



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107677836 A

(43)申请公布日 2018.02.09

(21)申请号 201710950149.X

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003

(22)申请日 2013.05.01

代理人 张浴月 李玉锁

(30)优先权数据

61/687,785 2012.05.01 US

13/874,213 2013.04.30 US

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

(62)分案原申请数据

201380035676.8 2013.05.01

(71)申请人 奥克索伊德有限公司

地址 英国汉普郡

(72)发明人 小詹姆斯·L·斯蒂芬森

O·沃兹达科 R·格斯特

C·坎贝尔 I·D·贾丁

I·C·莫尔科利斯特

权利要求书3页 说明书20页 附图24页

(54)发明名称

微生物分析的设备和方法

(57)摘要

对从培养物中分离之后或直接来自样品的微生物进行鉴定的方法和系统。该方法和系统基于经高分辨率/质量准确性的单级(MS)或多级(MSⁿ)质谱而对微生物蛋白质进行的表征来鉴定微生物。本公开还包括:通过采用适用于基本所有微生物的方法和高分辨率/质量准确性的单级(MS)或多级(MSⁿ)质谱,来对毒力因子、抗生素耐受性标记物、抗生素敏感性标记物、分型或其它特征进行目标检测和评估的讨论。

1. 一种用于对样品中一种或多种微生物进行鉴定和表征的方法,所述方法包括:

a执行第一由上至下的分析方法,其中所述第一由上至下的分析方法采用质谱分析来检测并鉴定来自所述样品中的一种或多种微生物中的每一种的一种或多种蛋白质;

b基于从步骤(a)检测并鉴定的一种或多种蛋白质,将所述样品中的一种或多种微生物中的至少一种鉴定至至少属种级;

c基于从步骤(b)所鉴定的至少一种微生物,从预定义的分析方法列表中自动选择第二由上至下的分析方法,其中所述第二由上至下的分析方法也采用质谱分析;

d对所述样品执行步骤(c)的所述第二由上至下的分析方法,以确定在所述样品中是否存在指示抗生素耐受性标记物、抗生素敏感性标记物和/或毒力因子的蛋白质,以及任选地,对所述样品中存在的指示抗生素耐受性标记物、抗生素敏感性标记物和/或毒力因子的蛋白质进行定量。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一由上至下的分析方法包括:将源自所述一种或多种微生物的细胞提取物的一种或多种可溶蛋白质的溶液直接注入到电喷雾设备中,不需要色谱分离。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第二由上至下的分析方法包括:在将所述溶液注入到所述电喷雾设备之前,将源自所述一种或多种微生物的细胞提取物的一种或多种可溶蛋白质的溶液进行色谱分离。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一由上至下的分析方法包括数据获取期间,并且在所述数据获取期间执行步骤(b),使得至少步骤(a)和(b)被实时执行。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤(a)和(b)的组合在少于10分钟,少于5分钟,或在约1分钟或更短时间内执行,步骤(d)在少于15分钟,少于10分钟,或在约5分钟或更短时间内执行。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一由上至下的分析方法和所述第二由上至下的分析方法采用相同的质谱仪执行。

7. 一种用于对样品中一种或多种未知微生物进行鉴定和表征的方法,所述方法包括:

a提供所述样品的流体提取物,其中所述流体提取物包含来自所述一种或多种未知微生物中的每一种的一种或多种完整可溶蛋白质;

b执行第一由上至下的分析方法,其中所述第一由上至下的分析方法采用质谱分析来检测来自所述一种或多种未知微生物中的每一种的一种或多种蛋白质,其中所述第一由上至下的分析方法包括数据采集期间;

c基于从步骤(b)检测并的一种或多种蛋白质,将所述样品中的一种或多种未知微生物中的至少一种鉴定至至少属种级;以及

d执行第二由上至下的分析方法,其中所述第二由上至下的分析方法采用质谱分析来确定在所述样品中是否存在指示株型和/或血清型鉴定、抗生素耐受性、抗生素敏感性、和/或毒力因子、或它们的任何组合的一种或多种蛋白质,以及任选地,对所述一种或多种蛋白质进行定量,

其中:

