

· 环境预警 ·

# 利用 MALDI - TOF MS 技术简便、快速检测水华蓝藻的方法研究

孙丽伟<sup>1</sup>, 江文静<sup>1</sup>, 厉以强<sup>2</sup>, 孙洪芹<sup>1</sup>, 郭艳敏<sup>1</sup>, 杜阳<sup>1</sup>, 吕锡武<sup>1</sup>

(1. 东南大学能源与环境学院, 江苏 南京 210018; 2. 江苏省环境监测中心, 江苏 南京 210036)

**摘要:**以水华蓝藻为研究对象,用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI - TOF MS)技术对其进行测定分析并获得了蛋白质指纹图谱。对铜绿微囊藻标准株(NIES - 843)样品通过3种前处理方法得到的质谱图进行对比,确定了质谱分析的样品前处理方法,建立了利用MALDI - TOF MS技术简便、快速检测水华蓝藻的方法。对在华中出现的4种不同蓝藻进行MALDI - TOF MS分析,结果表明各种蓝藻具有其特征性波谱,可据此对水华蓝藻进行区分和鉴定。该方法快速、简便、精确、可程序化,具有广泛的应用前景。

**关键词:** MALDI - TOF MS; 水华蓝藻; 质量指纹图谱; 快速检测

中图分类号: X835

文献标志码: B

文章编号: 1674 - 6732(2016)04 - 0009 - 04

## Method Investigation on Simple and Rapid Identification of Cyanobacteria Bloom by MALDI - TOF MS

SUN Li-wei<sup>1</sup>, JIANG Wen-jing<sup>1</sup>, LI Yi-qiang<sup>2</sup>, SUN Hong-qin<sup>1</sup>, GUO Yan-min<sup>1</sup>, DU Yang<sup>1</sup>, LV Xi-wu<sup>1</sup>

(1. School of Energy and Environment, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210018, China; 2. Jiangsu Environmental Monitoring Center, Nanjing, Jiangsu 210036, China)

**Abstract:** Based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI - TOF MS), protein fingerprint spectrometry of cyanobacteria bloom were obtained. By comparison of three different pretreatment processes for *Microcystis aeruginosa* (NIES - 843) samples, sample pretreatment for mass analysis was established, meanwhile a simple and rapid analysis method used MALDI - TOF MS for cyanobacteria bloom was developed and optimized. The results showed that there were characteristic spectra for each strain of cyanobacteria and this method could be used to distinguish and identify different species of cyanobacteria. This analytical method was demonstrated to be simple, rapid, accurate and programmable, therefore, had the potential to be widely applicable in the field.

**Key words:** MALDI - TOF MS; Cyanobacteria bloom; Mass spectrum fingerprint; Rapid determination

我国水体富营养化日益严重,据环境保护部2015年环境状况公告,全国大部分淡水湖泊、水库均处于轻度或中度富营养化状态。2007年太湖大面积暴发蓝藻导致无锡市饮用水受污染的事件,造成了严重影响<sup>[1]</sup>。针对这一现状,必须对发生水华的水体进行即时监测,作出预警并制定有效的治理手段。根据世界卫生组织的富营养化水体水华监测指南<sup>[2]</sup>,对蓝藻的监测是整个监测程序的基本和中心要点。目前对蓝藻水华的监测方法主要包括遥感自动解译技术<sup>[3]</sup>、荧光定量PCR技术<sup>[4]</sup>、浮游植物半定量活检法<sup>[5]</sup>、16S rDNA寡核苷酸探针<sup>[6]</sup>等,但这些方法需要具备专业知识的人员才

可实行,耗时数日,且精确性不够。

针对上述方法的不足,将质谱分析方法引入蓝藻鉴定领域,即利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI - TOF MS)对蓝藻细胞进行直接测定。根据测定得到的特征波谱,以构成细胞成分的多酯类或蛋白质作为生物标志物(Biomarker),对微生物进行鉴定<sup>[7-8]</sup>。该法测定微生物主要利用核糖体蛋白为生物标志物<sup>[9]</sup>,反映了分子进化过

收稿日期:2015 - 11 - 17;修订日期:2016 - 01 - 19

基金项目:江苏省环境监测科研基金资助项目(1411)

