌株可能为同一个污染源, 都来源于中国丹东和朝鲜边境的鸭绿江水域。而山东出入境检验检疫局提供的从挪威进口的冻鸡肉中分离的单增李斯特氏菌(SD-L-A2-5)和来源信息不详的菌株(SD-L-A5-5), 从分型结果来看, 也与上述菌株具有比较近的亲缘关系。

广东出入境检验检疫局从加拿大、美国、挪威、丹麦、印度、法国进口的冻猪耳、冻鸡爪、冻鸡翅、冻鱼、冻猪脚、带鱼、鸭翅中分离出来的单增李斯特氏菌(编号为 GD-L12、GD-L15、GD-L16、GD-L17、GD-L18、GD-L19、GD-L27、GD-L28)属于同一型, 亲缘关系比较近, 表明这些菌株可能为同一个污染源。而从广东冻虾仁中分离出来的单增李斯特氏菌(GD-L14)以及广东出入境检验检疫局提供的来源信息不详的两株菌株(GD-L5、GD-L6), 从分型结果来看也与上述菌株具有比较近的亲缘关系。

此外, 从挪威进口的三文鱼和中国广州泥猛鱼中分离出来的单增李斯特氏菌(编号分别为 GD-L9、GD-L10), 却与其他 35 株单增李斯特氏菌分离株都不属于同一型, 与它们的亲缘关系最远。

3 讨论

利用质谱进行细菌鉴定的研究始于 30 多年前^[14], 但直到 1988 年 Tanaka 和 Hillenkamp 两个研究组分别提出基质辅助激光解吸电离这种“软电离”方式, 才使得质谱技术应用于生物大分子的分析得到飞跃性进步^[15]。其具有的高灵敏度、高准确度及高分辨率等特点已使之成为生命科学研究领域的一种强有力的分析测试手段。曾有科学家预言, 21 世纪是 MALDI-TOF-MS 的世纪^[16]。因为蛋白质在微生物体内的含量较高, 所以常被用于细菌属、种和株的鉴定。MALDI-TOF-MS 被用于分析蛋白质及酶消化产物的研究也较多。如 Dieckmann 等^[17]利用蛋白质质谱分析, 建立了沙门氏菌在种和亚种水品的分类鉴定方法。徐昕荣等^[18]利用 MALDI-TOF-MS 对生物脱氮废水处理系统中分离得到的两株细菌进行蛋白质质量指纹图谱分析, 建立了生物脱氮细菌的快速鉴定方法。本研究通过采集 37 株单增李斯特氏菌分离株的数据并获得特征指纹图谱, 创建了单增李斯特氏菌鉴定质谱图数据库, 可以实现对单增李斯特氏菌的准确鉴定。

本研究在建立单增李斯特氏菌数据库的同时, 还通过模式匹配计算数据库中单增李斯特氏菌主要谱图的相似性, 构建系统树进行分型, 可以分析菌株之间的亲缘关系, 追溯可能的污染源。在以往的分型方法中, 脉冲场电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)分型方法被誉为分子流行病学中的“金标准”^[19], 其分辨率高, 可区分不同菌株间的细微差别, 其不足之处是实验技术较难掌握, 且实验耗时, 相应的试剂费用比较昂贵。MALDI-TOF-MS 和 PFGE 分型分别代表了同一菌株基于蛋白质和 DNA 分型的两个方面, 二者结合使用可扩大基因型对亚种水平的分型能力, 是 PFGE 方法的补充。

参考文献:

- [1] AWAISHEH S S. Survey of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* sp. contamination in different common ready-to-eat food products in Jordan[J]. Pak J Biol Sci, 2009, 12(23): 1491-1497.
- [2] GUILLET C, JOIN-LAMBERT O, le MONNIER A, et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(1): 136-138.
- [3] JACKSON K A, IWAMOTO M, SWERDLOW D. Pregnancy-associated listeriosis[J]. Epidemiol Infect, 2010, 17: 1-7.
- [4] 曹际娟. 食品微生物学与现代检测技术[M]. 大连: 辽宁师范大学出版社, 2006: 150-187.
- [5] 董丽丽, 王春生, 安笑秋, 等. 单核细胞增生李斯特菌简介[J]. 中国乡村医药, 2000, 7(12): 24-25.
- [6] RYSER T, ELMER H M. Listeriosis and food safety[J]. Marcel Dekkeinc, 1991, 6(2): 214-216.
- [7] GILMOUR M W, GRAHAM M, van DOMSELAAR G, et al. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 120.
- [8] WAŁECKA E, MOLEND A J, BANIA J. The impact of environmental stress on *Listeria monocytogenes* virulence[J]. Pol J Vet Sci, 2009, 12(4): 575-579.
- [9] 寇运同, 雷质文, 林修光, 等. 用免疫磁珠捕集法快速检测食品中的单核细胞增生李斯特菌[J]. 检验检疫学, 2001, 11(6): 12-13.
- [10] KEROUANTON A, MARAULT M, PETIT L, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping[J]. J Microbiol Methods, 2010, 80(2): 134-137.
- [11] O'G RADY J, RUTTLEDGE M, SEDANO-BALBÁS S, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR[J]. Food Microbiology, 2009, 26(1): 4-7.
- [12] 刘海洪. MALDI-TOF-MS在细菌检测和鉴定中的应用[J]. 微生物免疫学进展, 2003, 31(2): 47-53.
- [13] BRIGHT J J, CLAYDON M A, SOUFIAN M, et al. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software[J]. J Microbiol Methods, 2002, 48: 127-138.
- [14] ANHALT J P, FENSELAU C. Identification of bacteria using mass spectrometry[J]. Anal Chem, 1975, 47(2): 219-225.
- [15] 张永乐, 娄国强. 生物质谱分析的研究进展及临床应用[J]. 生物医学工程学进展, 2009, 30(2): 103-106.
- [16] MILLER G M, BYRD S E, KUZNICKY R I. Nature insight: functional genomics[J]. Nature, 2000, 405: 819-846.
- [17] DIECKMANN R, HELMUTH R, ERHARD M, et al. Rapid classification and identification of *Salmonellae* at the species and sub species levels by whole cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(24): 7767-7778.
- [18] 徐昕荣, 朱斌, 马瑜璐, 等. MALDI-TOF-MS 鉴定生物脱氮细菌的方法研究[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(10): 148-161.
- [19] 王丽丽, 徐建国. 脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)在分子分型中的应用现状[J]. 疾病监测, 2006, 21(5): 276-279.