鉴定所述样品中的一种或多种未知微生物中的至少一种的步骤发生在所述第一由上至下的分析方法的数据采集期间,

基于从步骤(c)鉴定的至少一种微生物来选择所述第二由上至下的分析方法,

所述第一由上至下的分析方法和所述第二由上至下的分析方法采用相同的质谱仪执行,以及/或

步骤(b)和(c)的组合在少于10分钟,少于5分钟,或在约1分钟或更短时间内执行,步骤(d)在少于15分钟,少于10分钟,或在约5分钟或更短时间内执行。

8.根据权利要求7所述的方法,其中所述第一由上至下的分析方法包括:将源自所述一种或多种未知微生物的细胞提取物的一种或多种完整可溶蛋白质的溶液直接注入到电喷雾设备中,不需要色谱分离。

9.根据权利要求7所述的方法,其中所述第二由上至下的分析方法包括:在将所述溶液注入到所述电喷雾设备之前,将源自所述一种或多种未知微生物的细胞提取物的一种或多种完整可溶蛋白质的溶液进行色谱分离。

10.根据权利要求7所述的方法,其中,所述第一由上至下的分析方法和所述第二由上至下的分析方法中的一个或两者采用自动仪器执行,基于从步骤(c)所鉴定的至少一种微生物,从分析方法列表中自动选择所述第二由上至下的分析方法。

11.根据权利要求7所述的方法,其中所述第一由上至下的分析方法和所述第二由上至下的分析方法中的一个或两个包括:

将来自所述一种或多种未知微生物中的每一种的一种或多种完整可溶蛋白质离子化,以形成离子化蛋白质;以及

采用质谱分析来分析所述离子化蛋白质,其中所述分析包括:

i在第一质谱分析步骤中,获取代表一种或多种所述离子化蛋白质的一个或多个质谱,

ii由所述一个或多个质谱,来确定所述一种或多种离子化完整蛋白质的分子量,

iii采用所确定的所述一种或多种离子化完整蛋白质的分子量,来搜索含有已知微生物蛋白质的分子量的第一数据库,以及从所述第一数据库中选择候选的微生物子集,

iv在第二质谱分析步骤中,从所述一个或多个离子化完整蛋白质中选择一种或多种前体离子,以及通过裂解方式将所述一种或多种前体离子裂解,以产生多种产物离子,以及

v采用所述多种产物离子的相应的质荷比(m/z)来搜索第二数据库,其中所述第二数据库含有已知微生物蛋白质的分子量和下述项目中的至少一个,所述项目包括产物离子 m/z 比值、氨基酸序列或所述已知微生物蛋白质的翻译后修饰信息,其中,来自所述第一数据库的所述候选的微生物子集用于限定所述第二数据库的搜索。

12.根据权利要求11所述的方法,其中所述离子化是电喷雾离子化。

13.根据权利要求11所述的方法,其中所述裂解方式是碰撞诱导解离。

14.根据权利要求11所述的方法,其中步骤(i)-(v)包括所述数据采集期间。

15.根据权利要求11所述的方法,还包括:

将所述样品中的所述一种或多种未知微生物破碎,以提供流体提取物;

将所述流体提取物中的可溶蛋白质部分与不可溶蛋白质部分分离,制备含有来自所述一种或多种未知微生物的一种或多种完整可溶蛋白质的溶液;以及

将所述含有来自所述一种或多种未知微生物的一种或多种完整可溶蛋白质的溶液注入到质谱仪系统的离子化设备。

16.根据权利要求15所述的方法,其中,在所述第一由上至下的分析方法中,将所述含

有来自所述一种或多种未知微生物的一种或多种完整可溶蛋白质的溶液直接注入到所述离子化设备中,不需要色谱分离。

17. 根据权利要求15所述的方法,其中将所述流体提取物中的可溶蛋白质部分与不可溶蛋白质部分分离和制备所述含有来自所述一种或多种未知微生物的一种或多种完整可溶蛋白质的溶液包括采用固相提取装置,所述固相提取装置包括结合的二氧化硅吸附剂、聚合物吸附剂或螯合剂。