作者简介:孙丽伟(1964—),女,副教授,博士,从事环境科学与工程研究工作。

程和亲缘关系,是物种分类的有力指标。迄今为止, MALDI-TOF MS 方法已在迅速、准确识别细菌方面得到应用,如鉴定乳酸菌、食源性酵母菌<sup>[10-11]</sup>和抗药性黄色葡萄球菌<sup>[12]</sup>等。探索测定蓝藻细胞的最佳前处理和测定条件,开发简便、快速、精确地鉴定水华蓝藻的新方法,并实现种、属水平上对蓝藻的鉴定,有助于为今后在更高水平的鉴定和在实际样品中的应用提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 藻株信息

本研究所用的测试藻株为构成水华的优势蓝藻种类,分别为微小平裂藻 (*Merismopedia tenuissima* Lemmermann, NIES-230), 爬行颤藻 (*Oscillatoria animalis* Agardh ex Gomont, NIES-206), 近亲鱼腥藻 (*Anabaena affinis* Lemmermann, NIES-1639), 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*, NIES-843)。藻种来自日本国立环境研究所微生物保存库。

菌株在 MA 培养基中<sup>[13]</sup>,以光暗比为 12 h:12 h 的循环周期、光照密度为 15  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  及温度为 20  $^{\circ}\text{C}$  的条件培养 4 周。其中典型株 NIES-843 被用于表征核糖体蛋白和优化样品前处理方法的研究。

### 1.2 仪器和试剂

#### 1.2.1 仪器

(1) 高速冷冻离心机 A (德国 SIGMA 3-18K 型), (2) 高速冷冻离心机 B (美国 Beckman Allegra 64R 型), (3) 细胞破碎仪 (Mini Bead-Beater, Biospec products 公司产品), (4) 质谱仪 (日本岛津公司 Axima CFR Plus 型)。

#### 1.2.2 试剂

(1) TMA-1 缓冲液: 含 10 mmol/L 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (pH 值 = 7.8), 30 mmol/L 的氯化铵, 10 mmol/L 的氯化镁, 以及 6 mmol/L 的 2-巯基乙醇; (2) 含芥子酸基质 20 000 mg/L 混合液: 含 50% 乙腈和 1% 三氟乙酸。

### 1.3 3 种不同的样品前处理制备方法

#### 1.3.1 完整细胞样品的制备

由于铜绿微囊藻细胞中有上浮气泡,所以首先运用轻微的超声波法进行气泡的破除处理。然后将细胞培养液置于 15 mL 的离心管中,在 9 100 g 强度下用离心机 A 离心 10 min,弃上清液,将管底沉淀物移入 1.5 mL 离心管中,再次在 20 400 g 强度下离心 10 min,分离后得到细胞沉淀物。将其再

溶于 10  $\mu\text{L}$  的含芥子酸基质混合液中,用于 MALDI-TOF MS 测定。

#### 1.3.2 细胞溶解物样品的制备

将细胞沉淀物(上一步收集到的湿重约 20 ~ 40 mg 的细胞)溶于 160  $\mu\text{L}$  TMA-1 缓冲液中,然后移入含有 160 mg 氧化锆-二氧化硅微粒(直径 1  $\mu\text{m}$ )的管中,在细胞破碎仪中,以 3 000 r/min 破碎 1 min。然后将上述细胞碎片和微粒的混合物用离心机 A 在 5 800 g 强度下离心 25 min,收集上清液中的细胞溶解物并溶于 10  $\mu\text{L}$  的含芥子酸基质混合液中,用于 MALDI-TOF MS 测定。

#### 1.3.3 核糖体蛋白组分浓缩样品的制备

将上一步中制备的细胞溶解液添加 TMA-1 缓冲液至最终体积为 250  $\mu\text{L}$ ,用离心机 B 在 64 397 g 强度下离心 4 h。在离心管底部的沉淀物即为浓缩的核糖体蛋白组分,再将其溶于 10  $\mu\text{L}$  的含芥子酸基质混合液中,用于 MALDI-TOF MS 测定。

