

Establishment and Application of MALDI-TOF-MS Methods for Two Types of *Edwardsiella*

Bin Wu*, Huiqiu Liu, Liang Zhao, Yuting Zang, Peng Guan

Liaoning Entry Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian Liaoning
Email: *wubin69@163.com

Received: Sep. 3rd, 2017; accepted: Sep. 19th, 2017; published: Sep. 28th, 2017

Abstract

In this paper, the rapid MALDI-TOF-MS method was established to detect and identify *Edwardsiella ictaluri* and *Edwardsiella tarda*. The stability and repeatability of MALDI-TOF-MS were verified by *Vibrio parahaemolyticus*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*. The strains from different sources were detected in order to confirm the accuracy of this method. Through the comparison of MALDI-TOF-MS technology and traditional identification methods, the results showed that MALDI-TOF-MS were better than traditional methods in detection time, repeatability, stability, and other aspects. MALDI-TOF-MS could be used for *Edwardsiella ictaluri* and *Edwardsiella tarda* in daily detection.

Keywords

MALDI-TOF-MS, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, Detection, Identification

两种爱德华氏菌MALDI-TOF-MS检测方法的建立与应用

吴斌, 刘卉秋, 赵亮, 臧玉婷, 关鹏

辽宁出入境检验检疫局, 辽宁 大连
Email: *wubin69@163.com

收稿日期: 2017年9月3日; 录用日期: 2017年9月19日; 发布日期: 2017年9月28日

摘要

本文建立快速检测和鉴定鲶爱德华氏菌、迟钝爱德华氏菌的基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱
*通讯作者。

文章引用: 吴斌, 刘卉秋, 赵亮, 臧玉婷, 关鹏. 两种爱德华氏菌 MALDI-TOF-MS 检测方法的建立与应用[J]. 水产研究, 2017, 4(3): 119-123. DOI: 10.12677/ojfr.2017.43019

(MALDI-TOF-MS)检测方法。采用副溶血性弧菌、鲷爱德华氏菌、迟钝爱德华氏菌、嗜水气单胞菌、杀鲑气单胞菌等菌株,进行MALDI-TOF-MS检测,以验证该方法的稳定性和重复性。对不同来源的菌株进行检测,以确认方法的准确性。通过MALDI-TOF-MS技术及传统生化鉴定方法进行比较,结果表明MALDI-TOF-MS在检测时间、重复性、稳定性、准确性等方面的总体表现均优于传统生化鉴定方法,可用于鲷爱德华氏菌、迟钝爱德华氏菌的日常检测。

关键词

MALDI-TOF-MS, 鲷爱德华氏菌, 迟钝爱德华氏菌, 检测, 鉴定

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

爱德华氏菌(*Edwardsiella*)属于肠杆菌科,目前分为迟钝爱德华氏菌、保科爱德华氏菌、鲷爱德华氏菌3个种。其菌体短杆状,具周鞭毛,革兰氏染色阴性,宿主范围很广,流行季节为夏季和秋初高温期。广泛分布于海水和淡水中,感染各种养殖水生动物,对水产养殖业危害极大。对鲤鱼、鲟鱼、鳙鱼和其他多种鱼类致病,可造成严重经济损失。引起鱼类发病的病原菌主要为鲷爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)和迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*) [1]。爱德华氏菌可使鱼类发病,目前已报道的主要导致斑点叉尾鲷肠败血症,可以危害所有规格的斑点叉尾鲷,但主要影响苗种存活率[2],已成为美国养殖斑点叉尾鲷最主要的疾病之一。

传统的细菌鉴定方法依据细菌的形态学和生理生化特性分析,不仅耗时长,而且由于生化特性容易受培养基、保存时间等因素的影响,常常给鉴定带来困难[3]。近年来快速发展的基因检测技术在微生物鉴定方面取得了一定的应用,但由于其敏感性高,容易出现假阳性[4],而且对近似种的细菌鉴定还存在一些不足。因此,对一些与人和动物关系密切的病原菌还需要建立更加快速、准确、实用的检测和鉴定方法。本文应用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术建立了检测和鉴定鲷爱德华氏菌和迟钝爱德华氏菌方法。

1. 材料与方法

1.1. 材料与试剂

试验菌株:本文所用的鲷爱德华氏菌(HYDX-01)由大连海洋大学赠送,迟钝爱德华氏菌(CICC10497, CICC10630)购自中国工业微生物菌种保藏管理中心菌株,其他分离的菌株经生化及分子生物学方法确认。

细菌培养基和生化鉴定卡:营养肉汤、BHI琼脂、DHL琼脂和TSA琼脂等细菌培养基由北京陆桥技术有限公司提供;生化鉴定GN卡由法国生物梅利埃公司提供。

1.2. 仪器与设备

基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱仪(MALDI Biotyper),德国布鲁克公司;全自动微生物鉴定仪VITEK 2 (Compact 30),法国生物梅利埃公司。