18. 根据权利要求15所述的方法,其中所述第二由上至下的分析方法包括:在将所述含有来自所述一种或多种未知微生物的一种或多种完整可溶蛋白质的溶液注入到所述离子化设备之前,将所述溶液进行色谱分离。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述色谱分离包括:快速、时间压缩的色谱法,以提供对所述溶液中蛋白质的部分分离。

20. 根据权利要求7所述的方法,其中所述第二由上至下的分析方法包括:将所述一种或多种未知微生物暴露于抗生素并检测是否存在指示抗生素耐受性、抗生素敏感性、和/或毒力因子、或它们的任何组合的一种或多种蛋白质。

微生物分析的设备和方法

[0001] 本申请是申请号为201380035676.8、申请日为2013年5月1日、发明名称为“微生物分析的设备和方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 该申请要求于2013年4月30日提交、申请序列号是No.13/874213的美国专利申请“Apparatus and methods for microbiological analysis”的优先权。该申请还要求于2012年5月1日提交的,发明人是James L. Stephenson, Jr., Oksana Gvozdyak、Roger Grist、Clay Campbell和Ian D. Jardine, 申请序列号是No.61/687785的美国临时专利申请“Apparatus and methods for microbial analysis and directed empiric therapy”的优先权,通过引用将其全文结合至本公开。

背景技术

[0004] 近年来,质谱分析与传统的鉴定微生物的方法相比,由于其准确性提高,获得结果的时间缩短,成为流行的鉴定微生物的手段。到目前为止,微生物鉴定中最常用的质谱分析方法是基质辅助的激光解吸附离子化时间飞行(MALDI-TOF)质谱分析。在MALDI-TOF中,未知微生物细胞与合适的紫外光吸收基质溶液混合,并在样品板上干燥。或者,用微生物细胞的提取物取代完整细胞。转移至质谱仪的离子源之后,激光束照射至样品进行蛋白质的解吸附和离子化,并收集随时间变化的质谱数据。

[0005] MALDI-TOF法产生的微生物的质谱显示了来自完整肽、蛋白质和蛋白质片段的大量尖峰,其构成了该微生物的“指纹”。该方法依赖于未知微生物的质谱尖峰图与参考数据库的匹配,所述参考数据库包括采用基本相同的实验条件所获得的已知微生物的图谱集合。分离的微生物和参考数据库中的某个图谱的匹配越好,则将该微生物鉴定是属、种、(或在某些情况下)亚种级的可信度就越高。由于该方法依赖于MALDI-TOF质谱中尖峰图的匹配,其不需要鉴定或者另外表征在该未知微生物图谱中表示的蛋白质以鉴定该微生物。

[0006] 尽管MALDI-TOF法快速、成本高效,其仍然具有缺陷从而限制了其应用范围。基质辅助激光解吸附离子化(MALDI)质谱中的信息内容反映了含量最高的、可离子化的蛋白质,除了病毒,在所采用的实验条件下,所述蛋白质通常局限于核糖体蛋白质。由于核糖体蛋白质在原核生物中是高度保守的(conserved),因此,MALDI-TOF对紧密相关的微生物的区分是有限的。而且,株型鉴定(strain identification)和/或血清型鉴定、抗生素耐受性、抗生素敏感性、毒力(virulence)或其它重要特征的确定取决于蛋白质标记物而不是核糖体蛋白质的检测,其进一步限制了MALDI-TOF在微生物分析中的应用。采用MALDI-TOF鉴定微生物的实验室必须采用其它方法以进一步表征被鉴定的微生物。另外,MALDI-TOF法对质谱形状匹配的依赖要求纯的培养物,以获得高质量结果,其通常不适用于直接测试含有不同微生物的样品。

[0007] 已经采用了若干其它的质谱分析法以检测微生物。例如,已经描述了基于质谱的蛋白质测序方法,其中液相色谱与串联质谱联用(LC-MS/MS),从源自微生物样品的蛋白质的酶分解物获得序列信息。该方法,称为“由下至上(bottom-up)”的蛋白质组学是被广泛应

用的蛋白质鉴定方法。该方法可以提供亚种或株型级的鉴定,这是因为,色谱分离允许对核糖体蛋白质之外的其它蛋白质进行检测,包括有利于对抗生素耐受性标记物和毒力因子进行表征的蛋白质。所述由下至上的方法的主要缺陷是获得结果的时间延长,这是因为,需要对蛋白质进行分解、长时间的色谱分离和数据处理。因此,该方法不适用于高产出量处理。

