# $Fe_3O_4$–COOH 纳米材料对大肠杆菌菌株水平的指纹峰确定

黄艳玲[1]，程 杨[2]，李春媛[3]

（1. 天津现代职业技术学院 生物工程学院，天津 300350；2. 天津市食品研究所有限公司，天津 301609；3. 国家农产品保鲜工程技术研究中心（天津）农业部农产品贮藏保鲜重点实验室，天津 300384）

**摘要**：通过合成 $Fe_3O_4$–COOH 纳米颗粒提高 MALDI–TOF MS 对大肠杆菌菌株水平的鉴别，并利用 $Fe_3O_4$–COOH 纳米对大肠杆菌 K–12 和大肠杆菌 DSM 30083T 裂解液中的菌体蛋白进行富集，不仅增加 MALDI–TOF MS 检测的分辨率和灵敏性，而且可以大大增加大肠杆菌菌株水平的指纹峰，根据实验结果，大肠杆菌 K–12 有 4 个匹配的指纹峰，而大肠杆菌 DSM 30083T 获得 8 个指纹峰，从而提高 MALDI–TOF MS 对大肠杆菌菌株水平的鉴别。

**关键词**：富集；细菌；MALDI–TOF MS；鉴别

**中图分类号**：Q 81　**文章编号**：1673–1689（2020）12–0080–05　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673–1689.2020.12.012

# Identification of Fingerprint Peaks at the Level of *E. coli* Strains via $Fe_3O_4$–COOH Nanomaterials

*HUANG Yanling*[1]，*CHENG Yang*[2]，*LI Chunyuan*[3]

（1. School of Biotechnology, Tianjin Modern Vocational Technology College, Tianjin 300350,China；2. Tianjin Food Research Institute Co., Ltd., Tianjin 301609, China；3. National Engineering Technology Research Center for Preservation of Agricultural Products (Tianjin), Key Laboratory of Storage of Agricultural Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300384, China）

**Abstract**: Identification of *E. coli* strain by MALDI-TOF MS was improved by synthesis of $Fe_3O_4$-COOH nanomaterials. The fingerprint peaks of *E. coli* strain, as well as the resolution and sensitivity of MALDI-TOF MS detection were increased by the enrichment of bacterial proteins in *E. coli* K-12 and DSM 30083T lysate. Results showed that *E. coli* K-12 had four matching peaks, while *E. coli* DSM 30083T had eight peaks, which thus improved the identification of *E. coli* strains by MALDI-TOF MS.

**Keywords:** enrichment, bacterium, MALDI-TOF MS, identification

利用 MALDI–TOF MS 对微生物进行鉴别已成为当前的研究热点，其中数据库鉴别法是 MALDI–TOF MS 微生物鉴别的最常用的方法。数据库鉴别法就是利用微生物建立标准质谱谱图数据库，将未

**收稿日期**：2019–03–29

**基金项目**：天津市科技计划项目（17YFFC00220）。

**作者简介**：黄艳玲（1983—），女，硕士，讲师，主要从事食品、生物方面分析与检测的研究。E–mail：18622603189@163.com

知菌的质谱谱图与之比对，通过指纹峰的比对，且超过一定阈值，从而确定微生物的归属[1-7]。

在数据库鉴别法中，微生物的指纹峰或蛋白标志物的确定非常重要，通常由于质谱条件限制，一般 MALDI-TOF MS 对微生物鉴别只能达到属和种的水平[8-9]。利用数据库鉴别法对于菌株水平的微生物鉴别目前还不成熟，主要是其表型与基因型非常相似，导致质谱谱图几乎一致，很难找到足够多的指纹峰对微生物进行鉴别。因此，发现更多的微生物指纹峰是目前利用 MALDI-TOF MS 对微生物鉴别工作的一大挑战[10-13]。

为了解决这一问题，作者利用 $Fe_3O_4$–COOH 纳米材料对微生物裂解液中的蛋白质进行富集，以提高 MALDI-TOF MS 对蛋白质检测的灵敏性与分辨率，通过增加质谱中蛋白质检出的数量，以提高微生物指纹峰的数量，从而增加微生物鉴别效果[14]。作者通过 $Fe_3O_4$–COOH 纳米材料对大肠杆菌 K-12 和大肠杆菌 O127:H6 裂解液中蛋白质的富集，达到对其进行鉴别的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

本文中所涉及的实验仪器主要用于对大肠杆菌的破壁与蛋白质质谱检测（见表 1），其中恒温水浴摇床对大肠杆菌进行培养，超声波细胞破碎仪用于对大肠杆菌进行细胞裂解得到细菌裂解液，而 MALDI-TOF MS 则用于完成对细菌裂解液中蛋白质的检测。