### 1.4 MALDI-TOF MS 法测定

将 2  $\mu\text{L}$  上清液样品与基质混合液滴于专用样品板上,在室温下自然晾干。仪器测定参数:采集质核比 ( $m/z$ ) 为 2 000 ~ 40 000;激光点击数 500;采用  $\text{N}_2$  为激光源 ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ , 脉冲延长时间为 3 ns, 频率 10 Hz);测定模式为阳离子线性模式。MALDI-TOF MS 的详细机理及使用方法见文献[14-15]。

## 2 结果和讨论

### 2.1 3 种不同的前处理方法比较

图 1(a)(b)(c)是通过上述 3 种不同前处理

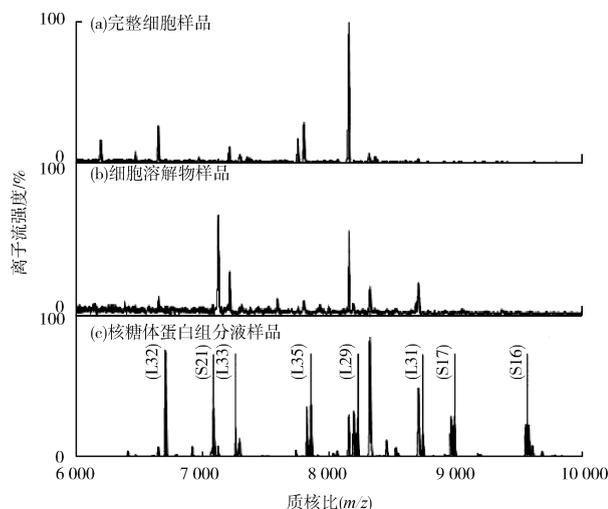


图 1 3 种样品前处理方法质谱图

方法得到的样品质谱图。

方法(a)和(b)几乎没有观察到有效峰值[即图1(c)所标识的核糖体蛋白峰,下述2.2将会具体解释],而利用方法(c)得到的质谱图中,则观察到了清晰有效的核糖体蛋白峰。其原因可能是铜绿微囊藻有一层独特的细胞壁,内外膜间有相对较厚的肽聚糖层以及膜外多糖纤维涂层<sup>[16]</sup>,这可以阻止细胞内物质的释放,使核糖体蛋白组分的有效电离变得困难。另一原因可能是,相比于细菌,铜绿微囊藻生长速度较慢(倍增时间长),在细胞溶解样品中细胞体内核糖体蛋白的浓度非常低,这导致了难以有效地检测到核糖体蛋白。

研究通过浓缩原始核糖体蛋白而成功地检测到核糖体蛋白峰,表明细胞破碎和离心分离这2步预处理对于从铜绿微囊藻细胞中观察和识别核糖体蛋白是非常有效且成功的前处理方法,符合简单、低成本(时间和人力)的要求。

2.2 NIES-843 株的核糖体蛋白特征峰值的鉴定

NIES-843 的完整基因组已被成功测序,其核糖体蛋白的氨基酸序列可以从公共的蛋白质数据库检索到(UniProtKB: <http://www.uniprot.org/>),每种核糖体蛋白的理论分子质量可以通过序列的等电点和分子质量工具计算得到([http://www.ex-pasy.org/compute\\_pi/](http://www.ex-pasy.org/compute_pi/))。从 NIES-843 株检测到的峰值,经与计算值相比较,则可被鉴定为核糖体蛋白。

表 1 显示的是 NIES-843 株通过前处理方法(c)得到的质谱图,检测到的峰所对应的  $m/z$  的值与核糖体蛋白的  $[M+H]^+$  的计算峰值进行比较,结果有 8 个核糖体蛋白被鉴定,已在图 1(c)中标识出(有效的特征核糖体蛋白峰)。在之前的研究中,植物乳酸菌 NCIMB 8826 中的 42 种核糖体蛋白已经通过 MALDI-TOF MS 测定成功地被表征出,这表明核糖体蛋白作为生物标识物用于 MALDI-TOF MS 法鉴别蓝藻是可行的。

表 1 来自 *Microcystis aeruginosa* (NIES-843) 株的核糖体蛋白质特征峰值的鉴定

蛋白 质名	计算峰值 [M+H] <sup>+</sup>	检测峰值	绝对误 差/u	相对误 差/10 <sup>-6</sup>
S16	9 561.1	9 561.3	0.2	2.4
S17	8 998.4	8 998.8	0.4	4.4
S21	7 094.3	7 094.6	0.3	4.9
L29	8 231.6	8 231.7	0.1	1.3