发明内容

[0008] 本发明包括一种用于在从培养物分离之后或者直接从样品对微生物进行鉴定的新方法和系统,其中所述方法和系统是基于通过高分辨率/质量准确性的单级(MS)或多级(MSⁿ)质谱来对微生物的蛋白质进行表征。本公开采用基本适用于几乎所有微生物的方法和高分辨率/质量准确的单级(MS)或多级(MSⁿ)质谱,还讨论了对毒力因子、抗生素耐受性标记物、抗生素敏感性标记物或其它特征的目标检测和评估。尽管以下讨论集中于通过蛋白质表征来鉴定微生物,但是本公开所述的方法和系统同等适用于通过对一种或多种小分子、脂类或碳水化合物等的表征来鉴定微生物。

[0009] 一方面,本发明提供了一种传统由下至上蛋白质组学方法的替代方法,即通过基本适用于几乎所有微生物的方法对源自微生物细胞的完整蛋白质进行由上至下(top-down)的分析,所述微生物包括革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、分枝杆菌、支原体、酵母菌、病毒和丝状(即显微镜可见的)真菌。本发明提供了对含有微生物混合物的样品中的微生物在属、种、亚种、致病株型、甚至是血清型级的鉴定,和/或对直接来自纯的和/或混合培养物以及直接样品(例如表面拭子、体液等)的微生物进行鉴定。另外,可以采用该方法对毒力因子、抗生素耐受性和敏感性标记物或其它特征进行目标检测。本发明的方法简单且快速,这是因为,不需要对样品进行化学或酶分解,而且实时进行数据处理。

[0010] 示例性方法包括两阶段工艺。在第一阶段,样品中微生物的可溶蛋白质被快速提取,并经质谱仪分析,以便基于对一种或多种被提取的可溶蛋白质的分子量和片段分析来鉴定微生物。第一阶段在几分钟之内完成,例如少于10分钟,少于5分钟或大约1分钟之内或更少。第二阶段采用快速色谱(rapid,time-compressed chromatography)分离和质谱分析(例如目标MS和MSⁿ)以进一步表征在第一步中鉴定的微生物,例如通过确定毒力因子、抗生素耐受性标记物、抗生素敏感性标记物或其它特征来表征。第二阶段在几分钟之内完成,例如少于15分钟,少于10分钟,或大约5分钟之内或更少。两个阶段均依靠对源自微生物的完整蛋白质的检测和鉴定,不需要将蛋白质进行化学、物理或酶降解至它们的取代肽。

[0011] 对样品中一种或多种微生物进行鉴定和表征的另一示例性方法包括以下步骤:(a)采用质谱分析进行第一分析方法,以对一种或多种微生物中的每一个检测和鉴定一种或多种(例如,一、二、三、四、五种或更多)蛋白质;(b)利用上述来自一种或多种微生物中的每一个的一种或多种蛋白质的身份,进一步确定样品中的至少一种微生物;(c)利用来自步骤(b)的信息从预定义的分析方法列表中自动选择第二分析方法,第二分析方法也采用质谱分析;以及(d)对样品执行第二分析方法,以确定样品中是否存在指示抗生素耐受性标记物、抗生素敏感性标记物和/或毒力因子的蛋白质,以及任选地,对样品中存在的抗生素耐受性标记物、抗生素敏感性标记物和/或毒力因子进行定量。

[0012] 目标微生物包括但不限于:革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、分枝杆菌、支原体、酵母菌、病毒和丝状真菌。表征过程可以包括检测感兴趣的微生物所产生的毒力因子、耐受

性标记物、抗生素敏感性和任何其它分子,包括但不限于影响临床结果的那些分子。该方法适用于大量的不同类型样品,包括源自临床样品的纯的或混合培养物的样品,包括但不限于:血、尿、粪便、痰、伤口和体表拭子,还适用于其它来源的样品,包括工业或环境样品,例如食品、饮料、土壤、水、空气和表面拭子。