表 1 主要实验仪器设备

Table 1 Experiment apparatus and equipments

| 仪器名称 | 生产厂家 |
|---|---|
| 超声波清洗器 | 宁波新芝生物科技股份有限公司，中国 |
| 恒温水浴摇床 | 上海世平实验设备有限公司，中国 |
| 超声波细胞破碎仪 | 宁波新芝生物科技股份有限公司，中国 |
| MALDI-TOF MS | 布鲁克(北京)科技有限公司，德国 |

### 1.2 材料

本实验中用于 MALDI-TOF MS 分析的材料均为色谱纯（见表 2）。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 大肠杆菌的培养** 利用 TSB 细菌培养基对大肠杆菌进行培养，培养条件：温度 37 ℃，摇床转速 120 r/min，培养 16 h 后，取 1 mL 发酵液 10 000 r/min 离心 6 min，用超纯水清洗 3 次后，依次 10 倍稀释，并进行平板计数。

表 2 试验药品

Table 2 Experimental reagents

| 药品名称 | 品级 | 生产厂家 |
|---|---|---|
| TSB 培养基和琼脂粉 | | 北京奥博星生物制品有限公司 |
| α-腈基-4-羟基苯丙烯酸（CHCA） | 色谱纯 | 布鲁克(北京)科技有限公司 |
| 三氟乙酸(TFA) | 色谱纯 | 布鲁克(北京)科技有限公司 |
| 乙腈(ACN) | 色谱纯 | 广州艾欣科学仪器有限公司 |

**1.3.2 大肠杆菌超声裂解** 用离心管取 5 mL 大肠杆菌稀释液，其中含有体积分数 0.1% 的 TFA，在冰浴下，超声裂解 3 min，细胞超声裂解仪开 3 s 关 3 s。

**1.3.3 菌体蛋白富集与 MALDI-TOF MS 检测** 把合成完毕的 $Fe_3O_4$–COOH 纳米材料溶解于 20 mmol/L 的醋酸钠溶液中，最后定容 $Fe_3O_4$–COOH 悬浊液至质量浓度为 10 mg/mL。取 100 μL $Fe_3O_4$–COOH 悬浊液加入到 *E. coli* 裂解液中，振荡 30 min 充分吸附后，磁性分离，再用 10 μL 磷酸缓冲液与 10 μL 乙腈洗脱 10 min，吸取 1 μL 洗脱液与 1 μL CHCA 用于 MALDI-TOF MS 分析。

MALDI-TOF MS 线性阳离子模式参数：离子源 1:20 kV；离子源 2:17.8 kV；lens:6.00 kV；pulsed ion extraction:200 ns；matrix suppression:1 500；质谱范围 *m/z* 2 000~20 000 amu。

**1.3.4 细菌蛋白质数据库检索** 大肠杆菌的 MALDI-TOF MS 质谱峰利用 Tagident 蛋白质分析软件，检索蛋白质数据库，以确定各个质谱峰的蛋白质归属。

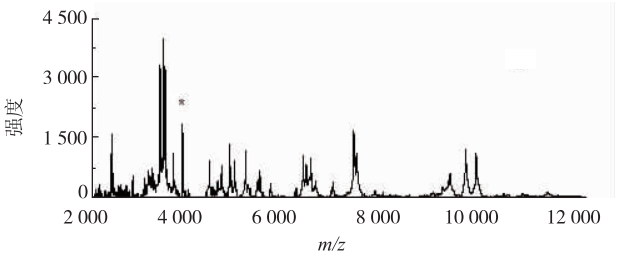
## 2 结果与讨论

### 2.1 富集前 *E. coil* 菌株水平的鉴别

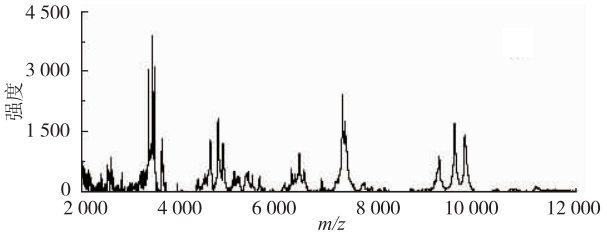
培养完毕的大肠杆菌，经过 1:10 梯度稀释得到细菌浓度为 $3\times10^5$ CFU/mL 细胞悬浊液，再利用细胞破碎仪对菌悬液进行破壁，得到大肠杆菌的细胞裂解液，然后分成 2 份，一份为对照，另一份进行富集，加入 100 μL $Fe_3O_4$–COOH 悬浊液到大肠杆菌裂解液中，震荡 30 min 充分吸附后，磁性分离，然后用 10 μL 磷酸缓冲液与 10 μL 乙腈洗脱，吸取 1 μL 洗脱液与 1 μL CHCA 用于 MALDI-TOF MS 分析。

