



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别 微生物方法通则

General microorganism identification method with MALDI-TOF

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

草案版次选择

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本标准代替GB/T 33682-2017《基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物方法通则》

本标准与GB/T 33682-2017相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 增加了可疑菌落的选择要求；
- 增加了样品培养方法及菌种复苏培养方法要求；
- 增加了菌种不同前处理方法要求；
- 增加了仪器设置条件要求；
- 增加自建库方法及数据库比对内容；
- 增加了质控的设置、结果判定标准及报告要求。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本文件起草单位：河北省食品检验研究院

本文件主要起草人：

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物方法通则

1 范围

本标准规定了基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物的方法通则。

本标准适用于各类从事微生物相关检验工作实验室对样品中的微生物进行快速鉴定以及研究，可鉴定微生物种属。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 微生物蛋白质指纹图谱 Microbial protein fingerprinting

指分离纯化后的单个菌落，直接涂于靶板上，待干燥后加上基质混合，微生物可溶性蛋白与基质形成共结晶体后通过真空飞行时间管获取不同质电荷比的蛋白分子质谱指纹图谱。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CHCA: α -氰基-4-羟基肉桂酸。

DHB: 2, 5-二羟基苯甲酸。

FA: 甲酸。

MALDI-TOF: 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱。

MALDI-TOF-TOF: 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱串联质谱。

5 原理

常见微生物都由其区别于其他种类的特殊蛋白质组成，因而拥有独特的蛋白质指纹图谱，这是由物

种的遗传特性所决定的，受外界环境条件等影响较小。

样品（来自痰、血、体液、拭子等临床样本及食品、化妆品、药品及环境等）经适当的处理，在固体培养基上培养、分离出单个菌落后，直接点样至靶板并将其放入基质辅助激光电离解析飞行时间质谱内，经离子化按照质量/电荷(m/z)比值大小分离，将采集的数据与微生物指纹图谱库对照鉴定。

6 试剂与标准品

除非有特殊说明，仅使用色谱纯试剂和符合GB/T 6682规定的一级水。

6.1 甲酸(HCOOH)。

6.2 乙腈(CH_3CN)。

6.3 乙醇($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)。

6.4 三氟乙酸(CF_3COOH)。

6.5 磷酸盐缓冲液：见附录 A.1；

6.6 α -氰基-4-羟基肉桂酸($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_3$)，光谱纯。

6.7 2,5-二羟基苯甲酸($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$)，光谱纯。

6.8 血琼脂培养基：见附录 A.2。

6.9 沙氏琼脂培养基：见附录 A.3。

6.10 标准菌株：ATCC8739 大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)。

7 仪器与设备

7.1 MALDI-TOF 质谱仪

7.2 MALDI-TOF-TOF 质谱仪。

7.3 二级生物安全柜。

7.4 恒温培养箱： $36\text{ }^\circ\text{C}\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $25\text{ }^\circ\text{C}\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 。

7.5 离心机：12000 r/min。

7.6 旋涡混合器。

7.7 显微镜。

7.8 微量移液器及枪头。

7.9 一次性或重复使用靶板。

7.10 $1\text{ }\mu\text{L}$ 接种环。

8 试验方法

8.1 微生物的前处理

8.1.1 样品处理

痰、血、体液、拭子等临床样本经采集后直接接种。其他固体样品需粉碎，加入无菌磷酸盐稀释液溶解，液体样品可不经溶解。

8.1.2 样品培养方式

根据不同的微生物特性，划线培养于血琼脂培养基上，36℃培养24±2h，或参照对应标准进行培养。

8.1.3 可疑菌落的选择

根据对应的检验标准，挑选出具有可疑特征的菌落进行培养。至少应挑取5个可疑菌落，若少于5个则全部挑取。

8.1.4 微生物培养

一般细菌划线接种血琼脂培养基，36℃±1℃培养24h±2h；酵母划线接种沙氏琼脂培养基，25℃±1℃培养2d~3d；其它类型微生物，如霉菌、分枝杆菌和诺卡氏菌等，可参照相关标准中规定的培养基和培养方法执行。