1.3. 方法

菌株的复活与检测:用营养肉汤对细菌进行复活($36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$,培养24 h)后,接种于BHI和DHL 37°C

培养 36 h, 进行 MALDI-TOF-MS 检测。

样品处理: 挑取可疑单个菌落于 1.5 mL 的离心管中, 用生理盐水 10,000 常温 r/min 离心 2 min 洗涤二次; 用 75% 的酒精固定细菌的表面蛋白; 用等量的 70% 甲酸和乙腈溶解表面蛋白, 10,000 r/min 常温离心 2 min。

点靶: 吸取上清点靶。先点 1 μ L 上清于样品靶板上, 同时点 1 μ L 标准品溶液(校准靶板), 待液体干后立即点 1 μ L 基质溶剂。

质谱图的采集和分析: 应用 MALDI Biotyper 仪器, 选择 BioTyper par 的采集方法对细菌的图谱进行采集。用标准品对仪器进行校准后, 采集样品质谱图。应用 BioTyper 软件对细菌质谱图进行分析和鉴定。

不同来源爱德华氏菌的 MALDI-TOF-MS 鉴定: 将冷冻保存的从黄颡鱼、鳊鱼、大菱鲂、鲤鱼、六线鱼及甲鱼等水生动物中分离, 并经形态和生化鉴定为鲷爱德华氏菌的 9 株菌株用肉汤培养液复活, 进行 MALDI-TOF-MS 鉴定, 并与菌株保存前的生化鉴定结果进行比较, 判断 MALDI-TOF-MS 检测结果的准确性。

MALDI Biotyper 的判断标准和鉴定结果: 判断标准是待检细菌与数据库中标准菌株质谱图的符合度, 用得分表示, 得分越高, 说明待测菌株的谱图同质谱库中某一标准菌株的谱图(质量和峰高)越相近。分值在 2.300~3.000 之间, 标记为(+++), 可完全确认菌株鉴定结果; 分值在 2.000~2.299 之间, 标记为(++), 可基本确认菌株鉴定结果; 分值在 1.700~1.999 之间, 标记为(+), 该菌株鉴定为不确定结果; 分值在 0.000~1.699 之间, 标记为(-), 可判断不是该种细菌。

2. 结果与讨论

2.1. 菌株鉴定结果

两种爱德华氏菌经 Biotyper 数据库鉴定后, 与数据库中相应的爱德华氏菌的匹配分值分别为: 迟缓爱德华氏菌为 2.495、鲷爱德华氏菌 2.367, 且两种爱德华氏菌的质谱图比较相似, 即其具有相近的蛋白组成, 以此可以与其它非爱德华氏菌进行区分。图 1 为两种爱德华氏菌在分子量 5000~8500 间的质谱图,