图 1 为 $Fe_3O_4$–COOH 纳米颗粒富集前 2 个大肠杆菌菌株（K-12 和 DSM 30083T）MALDI-TOF MS

质谱图，可以看出，在 *m/z* 2 000~12 000 的质谱范围，其质谱图在峰形上基本一致，这主要是因为 2 个同属同种大肠杆菌在表型上基本一致，而且大多数峰位置也基本相同，但相对峰的强弱不同，唯一不同的质谱峰为大肠杆菌 K–12 的 *m/z* 3 831（在图 1(a)用星号标注的质谱峰），因此，未富集的细胞裂解液直接用 MALDI–TOF MS 分析，很难获得更多的指纹峰用于细菌菌株水平的鉴别。



(a)大肠杆菌K-12



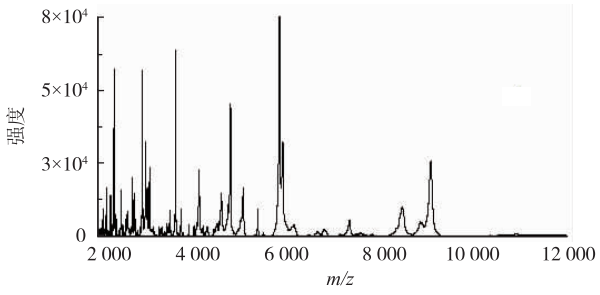
(b) 大肠杆菌DSM 30083T

**图 1　富集前大肠杆菌不同菌株的鉴别**

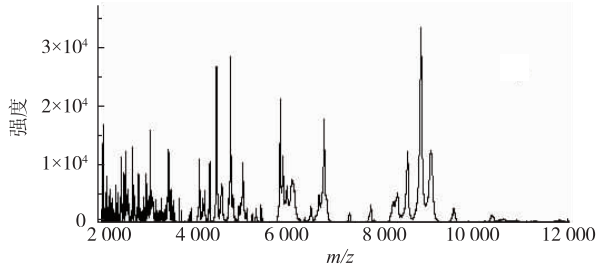
**Fig. 1　Identification of different strains of *Escherichia coli* before enrichment**

## 2.2　富集后 *E. coil* 菌株水平的鉴别

图 2 为 $Fe_3O_4$–COOH 纳米颗粒富集大肠杆菌 K–12 和大肠杆菌 DSM 30083T 裂解液的 MALDI–TOF MS 质谱图。可以看出，经过富集，质谱图的峰形有很大的改变，这主要是因为很多低丰度的蛋白质经过富集后，可以被 MALDI–TOF MS 检测，而且质谱图的信噪比也大大提高。富集前，质谱图信噪比大于 3 的质谱峰共 28 个，其可能的指纹峰仅仅只有 1 个（见图 1）；富集后，MALDI–TOF MS 检测的分辨率和灵敏性大大增加，质谱峰的数量达到 110 个左右，其中大肠杆菌 K–12 有 16 个可能的指纹峰，而大肠杆菌 DSM 30083T 有 21 个可能的指纹峰，文献上用 MALDI–TOF MS 常规方法对大肠杆菌不同菌株进行检测，其可能的指纹峰最多能达到 14 个。因此，通过使用 $Fe_3O_4$–COOH 纳米颗粒可以使 MALDI–TOF MS 检测获得更多可能的指纹峰。



(a)大肠杆菌K-12



(b)大肠杆菌DSM 30083T

**图 2　富集后大肠杆菌不同菌株的鉴别**

**Fig. 2　Identification of different strains of *Escherichia coli* after enrichment**

为了验证 MALDI–TOF MS 检测到的可能的指纹峰为大肠杆菌的蛋白质质谱信号，检索 UniProtKB/Swiss–Prot 和 UniProtKB/TrEMBL 的蛋白质数据库，获得匹配的质谱信号的蛋白质归属，其检索结果列在表 3，其中大肠杆菌 K–12 有 4 个匹配的指纹峰，这些指纹峰没有出现在大肠杆菌 DSM 30083T 的谱图上，而大肠杆菌 DSM 30083T 获得 9 个指纹峰，这些指纹峰没有出现在大肠杆菌 K–12 的质谱图上，这些质谱峰通过局部放大，标注在图 3 上，因此，通过以上实验表明，通过 $Fe_3O_4$–COOH 纳米颗粒对大肠杆菌细胞裂解液的富集，不仅可以增加 MALDI–TOF MS 检测的分辨率和灵敏性，而且可以大大增加大肠杆菌菌株水平的指纹峰数量。