续表

蛋白 质名	计算峰值 [M+H] <sup>+</sup>	检测峰值	绝对误 差/u	相对误 差/10 <sup>-6</sup>
L31	8 751.1	8 751.4	0.3	3.4
L32	6 719.5	6 719.5	0.0	0.6
L33	7 270.4	7 270.4	0.0	-0.4
L35	7 886.4	7 866.0	-0.4	-4.4

2.3 利用 MALDI-TOF MS 方法鉴别 4 种不同种属的蓝藻

图 2(a)(b)(c)(d) 显示的是 4 种蓝藻藻株 NIES-1639、NIES-230、NIES-206 和 NIES-843 经前处理方法(c)后用 MALDI-TOF MS 得到的  $m/z$  在 6 000 ~ 10 000 之间的质谱图。在此区间内,各菌株分别有 6 ~ 13 个不同  $m/z$  值的离子峰。NIES-1639 的特征离子峰主要分布在 6 500 ~ 9 500 之间,NIES-206 的离子峰从 6 000 开始,而 NIES-843 与其他 3 种相比,各峰强度都较大。

因此,直接比对质谱图很容易发现不同蓝藻菌株间的差异,蓝藻门下的上述 4 种不同种属的菌株间都没有发现共同离子峰。而且,每种蓝藻都显示出具有本身特有的峰值组合,具备自身的特征“指纹”,根据测定得到的质谱波谱,可以鉴别不同种属的蓝藻。

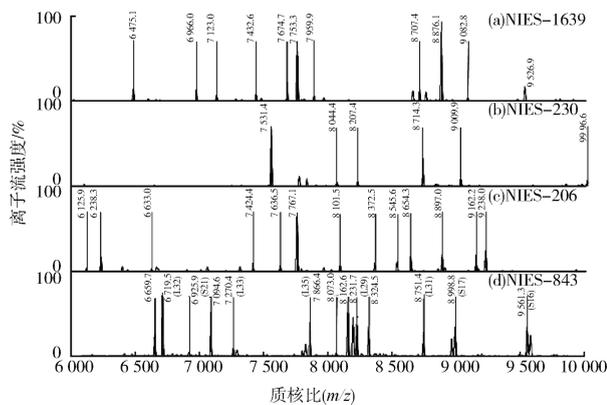


图 2 4 种蓝藻藻株质谱图

3 结语

利用 MALDI-TOF MS 测定蓝藻细胞,将质谱技术应用到蓝藻的鉴定,在环境科学研究领域内具有一定的创新性。对来自国内外藻种保存库的标准蓝藻进行测定,建立不同种属蓝藻的质谱数据库。相对于传统的蓝藻检测方法,该方法具有以下明显优势:(1)快速简便,被测样品无须进行复杂

的前处理和成分提取,从样品准备到测定完成,仅需要不超过 10 min 的时间;(2)鉴定精确,引进新的生物标识物——核糖体蛋白质的概念,蓝藻细胞中约有 55 个核糖体蛋白质的氨基酸序列可作为分类指标,和 16S rRNA 方法中只有单个基因序列作为分类指标相比,更加精确,可以实现在更高水平上对蓝藻的种类进行鉴定;(3)测定过程程序化,方法中只包括样品和基质混合、加载样品、质谱仪测定 3 个基本步骤,可以实现操作程序化进而进行批量化测定。

