

· 论 著 ·

MALDI-TOF-MS 检测哈维弧菌前处理条件的探索及聚类分析*

武 静, 陈英剑, 李继霞, 胡成进[△]

(中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院实验诊断科, 山东济南 250031)

摘要:目的 对基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)检测哈维弧菌的前处理条件进行优化,并通过聚类分析初步探讨质谱对哈维弧菌溯源性的价值。方法 本研究首先利用 rpoB 测序对 33 株哈维弧菌进行确证,然后利用 MALDI-TOF-MS 采集哈维弧菌蛋白指纹图谱。并通过培养基的选择、培养时间及样本处理方法对检验前操作程序进行优化。最后,利用 MALDI-TOF-MS 对 33 株哈维弧菌进行聚类分析,探讨质谱对细菌溯源性的价值。结果 本研究所用 3 种培养基的选择对哈维弧菌的鉴定结果差异无统计学意义($P>0.05$)。培养时间 18、24 h 哈维弧菌的鉴定结果优于 48 h 的鉴定结果,差异有统计学意义($P<0.05$)。但培养 18、24 h 之间鉴定结果差异无统计学意义($P>0.05$)。甲酸提取法的效果明显优于直接涂抹法,差异有统计学意义($P<0.05$)。基于 MALDI-TOF-MS 法的聚类分析,能哈维弧菌病感染病原体的溯源提供理论依据。结论 MALDI-TOF-MS 法操作简单、快速,可实现对哈维弧菌的准确鉴定和溯源性分析,在海洋渔业和海水养殖业将会发挥重要作用。

关键词:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 哈维弧菌; 快速检测; rpoB 分析; 聚类分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.01.004

中图分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2020)01-0014-04

文献标识码:A

Exploration of pretreatment conditions and cluster analysis for detection of *Vibrio harveyi* by MALDI-TOF-MS*

WU Jing, CHEN Yingjian, LI Jixia, HU Chengjin[△]

(Departments of Laboratory Medicine, 960 Hospital of PLA, Jinan, Shandong 250031, China)

Abstract: Objective The pretreatment conditions for detection of *Vibrio harveyi* by Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) were optimized, and the value of mass spectrometry in traceability of *Vibrio harveyi* was preliminarily discussed by cluster analysis. **Methods** In this study, 33 strains of *Vibrio harveyi* were first confirmed by rpoB sequencing, and then the protein fingerprints were collected by MALDI-TOF-MS. The operation procedure was optimized through the selection of culture medium, culture time and sample processing method. Finally, 33 strains of *Vibrio harveyi* were clustered by MALDI-TOF-MS to explore the value of mass spectrometry in traceability of bacteria. **Results** There was no significant difference in the identification result of *Vibrio harveyi* among the three media ($P>0.05$). The identification results of *Vibrio harveyi* at 18 and 24 h were better than that at 48 h ($P<0.05$). However, there was no significant difference between 18 and 24 h ($P>0.05$). Formic acid extraction method was better than direct smear method ($P<0.05$). Cluster analysis based on MALDI-TOF-MS provides a theoretical basis for tracing the pathogens of *Vibrio harveyi* infection. **Conclusion** MALDI-TOF-MS method is simple and fast, and can accurately identify *Vibrio harveyi* and analytical traceability. It will play an important role in marine fisheries and mariculture industry.

Key words: MALDI-TOF-MS; *Vibrio harveyi*; rapid detection; rpoB analysis; cluster analysis

哈维弧菌又称哈氏弧菌,为革兰阴性嗜盐菌,是海水中重要的机会性致病菌,主要引起虾及鱼类和贝

* 基金项目:全军医学科技“十二五”重点项目(BWS12J014)。

作者简介:武静,女,主治医师,主要从事海洋弧菌的鉴定方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: hcj6289@163.com。

本文引用格式:武静,陈英剑,李继霞,等. MALDI-TOF-MS 检测哈维弧菌前处理条件的探索及聚类分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41