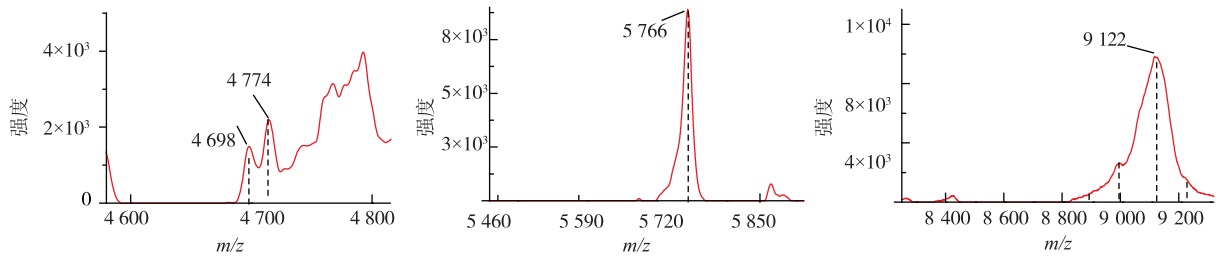
## 3　结　语

作者利用 $Fe_3O_4$–COOH 纳米颗粒对大肠杆菌 K–12 和大肠杆菌 DSM 30083T 裂解液中的菌体蛋白进行富集，不仅可以增加 MALDI–TOF MS 检测的分辨率和灵敏性，而且可以大大增加大肠杆菌菌株水平的指纹峰数量，从而提高 MALDI–TOF MS 对大肠杆菌菌株水平的鉴别。因此 $Fe_3O_4$–COOH 纳米颗粒富集菌体蛋白的方法有可能推广应用于致病菌菌株水平鉴别。

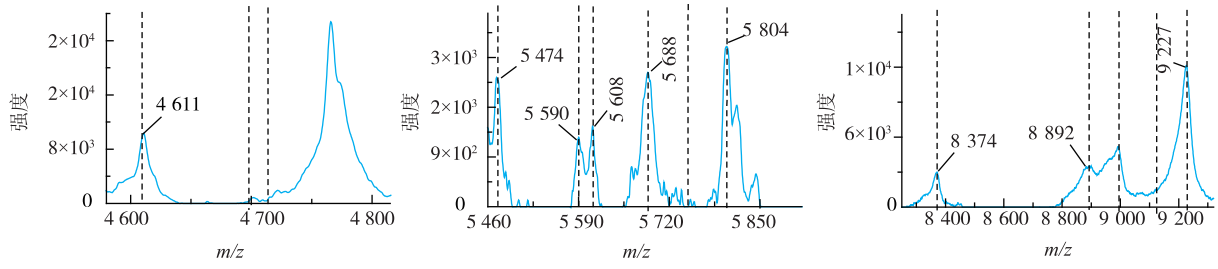
表 3　大肠杆菌 K–12 和 DSM 30083T 蛋白标志物数据库搜索结果

Table 3　Database search results of *Escherichia coli* K–12 and DSM 30083T protein markers

| 菌种 | 实验相对分子质量(*m/z*) | 理论相对分子质量(*m/z*) | 蛋白质名称 |
|---|---|---|---|
| *E. coli* K–12 | 9 122 | 9 125 | 50S ribosomal protein L27 |
| | 5 766 | 5 768 | Uncharacterized protein |
| | 4 774 | 4 771 | Uncharacterized protein |
| | 4 698 | 4 697 | SignalP |
| *E. coli* DSM 30083T | 9 227 | 9 226 | DNA–binding protein HU–beta. |
| | 8 892 | 8 891 | Uncharacterized protein YdhI. |
| | 8 374 | 8 371 | Ferrous iron transport protein A |
| | 5 804 | 5 806 | Uncharacterized protein |
| | 5 688 | 5 688 | Transcriptional regulator |
| | 5 608 | 5 605 | Uncharacterized protein |
| | 5 590 | 5 590 | Mobile element protein |
| | 5 474 | 5 475 | Uncharacterized protein |
| | 4 611 | 4 612 | Uncharacterized protein |