[0013] 本发明的方法包括下述步骤中的至少一个或多个:微生物细胞破碎、蛋白质溶解、样品清洗(脱盐、去除不可溶组分和碎片、和/或浓缩)、注入样品或流动注射、快速部分液相色谱分离、溶液中蛋白质的离子化、MS和MS/MS模式的高分辨率/质量准确性的多级质谱分析、经分子量分析和/或蛋白质测序分析的微生物鉴定。

[0014] 本发明的方法和样品制备试剂盒提供了执行该方法的装置。如一个实施例中所考虑的,快速提取程序之后跟着进行在线(on-line)清洗和直接分析。在另一实施例中,快速提取之后对完整蛋白质进行快速部分液相色谱分离。之后,蛋白质被离子化,例如被电喷雾离子化。完整蛋白质进行MS和MSⁿ分析,从而根据需要将微生物鉴定至属、种、株型、亚种、致病型或血清型级。MS或MSⁿ法可以采用直接测序或图形匹配法进行病原鉴定。在采集过程中实时执行该鉴定过程。其也可以在采集之后进行。该系统进一步提供了对毒力因子、耐受性标记物、抗生素敏感性标记物和/或例如与疾病相关的任何其它相关标记物的定量检测和鉴定。

[0015] 由于采用有限的一组试剂来执行通用方法,本发明的方法适于在进行样品制备和质谱分析的全自动系统内使用。

[0016] 理想地,从样品制备至结果报告自动执行本发明的方法。结果可以自动传至医院电子医疗记录系统,结果可以在此直接与患者治疗方案、保险、帐单联系起来,或用于流行病学报告。该综合系统有利于对医院、局部、区域和全球范围内的疾病爆发进行流行病学追踪。对于高产出量的实验室,多个系统可以与中央计算机连接,所述中央计算机在报告之前对来自不同仪器的数据进行整合。该系统能够引入表型易感性数据,该数据可以与本发明生成的鉴定、毒力、抗生素耐受性和分型信息结合起来。

[0017] 通过以下说明书和所附的权利要求,本发明的这些和其它目标和特征将变得完全显而易见,或者可以通过下文所述的本发明的实施被了解。

附图说明

[0018] 为了进一步阐明本公开内容的上述和其它优势和特征,通过参考特定实施例,对本公开内容进行尤其详细的描述,用附图对所述实施例进行说明。应当认识的是,这些附图仅仅用于举例说明本公开内容的实施例,因此不能被认为是对其范围的限制。通过采用以下附图对本公开内容进行特别和详细地描述和解释,其中:

[0019] 图1A是用于描述鉴定微生物的方法的流程图;

[0020] 图1B是示意性描述了鉴定微生物的算法的流程图;

[0021] 图2是示意性描述了对来自至少一种微生物的可溶蛋白质进行快速提取和分析的系统从而鉴定所述至少一种微生物的框图;

[0022] 图3是示意性描述了根据图2所示系统的一个实施例所能采用的一个流路图;

[0023] 图4描述了经直接注入而得到的大肠杆菌提取物的全扫描电喷雾质谱;

[0024] 图5描述了图4所示的大肠杆菌提取物在50道尔顿(Da)窗口的质量分离;

- [0025] 图6描述了图5所示的50道尔顿的窗口的串联质谱；
- [0026] 图7描述了大肠杆菌的脱氧核糖核酸 (DNA) 结合蛋白质H-sn的+19的电荷状态的MS/MS碎片；
- [0027] 图8A-8E描述了对从地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、白念珠菌 (*Candida albicans*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、玫瑰色库克菌 (*Kocuria rosea*)、木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus*) 和包皮垢分支杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 提取出的可溶蛋白质进行快速部分色谱分离的质谱数据；
- [0028] 图9A显示的MS数据描述了在标准生长条件和在苯唑西林存在下生长18小时的耐抗生素大肠杆菌 (ATCC 35218) 之间的比较；
- [0029] 图9B显示的MS数据描述了图9A的在标准生长条件和在乙氧萘青霉素存在下生长18小时的耐抗生素大肠杆菌之间的比较；
- [0030] 图9C显示的MS数据描述了图9A的在标准生长条件和在青霉素存在下生长18小时的耐抗生素大肠杆菌之间的比较；
- [0031] 图9D显示的MS数据描述了图9A的在标准生长条件和在阿莫西林存在下生长18小时的耐抗生素大肠杆菌之间的比较；
- [0032] 图10描述了来自白假丝酵母菌的四种不同蛋白质的高分辨率/质量准确性的经提取的离子图谱；
- [0033] 图11A-11C描述了34摄氏度下、在Oxoid原装胰酶大豆琼脂上生长20小时的各种微生物的快速部分分离质谱 (FPCS-MS) 总离子电流图谱。(A) 一大肠杆菌ATCC 8739；(B) 一鹌鹑肠球菌ATCC 700425；(C) 一枯草芽孢杆菌斯皮兹仁亚种ATCC 6633；以及
- [0034] 图12描述了源自于由图11A所示、在34摄氏度下、在Oxoid原装胰酶大豆琼脂上生长20小时的大肠杆菌ATCC 8739的FPCS-MS所得信息的蛋白质去卷积质量。