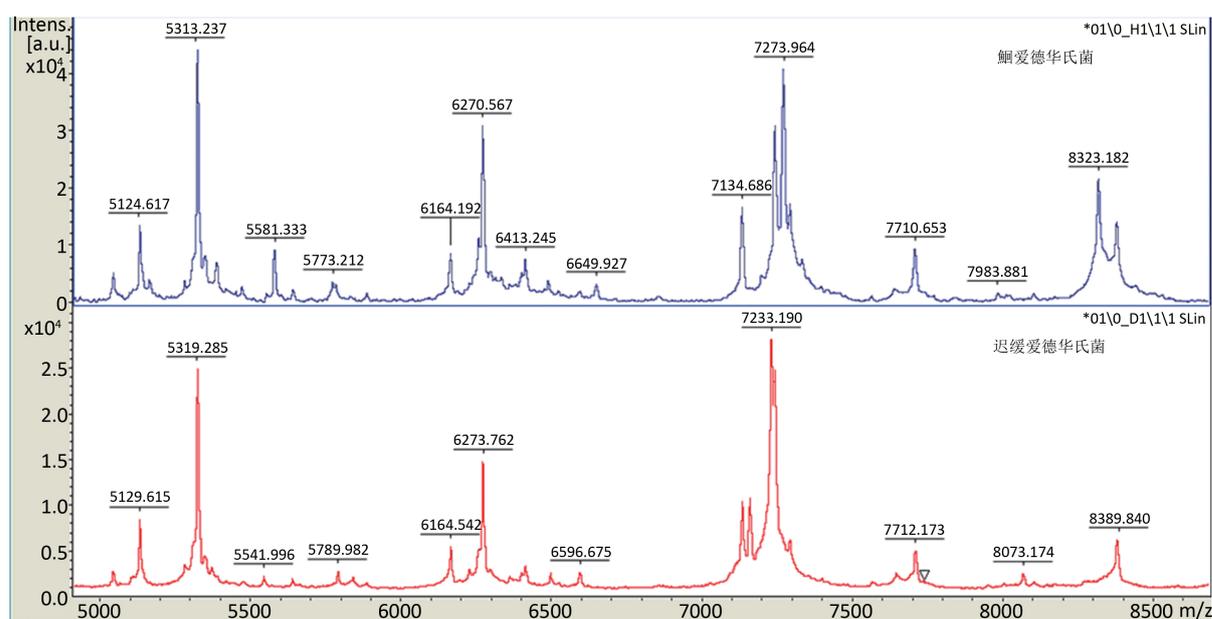


Figure 1. Mass spectra of two species of *Edwardsiella*

图 1. 两种爱德华氏菌的质谱图

从图中可以看出, 两种爱德华氏菌之间的质谱峰存在明显的差异, 可以进行爱德华氏菌的种间鉴别。表 1 为两种爱德华氏菌在分子量 5000~8500 之间的峰值比较, 从表中可以看出鳎爱德华氏菌在 5000~8500 区间有 20 个可读峰值, 而迟钝爱德华氏菌只有 16 个, 缺少 5384、7273、7983、8382 左右的峰值, 而且两种细菌的重复性试验结果变化很小, 表现出很好的重复性, 迟钝爱德华氏菌与数据库中 *Edwardsiella tarda* ATCC 36.1 EGS 的匹配分值均在 2.45~2.495 之间, 与 *Edwardsiella tarda* HL 23.1 EGS 的匹配分值均在 2.35~2.392 之间, 与 *Edwardsiella tarda* ATCC 35.1 EGS 的匹配分值均在 2.302~2.31 之间; 鳎爱德华氏菌与数据库中 *Edwardsiella ictaluri* 885 EGS 的匹配分值均在 2.35~2.367 之间, 与 *Edwardsiella ictaluri* DSM 13697 HAM 的匹配分值均在 2.046~2.1 之间, 说明 MALDI-TOF-MS 技术具有良好的重复性。

2.2. 特异性试验结果

采用鳎爱德华氏菌、迟钝爱德华氏菌、嗜水气单胞菌、杀鲑气单胞菌等菌株培养液, 在同一条件下进行 MALDI-TOF-MS 检测, 以验证该方法的特异性。结果表明, MALDI-TOF-MS 方法可以快速、准确地鉴定出两种爱德华氏菌, 具有很好的特异性, 见图 2。

2.3. 不同方法鉴定结果

GN TestKit 鉴定卡可以对革兰氏阴性菌的 48 项生化指标进行鉴定, 两株细菌的大部分生化结果一致, 只在 D-甘露醇、蔗糖、L-阿拉伯糖、柠檬酸反应上有差异, 上述 2 株爱德华氏菌经全自动微生物鉴定仪鉴定后, 均能区分开来, 符合率在 95%~99% 之间。冷冻保存两年后的菌株的生化与保存前的生化会有差异, 符合率也低于 90%, 如鸟氨酸脱羧酶和赖氨酸脱羧酶保存前为阳性, 保存后变为阴性, 脂酶由阴性变为可疑等, 说明用传统的生化反应来鉴定细菌存在一定的缺陷。

2.4. 临床样本鉴定结果

对复活的 9 株爱德华氏菌的菌株进行 MALDI-TOF-MS 鉴定, 其质谱图变化很小, 与数据库中迟钝爱德华氏菌的匹配分值均在 2.35 以上, 可信度很高。说明 MALDI-TOF-MS 技术具有很好的准确性。而 VITEK 对 9 株爱德华氏菌的鉴定值有 3 株只有 85%, 在结果判断上可信度有所降低。

3. 讨论

目前, 针对爱德华氏菌的鉴定方法报道的有分子生物学方法、酶联免疫法及传统的分离培养法, 尚无应用 MALDI-TOF-MS 法鉴定爱德华氏菌的报道[5]。本文通过对水生动物中常见的两种爱德华氏菌分别应用 MALDI-TOF-MS 技术及传统生化鉴定方法进行检测, 结果表明 MALDI-TOF-MS 在检测时间、重复性、稳定性、准确性等方面的总体表现均优于传统生化鉴定方法。

MALDI-TOF-MS 技术以细菌表面蛋白为检测对象, 通过量化分析每种细菌的表面蛋白组成, 与标准参考菌株的 MALDI-TOF-MS 图谱进行比较, 从而得出鉴定结果[6]。由于每种生物的蛋白组成经过长期