类的感染,引发死亡率较高的弧菌病^[1-3]。据报道^[4],该菌可引起泰国、印度、澳大利亚、中国等地的斑节对虾、墨吉明对虾、长毛明对虾等不同种类对虾和鱼类、贝类大量死亡,严重危害水产养殖业发展^[5]。还可引起法国、日本、欧洲的鲍鱼于 2 天内发生大批量死亡,产生巨大经济损失。研究显示^[6],不同弧菌对不同抗菌药的敏感性不同,对弧菌病的诊断鉴定到种十分必要。因此,为快速诊断并有效治疗哈维弧菌感染,急需一种快速、有效的检测手段。

目前,我国国家标准中还没有哈维弧菌的检测方法。哈维弧菌的菌落无明显特征,且镜下形态与其他弧菌相似。VITEK-Compact 是传统微生物检测方法中最常用的微生物鉴定仪器,而依据产品说明书,V2S 5.01 细菌库中 GN 卡仅能够鉴定包括溶藻弧菌和副溶血性弧菌在内的 8 种弧菌,未包含哈维弧菌。文献报道的哈维弧菌检测多是基因测序方法^[7-9]。基因测序对于哈维弧菌的鉴定有明显的优势,但操作繁琐,对操作人员技术要求高,操作时间长,不适宜常规开展。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)是近年发展起来的一种全新的用于微生物快速鉴定的技术,具有快速、稳定、准确、重复性好的特点。本研究基于 MALDI-TOF-MS 检测哈维弧菌,对其前处理条件及聚类分析进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 哥伦比亚血琼脂培养基、TCBS 即硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基、2216E 培养基; α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)基质、50%乙腈、2.5%三氟乙酸。

1.1.2 菌株来源 33 株哈维弧菌,分布于中国黄渤海海域、美国及日本沿海区域,分离自患病的海洋动物及海水中。

1.1.3 主要仪器 MALDI-TOF-MS(型号:布鲁克 autoflex speed);靶板 MSP 96 target polished steel;数据采集软件 flexControl3.4;数据分析软件 flexAnalyses3.4;结果鉴定软件 Biotyper3.1,该软件自带 Biotyper3.1 数据库。恒温培养箱(美国 SHEL-LAB 公司);II 级生物安全柜(新加坡 ESCO 公司),购自美国 Baker 公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取及 rpoB 测序 所有菌株接种在 2216E 培养基,28 °C 孵育箱恒温培养 24 h。无菌 EP 管中加入 50 μ L 无菌水,挑取单个菌落,调制菌液至 2 浊度,震荡混匀;置 100 °C 沸水中煮沸 10 min,冰上放置 10 min;13 000 r/min 离心 5 min,上清液即

为 DNA 提取液。取上述步骤提取的基因组 DNA 作为 PCR 反应模板,进行 rpoB 基因扩增。PCR 反应程序为预变性 94 °C 8 min;循环 94 °C 40 s,55 °C 40 s,72 °C 1 min 30 s,30 循环;72 °C 延伸 8 min。反应引物 F:AGG CGT GTT CTT CGA CAG CGA TAA, R:TCG TCC ACT TCG CCT TTA CC。扩增产物送英潍捷基(上海)贸易有限公司完成测序,利用 NCBI 中 Blast 软件进行比对。

1.2.2 细菌质谱鉴定 哈维弧菌接种于哥伦比亚血琼脂培养基、TCBS 琼脂培养基和 2216E 培养基,37 °C 分别培养 16、24、48 h 后,同时采用两种方法进行样本前处理。直接涂抹法:在平板上挑取单个菌落均匀涂于靶板上,即刻在涂布的菌落上加入 1 μ L HCCA 基质液覆盖,在室温下自然干燥后进行检测,每个菌株重复检测 2 次。甲酸提取法:在 EP 管中加入 300 μ L 去离子水。取待测微生物样本至离心管中。充分混匀。加入 900 μ L 乙醇,13 000 r/min 离心 2 min,倒去上清。再次离心,使用移液枪完全去除残余的上清,整个过程不应触碰沉淀液。室温下干燥沉淀 2~3 min。加入 70%甲酸水溶液(1~80 μ L,根据生物量调整),涡旋振荡。加入纯乙腈(1~80 μ L,与甲酸等体积),充分混匀。13 000 r/min 离心 2 min。吸取 1 μ L 上清,滴加到 MALDI 靶板上。半小时内,用 1 μ L HCCA 基质溶液覆盖上述样品点。