(a)大肠杆菌K-12




(b)大肠杆菌DSM 30083T

图 3　利用$Fe_3O_4$–COOH 纳米颗粒富集的大肠杆菌 K–12 和 DSM 30083T 蛋白生物标志物 MALDI 局部质谱图

**Fig. 3　Partial mass spectra of *Escherichia coli* K–12 and DSM 30083T protein biomarkers enriched by $Fe_3O_4$–COOH particles**

## 参考文献：

[1] HOTTA Y，SATO J，SATO H，et al. Classification of the genus *Bacillus* based on MALDI-TOF MS analysis of ribosomal proteins coded in S10 and spc operons[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**，2011，59(10)：5222-5230.

[2] REZZONICO F，VOGEL G，DUFFY B，et al. Application of whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification and clustering analysis of *Pantoea* species[J]. **Applied and Environmental Microbiology**，2010，76(13)：4497-4509.

[3] DURIGHELLO E，BELLANGER L，EZAN E，et al. Proteogenomic biomarkers for identification of *Francisella* species and subspecies by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry[J]. **Analytical Chemistry**，2014，86

(19): 9394-9398.

[4] CLARK C G, KRUCZKIEWICZ P, GUAN C, et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2013, 94(3): 180-191.

[5] 葛文亮, 王文彬, 胥传来. 基于磁性纳米粒子的粮油制品真伪鉴别技术研究[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(11): 1224-1231.

[6] SHAH H N, RAJAKARUAN L, BALL G, et al. Tracing the transition of methicillin resistance in sub-populations of *Staphylococcus aureus*, using SELDI-TOF mass spectrometry and artificial neural network analysis[J]. **Systematic and Applied Microbiology**, 2011, 34(1): 81-86.

[7] DEMIREV P A, FELDMAN A B, LIN J S. Bioinformatics-based strategies for rapid microorganism identification by mass spectrometry[J]. **Johns Hopkins Apl Technical Digest**, 2004, 25(1): 27-37.

[8] SOMBORO A M, TIWARI D, SHOBO A, et al. Evaluation of MALDI biotyping for rapid subspecies identification of carbapenemase-producing bacteria via protein profiling[J]. **Mass Spectrometry Letters**, 2014, 5(4): 110-114.

[9] SANDRIN T R, GOLDSTEIN J E, SCHUMAKER S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review[J]. **Mass Spectrometry Reviews**, 2013, 32(3): 188-217.

[10] DIECKMAN R, HELMUTH R, ERHARD M, et al. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2008, 74(24): 7767-7778.

[11] LIU J, SUN Z, DENG Y, et al. Highly water-dispersible biocompatible magnetite particles with low cytotoxicity stabilized by citrate groups[J]. **Angewandte Chemie International Edition**, 2009, 48(32): 5989-5993.

[12] MERKX-JACQUES A, COORS A, BROUSSEAU R, et al. Evaluating the pathogenic potential of environmental *Escherichia coli* by using the *Caenorhabditis elegans* infection model[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2013, 79(7): 2435-2445.

[13] MUKHOPADHYAY S, MILLER R D, SULLIVAN E D, et al. Protein expression profiles of *Chlamydia pneumoniae* in models of persistence versus those of heat shock stress response[J]. **Infection and Immunity**, 2006, 74(7): 3853-3863.

[14] WUNSCHEL D, WAHL J, WILLSE A, et al. Small protein biomarkers of culture in *Bacillus* spores detected using capillary liquid chromatography coupled with matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. **Journal of Chromatography B**, 2006, 843(1): 25-33.

## 科　技　信　息

### 欧盟批准 β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯作为饲料添加剂

2020 年 10 月 6 日，欧盟发布条例 (EU) 2020/1400，批准 β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯（Ethyl ester of β-apo-8′-carotenoic acid）作为饲料添加剂用于鸡育肥、蛋鸡和所有小型家禽品种，本条例自发布之日起第 20 天生效。

该添加剂所属类别为“感官添加剂”，功能组别为“着色剂”；识别号为 2a160f；用于鸡育肥和小型家禽育肥时在含水率 12%全价饲料中的最高含量为 15 mg/kg，用于蛋鸡和小型家禽产蛋时最高含量为 5 mg/kg；批准期限至 2030 年 10 月 26 日。

［信息来源］食品伙伴网.欧盟批准 β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯作为饲料添加剂 [EB/OL]. (2020-11-5). http://news.foodmate.net/2020/11/576209.html