Table 1. Peak comparison table of two species of *Edwardsiella*

表 1. 两种爱德华氏菌的峰值比较表

	迟钝爱德华氏菌	鳎爱德华氏菌
24	2.461	2.367
36	2.560	2.432
48	2.465	2.441
72	2.432	2.381

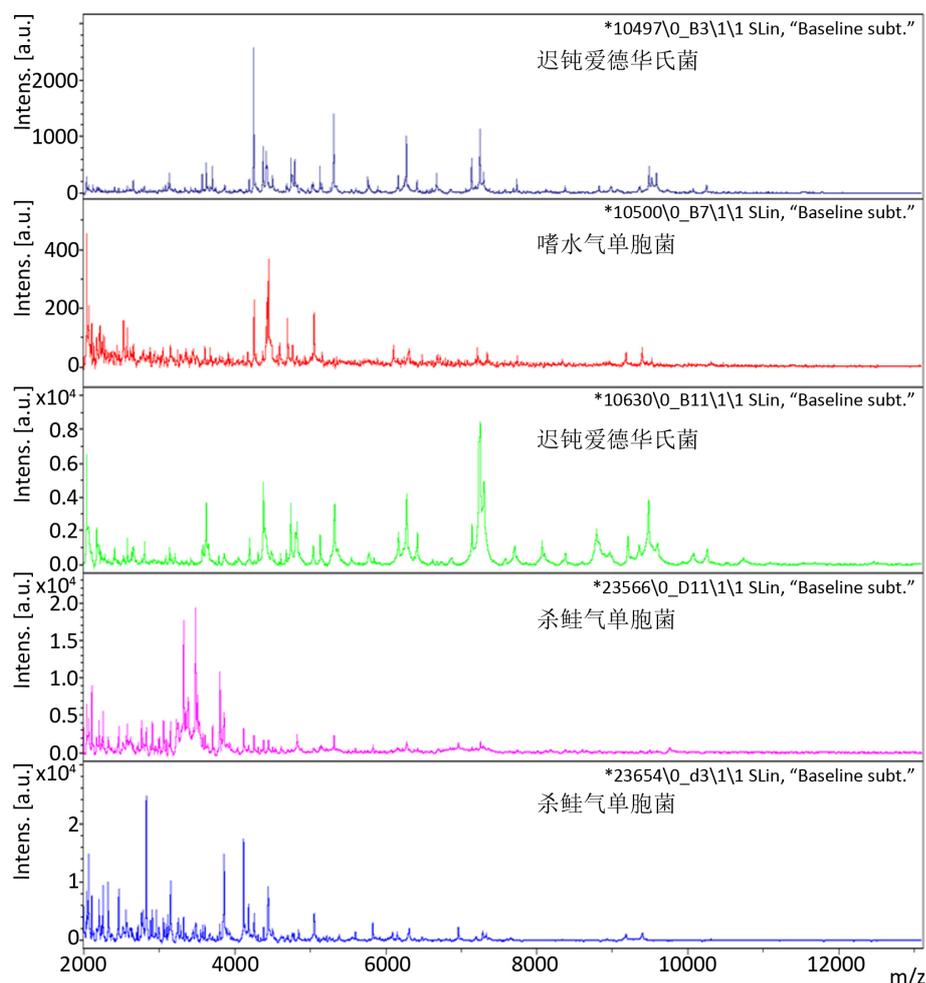


Figure 2. *Edwardsiella* specific mass spectra
图 2. 爱德华氏菌特异谱图

的进化，具有很好的稳定性。细菌的蛋白组成也主要取决于遗传因素，受培养基、培养时间以及其它培养条件等外部因素的影响很小。因此，与其他技术相比，MALDI-TOF-MS 具有很好的稳定性和重复性。

基金项目

国家质检公益项目(201410059)。

参考文献 (References)

- [1] 董丽, 王印庚, 张正, 等. 养殖大菱鲆细菌性红体病病原菌的分离与鉴定[J]. 海洋科学, 2009, 3(37): 57-63.
- [2] 王印庚, 秦蕾, 张正, 等. 养殖大菱鲆的爱德华氏菌病[J]. 水产学报, 2007, 3(14): 487-495.
- [3] 秦蕾, 王印庚, 张晓君. 迟钝爱德华氏菌感染大菱鲆的病理学研究[J]. 中国水产科学, 2009, 16(3): 411-419.
- [4] 邓显文, 谢芝勋, 刘加波, 等. 罗非鱼迟钝爱德华氏菌的分离与鉴定[J]. 水生态学杂志, 2009, 2(1): 114-117.
- [5] 龚艳清, 郭书林, 陈信忠, 等. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱在动物病原菌检测中的应用[J]. 中国动物检疫, 2012, 2(29): 22-25.
- [6] 王晔茹, 崔生辉, 李凤琴. 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱在沙门菌检测和鉴定分型中的应用研究[J]. 卫生研究, 2008, 6(37): 685-689.

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：ojfr@hanspub.org