用 flexControl3.4 软件采集图谱,并用 flexAnalyses3.4 软件对图谱进行分析。根据所得图谱与仪器数据库参考图谱匹配程度,用 BioTyper3.1 软件可得到 0~100 的分值(对数值为 1~3)。仪器参数为:线性操作、正离子模式;检测范围:(2~20) $\times 10^3$;激光点击数:每图谱 50 shots;激光频率:30.0 Hz;离子源加速电压:20 kV。

1.2.3 质谱聚类分析 利用 Biotyper 3.1 软件的 cluster analysis 功能对 33 株菌进行聚类分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行分析。不同培养基、不同培养时间以及不同处理方法下“属”“种”水平鉴定结果比较用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质谱图及蛋白峰差异 将每株菌产生的所有峰经过归一化处理、阈值设定、排除异常峰,挑选出 60 个峰进行分析。所有的实验菌株在 m/z 为 4 278、5 183、6 129、6 410、7 210 附近均出现高强度蛋白峰。研究显示^[10-11],质谱独特蛋白峰型的存在可能是特异性蛋白或毒力性的标志,可能预测耐药情况。这些种特异性蛋白峰,有可能成为哈维弧菌的分子标志物,尚需要进一步的研究去证实。

2.2 不同培养基对哈维弧菌鉴定的影响 假设不同培养时间及不同前处理方法对不同培养基的鉴定结果无影响。本文仅列出了培养 18 h 甲酸提取法条件下的统计结果。哈维弧菌在哥伦比亚血琼脂培养基、TCBS 琼脂培养基和 2216E 培养基中的培养鉴定结果比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 不同培养基鉴定结果比较 [n (%)]

培养基类型	鉴定至属 (≥ 1.7)	鉴定至种 (≥ 2.0)
血平板	32(96.9)	28(84.8)
TCBS 培养基	31(93.9)	29(87.8)
2216E 培养基	31(93.9)	29(87.8)

2.3 不同培养时间对哈维弧菌鉴定的影响 不同培养基的选择对鉴定结果无明显影响, 假设前处理方法的选择对不同培养时间的鉴定结果无影响, 本文仅对血平板甲酸提取法条件培养时间对鉴定结果的影响进行了探讨。结果显示, 培养 18、24 h 的鉴定准确率, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。但培养 48 h 鉴定准确率明显低于培养 18、24 h 的鉴定准确率, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同培养时间鉴定结果比较 [n (%)]

培养时间	鉴定至属 (≥ 1.7)	鉴定至种 (≥ 2.0)
18 h	32(96.9)	28(84.8)
24 h	31(93.9)	29(87.8)
48 h	29(87.8)	27(81.8)

2.4 不同前处理方法对哈维弧菌鉴定的影响 选择血平板、培养 18 h 条件下探讨前处理方法的影响。甲酸提取法鉴定准确率明显高于直接转移法的鉴定准确率, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 不同前处理方法鉴定结果比较 [n (%)]

前处理方法	直接转移法	甲酸提取法
鉴定至属 (≥ 1.7)	30(90.9)	32(96.9)
鉴定至种 (≥ 2.0)	26(78.7)	28(84.8)

2.5 质谱聚类分析 见图 1。在距离水平为 900 的时候被分成了 2 支, 其中一支用 B 表示, 主要包括哈维弧菌 20、21、22、25、26、27、29、30、31、32, 该 10 株菌均分离自中国。其余归为一支, 用 A 表示。在距离水平为 700 左右时又被分为两个分支, 其中一支包括 1、2、3、4、5、6、14、19、23、24、33 共 11 株菌, 该 11 株菌除 3、19、24、33 外其余均分离自美国。另一支包括 7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、28, 分离自西班牙、突尼西亚、厄瓜多尔、丹麦等多为欧洲地区。可见地理位置较近的菌株被归为相同分支。