#### [参考文献]

- [1] QIN B Q, WANG X D, TANG X M, et al. Drinking Water Crisis Caused by Eutrophication and Cyanobacterial Bloom in Lake Taihu: Cause and Measurement [J]. *Advances in Earth Science*, 2007, 22(9): 896 - 906.
- [2] 熊春妮, 田晓锋, 汤爱仪, 等. 我国蓝藻水华遥感监测研究进展[J]. *资源与环境科学*, 2010, 2(9): 281 - 283.
- [3] 牛志春. 太湖蓝藻预警监测遥感自动解译系统研究[J]. *环境监控与预警*, 2013, 5(6): 12 - 14.
- [4] 张哲海, 厉以强. 应用荧光定量 PCR 技术监测玄武湖蓝藻水华[J]. *环境监控与预警*, 2013, 5(4): 9 - 12.
- [5] 朱冰川, 张军毅, 魏轲, 等. 浮游植物半定量活检法在蓝藻预警监测中的应用[J]. *环境监控与预警*, 2011, 3(6): 8 - 11.
- [6] RUDI K, SKULBERG O M, SKULBERG R, et al. Application of sequence specific labeled 16S rRNA gene oligonucleotide probes for genetic profiling of cyanobacterial abundance and diversity by array hybrid dization [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000(66): 4004 - 4011.
- [7] LAY J O. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria [J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2001(20): 172 - 194.
- [8] 石田康行. Rapid Discrimination of Pathogenic bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization [J]. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, 2003(51): 108 - 113.
- [9] PLAMEN A D, CATHERINE F. Mass Spectrometry for Rapid Characterization of Microorganisms [J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2008(1): 71 - 93.
- [10] SUN L W, SATO H, TORIMURA M, et al. Rapid discrimination of lactic acid bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. *BUNSEKI KAGAKU (The Japan Society for Analytical Chemistry)*, 2004(53): 603 - 608.
- [11] SUN L W, SATO H, TORIMURA M, et al. Rapid Identification of Hiochi Bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. *BUNSEKI KAGAKU (The Japan Society for Analytical Chemistry)*, 2007(56): 1071 - 1079.
- [12] MAJCHERCZYK P A, MCKENNA T, MOREILLON P, et al. The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006(255): 233 - 239.
- [13] KASAI F, KAWACHI M, ERATA M, et al. NIES-Collection, List of Strains, Microalgae and Protozoa [M]. 7th ed. Tsukuba: National Institute for Environmental Studies, 2004.
- [14] SUN L W, TERAMOTO K, SATO H, et al. Characterization of ribosomal proteins as biomarkers for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectral identification of *Lactobacillus plantarum* [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006(20): 3789 - 3798.
- [15] TERAMOTO K, SATO H, SUN L W, et al. Phylogenetic Classification of *Pseudomonas putida* Strains by MALDI-MS Using Ribosomal Subunit Proteins as Biomarkers [J]. *Journal of Proteome Research*, 2007(6): 3899 - 3907.
- [16] LINDA E G, JAMES M G, LEE W W. ALGAE [M]. 2nd ed. San Francisco: PEARSON, 2009: 96 - 97.

#### · 简讯 ·

### 《大气十条》中期评估报告发布

《大气污染防治行动计划》(以下简称《大气十条》)实施情况中期评估报告今日发布。评估认为,《大气十条》确定的治污思路和方向正确,执行和保障措施得力,空气质量改善成效已经显现。

2013年,国务院印发《大气十条》。根据相关要求,中国工程院组织 50 余位相关领域院士和专家,对《大气十条》落实情况进行中评估。评估内容主要包括空气质量改善情况,各项政策措施对空气质量改善的贡献,总结经验和不足,对下一阶段提出建议等。

评估认为,全国城市细颗粒物(PM<sub>2.5</sub>)、可吸入颗粒物(PM<sub>10</sub>)浓度呈下降趋势,多数省份 PM<sub>2.5</sub>或 PM<sub>10</sub>年均值下降幅度达到或超过《大气十条》规定的中期目标要求,可望实现 2017 年的考核目标。但环境空气质量面临形势依然严峻,冬季重污染问题突出,个别省份的 PM<sub>10</sub>年均值有所上升。

评估显示,重点行业提标改造、产业结构调整、燃煤锅炉整治和扬尘综合整治 4 类措施是对 PM<sub>2.5</sub>浓度下降贡献最为显著的措施。北京市及周边省份的重污染应急措施能够有效降低 PM<sub>2.5</sub>浓度,两次启动红色预警使得重污染期间北京市 PM<sub>2.5</sub>日均值下降 17% ~ 25%。同时,气象条件近两年没有对空气质量的改善起到“助推”作用。

评估报告建议,加大秋冬季节污染防治工作力度,加大力度释放能源结构调整的污染削减潜力,并构建精准化治霾体系,提升重污染天气应对能力,保障空气质量长效改善。