8.2 样品上机（点靶）

8.2.1 一般细菌

直接涂抹法：鉴定细菌时，直接使用1μL接种环挑取单个菌落，点在样品靶板孔中，涂抹均匀并在室温自然晾干。

8.2.2 酵母样真菌

原位甲酸提取法：鉴定酵母时，直接涂抹后用相应浓度的FA溶液处理，再用微量移液器吸取1μL基质溶液，与样品混合，自然晾干，形成结晶。或先用微量移液器移取相应浓度的FA溶液处理后（破坏细胞壁，使蛋白溶出），再添加基质液。不同型号仪器系统使用的甲酸浓度需遵照说明书信息。

8.2.3 丝状真菌

乙醇灭活+甲酸、乙腈提取法：将无菌棉拭子在去离子水中沾湿后，从培养基上刮取1cm²~2cm²丝状真菌菌落，转移至装有300μL超纯水的2mL离心管中。向离心管中加入900μL乙醇，用漩涡混合器混匀3s~5s。混合后用离心机在10000r/min下离心2min后去除上清液，置于室温干燥。加入40μL70%甲酸漩涡混合3s~5s，之后再加入40μL乙腈漩涡混合3s~5s，用离心机在10000r/min离心2min后，用微量移液器吸取1μL样品加在样品靶板孔中，待室温干燥后再加入1μL基质溶液，在室温下自然晾干。

8.2.4 分枝杆菌/诺卡菌

硅珠破壁+甲酸、乙腈提取法：将无菌棉拭子在去离子水中沾湿后，从培养基上刮取1cm²~2cm²丝状真菌分枝杆菌/诺卡菌菌落，转移至装有300μL超纯水的2mL离心管中。向离心管中加入900μL乙醇并辅以0.5mm直径的硅珠震荡破壁。用离心机在10000r/min下离心2min后去除上清液，置于

室温干燥。加入 40 μL 70% 甲酸漩涡混合 3s ~ 5s, 之后再加入 40 μL 乙腈漩涡混合 3s ~ 5s, 用离心机在 10000 r/min 离心 2 min 后, 用微量移液器吸取 1 μL 样品加在样品靶板孔中, 待室温干燥后再加入 1 μL 基质溶液, 在室温下自然晾干。

8.2.5 分枝杆菌（液体培养）

液体培养直接提取法：液体培养报阳后, 继续培养 24~72h, 经离心后去上清, 对沉淀物使用硅珠破壁+甲酸乙腈提取法进行提取。

8.3 生物防护

所有标本、微生物培养物以及接种后的实验材料均应在符合 GB 19489 规定的相应生物安全等级的实验室条件下进行操作, 并适当处置。

8.4 仪器条件

8.4.1 仪器

MALDI-TOF MS: 线性操作模式, 正离子模式; 检测范围: 2000Da-20000Da, 激光点击数: 每图谱 40 次 (6 次激光累积); 激光频率: 60.0Hz; 离子源加速电压: 20kV。

MALDI-TOF-TOF MS: 固态 UV 激光光源, 检测范围为 0~3000Da, 激光点击数: 每图谱 100 次 (100 次激光累积), 最大激光重复频率 2000Hz。

8.4.2 激光能量

每激光束能量 100 μJ , 激光能量可从 0 % ~ 100 % 范围调节。

8.4.3 微生物蛋白指纹图谱数据库

VMS Plus Database*、同等类型数据库或自建库。

自建库原则: 每株菌需由不少于 10 株菌种进行构建; 优先挑选标准菌株, 如 ATCC、CICC、CMCC 菌株; 优先挑选遗传背景清晰 (如已有基因组测序数据) 的菌株; 优先挑选血清型明确的菌株; 优先挑选实验室确定的、来源明确的菌株。