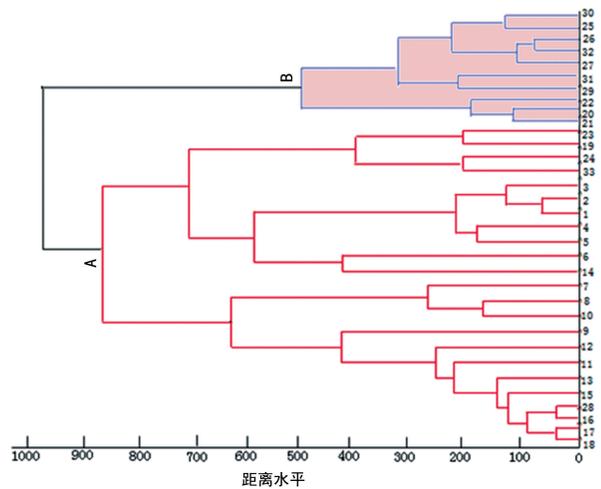


图 1 33 株哈维弧菌 MALDI-TOF-MS 指纹图谱聚类分析

3 讨论

16S rRNA 序列分析为公认的细菌鉴定的金标准。然而由于海洋细菌基因序列高保守性和高同源性的特点, 16S rRNA 测序并不能对海洋弧菌进行可靠鉴定。编码 RNA 聚合酶 β 亚基的基因 *rpoB*, 为序列较长的单拷贝基因, 可以克服 16S rRNA 的高度保守性^[12]。而且有研究已经证明 *rpoB* 基因, 可用于弧菌的分类^[13-14]。因此, 本研究采用 *rpoB* 基因测序作为哈维弧菌鉴定的参考方法。

质谱鉴定是将细菌直接点在靶板上, 通过激光照射使细菌电离, 收集所产生离子的 m/z 及强度, 与库中已知菌株的蛋白指纹图谱进行比较, 得出鉴定结果。从涂菌到取得结果只需几分钟, 具有快速、准确、高通量等明显优势。

不同的培养基和培养时间及前处理方法对细菌蛋白表达有一定影响, 会造成质谱图中峰点、峰信号强度、信噪比等的差异, 得到不可靠的鉴定结果。因此, 本研究针对哈维弧菌进行了质谱检测前条件的摸索。不同菌种对培养基的适宜生长程度不同。有研究利用不同培养基分离纯化食品中可疑沙门菌, 结果发现不同培养基培养出的沙门菌用 MALDI-TOF-MS 鉴定出的菌种不同^[15]。本研究中 3 种不同培养基培养鉴定分值没有明显差异, 可能 3 种培养基均能满足哈维弧菌的生长要求。但若菌落比较小难以挑取或取到培养基会显著影响鉴定可信度。短时间培养的选择 (18、24 h) 对鉴定结果的影响不明显, 可能因为对数生长期和稳定期核糖体蛋白比较稳定。长时间培养细菌生长进入衰亡期, 蛋白表达受到抑制。同时考虑到对细菌鉴定快速性的要求, 推荐使用对数生长期的菌落进行鉴定。直接转移法为将细菌直接涂到靶板上后再点加基质进行分析, 简单、快速、重复性好, 但结晶的均匀性较差。而甲酸提取法有细菌灭活和蛋白溶出的步骤, 可改善结晶的均匀性。甲酸提取

法中水和乙醇能洗掉培养基内的杂质,而甲酸能保护分析物质,避免分解。通过甲酸提取法前处理的细菌得到的质谱图离子峰较多,信噪比更高。

有研究显示^[16-17],不同海洋环境和地理位置会影响不同弧菌种和亚种的分布,同一菌的毒力和致病性也会随着地理位置的不同而改变。本研究对不同时间不同地点分离的 33 株哈维弧菌菌株的聚类分析也证实 MALDI-TOF-MS 不仅可以分类细菌而且对于一些致病菌的溯源分析具有重要价值,符合病原菌流行病学分析快速、有效的要求。因此,对海洋弧菌病爆发流行时感染性病原体的溯源,质谱检测将会发挥重要作用。

