



# 中华人民共和国国家标准

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

General microorganism identification method with matrix-assisted laser  
desorption/ionization time of flight mass spectrometry

2017-05-12 发布

2017-12-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布  
中国国家标准化管理委员会



## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本标准起草单位：国家农业标准化监测与研究中心(黑龙江)、中国测试技术研究院、深圳出入境检验检疫局、卫生部北京医院、梅里埃诊断产品(上海)有限公司、北京威泰科生物技术有限公司。

本标准主要起草人：彭丽萍、周李华、姜雯、吕敬章、王志强、张秀珍、孔鲁裔、胡云建、王海宽、陆俊杰、张春红、王科、徐凤霞、张滨滨。



# 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

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 4789.10—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18204.3—2013 公共场所卫生检验方法 第3部分:空气微生物

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

**全微生物蛋白质指纹图谱 microbial protein fingerprinting**

未经处理的微生物菌苔(如固体培养基上的菌落),直接涂于靶板上,待干燥后加上基质混合,全细菌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:  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid)

DHB: 2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid)

MALDI-TOF MS: 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)

## 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

## GB/T 33682—2017

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(MALDI-TOF MS)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<sub>3</sub>CN)。
- 6.3 乙醇(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH)。
- 6.4 三氟乙酸(CF<sub>3</sub>COOH)。
- 6.5 磷酸盐缓冲液:pH 7.2。
- 6.6  $\alpha$ -氰基-4 羟基肉桂酸(C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>),光谱纯。
- 6.7 2,5-二羟基苯甲酸(C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>),光谱纯。
- 6.8 血琼脂培养基:按照 GB 4789.10—2016 中 A.2 的规定执行。
- 6.9 沙氏琼脂培养基:按照 GB/T 18204.3—2013 中 4.2.2.1 的规定执行。
- 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 MS。
- 7.2 二级生物安全柜。
- 7.3 恒温培养箱:36 ℃ $\pm$ 1 ℃、25 ℃ $\pm$ 1 ℃。
- 7.4 离心机:12 000 r/min。
- 7.5 旋涡混合器。
- 7.6 显微镜。
- 7.7 微量移液器及枪头。
- 7.8 一次性或重复使用靶板。
- 7.9 1  $\mu$ L 接种环。

### 8 试验方法

#### 8.1 微生物的培养

##### 8.1.1 培养前处理

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 微生物培养

一般细菌划线接种血琼脂培养基,36 ℃ $\pm$ 1 ℃培养 24 h $\pm$ 2 h;酵母划线接种沙保弱葡萄糖琼脂培养基,25 ℃ $\pm$ 1 ℃培养 2 d~3 d;其他类型微生物,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 样品处理(点靶)

### 8.2.1 一般细菌和酵母菌

鉴定细菌时,直接使用 1  $\mu\text{L}$  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。如果鉴定酵母,需要用微量移液器吸取 0.5  $\mu\text{L}$  25% FA 溶液(破坏细胞壁,使蛋白溶出)。用微量移液器吸取 1  $\mu\text{L}$  基质溶液,与样品混合,自然晾干,形成结晶(基质可选择 CHCA、DHB 中的一种)。

### 8.2.2 霉菌

将无菌棉拭子在去离子水中沾湿后,从沙氏培养基上刮取 1  $\text{cm}^2 \sim 2 \text{cm}^2$  霉菌菌落,转移至装有 300  $\mu\text{L}$  超纯水的 2 mL 离心管中。向离心管中加入 900  $\mu\text{L}$  乙醇,用漩涡混合器混匀 3 s $\sim$ 5 s。混合后用离心机在 10 000 r/min 下离心 2 min 后去除上清液,置于室温干燥。加入 40  $\mu\text{L}$  70%甲酸漩涡混合 3 s $\sim$ 5 s,之后再加入 40  $\mu\text{L}$  乙腈漩涡混合 3 s $\sim$ 5 s,用离心机在 10 000 r/min 离心 2 min 后,用微量移液器吸取 1  $\mu\text{L}$  样品加在样品靶板孔中,待室温干燥后再加入 1  $\mu\text{L}$  基质溶液,在室温下自然晾干。

## 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。

8.4.2 激光能量: 每激光束能量 100  $\mu\text{J}$ , 激光能量可从 0% $\sim$ 100% 范围调节。

8.4.3 质谱扫描范围: 2 000 Da $\sim$ 20 000 Da。

8.4.4 微生物指纹图谱库: VMS Plus Database<sup>1)</sup> 或同等类型数据库。

## 8.5 质控菌株校准

将标准菌株 ATCC8739 大肠埃希氏菌转种至血琼脂培养基上 36  $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 24 h $\pm$ 2 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。

## 8.6 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指纹图谱库即微生物鉴定系统,并在鉴定系统中鉴定结果。

## 8.7 结果判读

图谱数据经指纹图谱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。

## 9 结果报告

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。

---

1) 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。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

---

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
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  
GB/T 33682—2017

\*

中国标准出版社出版发行  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238  
读者服务部:(010)68523946

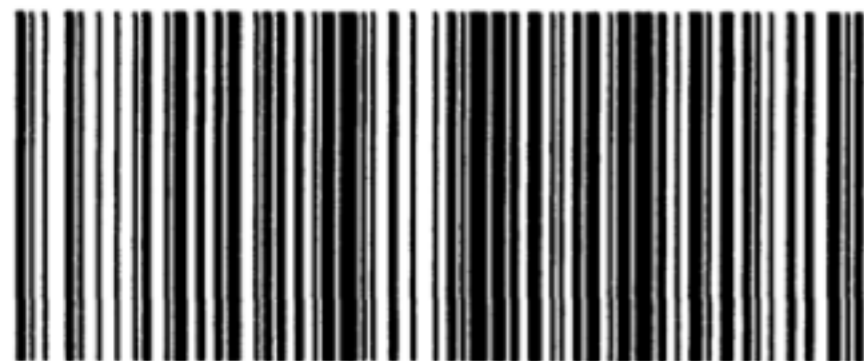
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷  
各地新华书店经销

\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 9 千字  
2017年5月第一版 2017年5月第一次印刷

\*

书号: 155066·1-56288 定价 14.00 元



GB/T 33682-2017