自建库方法: ①挑取新鲜二代培养物, 经过适当处理后作为样品; ②在靶板上加 BTS 或标准物质对质谱仪进行峰的校准; ③建立程序, 点靶板, 采集峰图; ④分析峰图, 严格按照公式 $(M_{\text{右}} - M_{\text{左}}) / M_{\text{标}} \leq 500\text{ppm}$ 分析每一个峰, 其中 $M_{\text{左}}$ 和 $M_{\text{右}}$ 为蛋白谱图中每一个有峰处最左侧峰和最右侧峰的峰值, $M_{\text{标}}$ 为峰处的中间峰值, 且对于不满足公式的峰图进行删除, 并且删除的峰图 ≤ 4 , 否则从 4 重新开始; ⑤对于满足 $(M_{\text{右}} - M_{\text{左}}) / M_{\text{标}} \leq 500\text{ppm}$ 且有效峰图 ≥ 20 张的菌株, 建立 MSP, 进行编辑汇总, 整合到一个项目文件下。

数据库比对: 利用系统数据库或自建数据库进行样品比对。

***注:** 给出这一信息是为了方便本标准的使用者, 并不表示对该产品的认可。如果其它等效产品具有相同的效果, 则可使用这些等效的产品。

8.5 仪器校准

将标准菌株 ATCC8739 大肠埃希氏菌转种至血琼脂培养基上 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。每次检测样品前推荐使用 ATCC8739 大肠埃希氏菌的 11 个特征峰校准飞行时间质谱, 见附录 B.1。

每次开机检测前，参考厂商的操作说明对定标品进行分析，通常选用的定标品包括ATCC标准菌株或细菌检测标准品（BTS）。

8.6 质量控制

应采用国家标准样品进行质控，如无对应的国家标准样品可采用相应种属的标准菌株进行质控。质量控制结果应符合国家标准样品或标准菌株特性，每批可疑样品中选用相应的质控菌株一起上机测试。

8.7 鉴定

将样品靶板放入仪器内，设定合适的激光能量，质谱扫描范围等参数，开始质谱数据采集。数据采集完成后，将经过处理的质谱数据自动/手动导入本地微生物蛋白质指纹图谱数据库即微生物鉴定系统，并在鉴定系统中鉴定结果。

8.8 结果判读

图谱数据经微生物蛋白质指纹图谱数据库运算后直接显示菌株的鉴定结果，并以颜色显示每个涂菌点位的鉴定结果的置信水平。

不同的MALDI-TOF MS系统结果判读的方式并不相同，可参考厂家的操作说明进行结果的判读。结果的判读可结合样本来源、染色结果、形态学等特征对其准确性进行评判。

9 结果报告

根据质量控制结果，参照微生物质谱鉴定系统的鉴定置信水平报告微生物鉴定结果。

被MALDI-TOF MS系统判定为可疑项，应进一步按照相应标准进行确认和报告。

附录 A

A.1 磷酸盐缓冲液

A.1.1 成分

| | |
|------------------------------------|--------|
| 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) | 34.0g |
| 蒸馏水 | 500 mL |

A.1.2 制法

贮存液:称取34.0g的磷酸二氢钾溶于500mL蒸馏水中,用大约175mL的1mol/L氢氧化钠溶液调节pH至7.2,用蒸馏水稀释至1000 mL后贮存于冰箱。

稀释液:取贮存液1.25mL,用蒸馏水稀释至1000 mL,分装于适宜容器中,121℃高压灭菌15min。

A.2 血琼脂平板

A.2.1 成分

| | |
|---------------------------------|------------|
| 豆粉琼脂 ($\text{pH}7.5 \pm 0.2$) | 100 mL |
| 脱纤维羊血(或兔血) | 5 mL~10 mL |

A.2.2 制法

加热溶化琼脂,冷却至50℃,以无菌操作加入脱纤维羊血,摇匀,倾注平板。

A.3 血琼脂平板

A.2.1 成分

| | |
|---------------------|-------|
| 酪蛋白胰酶消化物、动物组织的胃酶消化物 | 10.0g |
| 葡萄糖 | 40.0g |
| 琼脂 | 15.0g |

A.2.2 制法

加热搅拌溶解于1000mL纯化水中,调节pH值 5.6 ± 0.2 ,121℃高压灭菌 15分钟,冷却至50℃,倾注平板。

B1 大肠埃希氏菌(ATCC8739)特征谱峰