MALDI-TOF-MS 数据库中必须含有足够多的已知菌株,才可实现匹配度最高的鉴定。利用本研究中的前处理条件,33 株哈维弧菌已入库。相信随着数据库的不断补充,MALDI-TOF-MS 在海洋渔业养殖业的应用会越来越广泛。而且随着仪器趋向体积小和成本低方向的发展,质谱仪将会更加适合推广应用。

4 结 论

本研究提出了一种基于 MALDI-TOF-MS 快速检测哈维弧菌的新技术,首次探讨了前处理的适宜条件并对 33 株哈维弧菌进行了聚类分析,为海洋渔业哈维弧菌病的快速诊断及流行病学分析提供了理论依据。

参考文献

- [1] 赵吉臣,王刚,邓中宁,等.不同条件下哈维氏弧菌(*Vibrio harvey*)对墨吉明对虾(*Fenneropenaeus merguensis*)致病性研究[J].海洋与湖沼,2015,46(6):1413-1419.
- [2] 刘伟.斑节对虾 miR-7562 介导下 ATG5-ATG12 共轭系统应答哈维弧菌胁迫的作用机制研究[D].上海:上海海洋大学,2018.
- [3] 张美霞,耿慧君,王丽丽,等.哈维弧菌对水产动物的致病性及其噬菌体防控研究进展[J].中国抗生素杂志,2017,42(9):717-723.
- [4] 张晓华,冯娟,纪伟尚,等.中国对虾育苗池水中哈维氏弧菌的检测[J].青岛海洋大学学报,1998,40(1):74-78.
- [5] CARDINAUD M, DHEILLY N M, HUCHETTE S, et al. The early stages of the immune response of the European abalone *Haliotis tuberculata* to a *Vibrio harveyi* infection[J]. Dev Comp Immunol, 2015, 51(3):287-297.
- [6] 李晖,张喆,潘鲁青.麻保沙星对主要海洋致病性弧菌的体外抗菌活性及抗菌后效应[J].中国水产科学,2010,17(1):97-101.
- [7] 郑嘉来,阎永伟,唐姝,等.哈维弧菌 16S rRNA 基因拷贝数的种内变异[J].生物学杂志,2015,32(6):6-11.
- [8] HAN Y J, JO A, KIM S W, LEE H E, et al. Multiplex PCR using *YeaD* and 16S rRNA gene to identify major pathogens in vibriosis of *Litopenaeus vannamei*[J]. Genes Genomics, 2019, 41(1):35-42.
- [9] PANG J, WANG Q, FEI Y et al. A real-time recombinase polymerase amplification assay for the rapid detection of *Vibrio harveyi*[J]. Mol Cell Probes, 2019, 44:8-13.
- [10] JOSTEN M, DISCHINGER J, SZEKAT C, et al. Identification of agr-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Int J Med Microbiol, 2014, 304(9):1018-1023.
- [11] 孙宗科,张伟,陈西平.基质辅助激光解析电离飞行时间质谱快速鉴定耐甲氧西林金黄色葡萄球菌[J].卫生研究,2011,40(3):375-378.
- [12] KHOSRAVI A D, SADEGHI P, SHAHRAKI A H, et al. Molecular methods for identification of acinetobacter species by partial sequencing of the *rpoB* and 16S rRNA genes[J]. J Clin Diagn Res, 2015, 9(7):9-13.
- [13] TARR C L, PATEL J S, PUHR N D et al. Identification of vibrio isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(1):134-140.
- [14] KI J S, ZHANG R, ZHANG W, et al. Analysis of RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene sequences for the discriminative power of marine vibrio species[J]. Microb Ecol, 2009, 58(4):679-691.
- [15] 陈秀金,尹红红,匡华,等.沙门氏菌 MALDI-TOF-MS 蛋白质指纹图谱分析方法的研究[J].食品与生物技术学报,2012,31(11):1189-1197.
- [16] ROMALDE J L, DIEGUEZ A L, LASA A, et al. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review[J]. Front Microbiol, 2014, 4(3):413.
- [17] 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.

(收稿日期:2019-05-22 修回日期:2019-08-29)