具体实施方式

- [0035] 在一个实施例中，本发明提供了一种对来自至少一种微生物细胞的可溶蛋白质提取物进行快速提取和分析的方法，包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性细菌、分枝杆菌、支原体、显微镜下观察的真菌和病毒。通过质谱分析法进行蛋白质分析，从而鉴定样品中存在的微生物，然后任选择地，可以进行目标质谱分析以 (定性和定量地) 表征与抗生素耐受性和/或敏感性标记物、毒力因子、株型分型或其它特征有关的蛋白质。在另一实施例中，提供了执行该方法的试剂盒，包括以下两种或多种：试剂、消耗品、装置、校准物、操作件和标准。
- [0036] 图1A提供了对来自至少一种微生物细胞的可溶蛋白质提取物的快速提取和分析方法100的总流程概览。可以采用大量的独立仪器和装置人工执行方法100的步骤。或者，某些或所有步骤自动进行。适于执行图1A的方法100的示例性自动系统在图2中描述。可以在W02012/058632和W02012/058559中找到对该示例性自动系统的进一步描述，所述专利申请被全文引用至本公开。
- [0037] 现在参见图2，其概要描述了从一种或多种微生物中提取蛋白质、检测蛋白质和鉴定所述一种或多种微生物的系统200。系统200包括样品操作装置215；可以被样品操作装置215获取的样品210；以及与样品操作装置215流体连接的试剂、缓冲液等220。系统200进一步包括用于清洗 (例如脱盐、去除污染物、浓缩蛋白质) 的第一和第二固相提取装置235 (例

如,固相提取盒);以及在质谱分析之前通过液相色谱法对样品210进行至少部分纯化的任选色谱柱240。样品210、第一和第二提取装置235和任选的色谱柱240与流体操作泵230、试剂220和质谱仪250流体相通。

[0038] 样品操作装置215能够制备含有一种或多种微生物的一系列样品类型,并将从微生物中提取的可溶蛋白质部分传递至质谱仪250进行分析。样品210可以是怀疑含有一种或多种微生物的任何类型,包括但不限于:来自培养板的分离菌落、来自液体生长介质的细胞、血、尿、粪便、痰、伤口和体表拭子、土壤、食品、饮料、水、空气和环境表面拭子。

[0039] 样品操作装置215可以包括一个或多个细胞破碎装置、自动液体处理装置、离心装置、过滤装置、培养器、混合装置、真空泵、流体泵、和能够破碎微生物并分离可溶蛋白质部分的试剂220。可以通过本领域公知的机械、化学、酶和其它手段对细菌、真菌、支原体细胞、病毒等进行破碎。机械方法包括珠撞击、采用例如法压(French press)等的压力、声波降解或其它本领域已知的方法。化学方法包括暴露于离液剂,例如尿素、硫脲、或盐酸胍以溶解微生物细胞并使它们的内容物如溶解。或者,可以采用有机酸/溶剂混合物破碎细胞。酶法包括采用溶解酶、溶葡萄球菌酶或其它裂解酶,在细菌细胞壁上形成“洞”,从而使内容物泄漏进入周围溶液。

[0040] 如图2所示,系统200进一步包括任选的控制单元260,其可以通过连接装置270a-270d与系统200的不同部分连接。例如,控制单元260可以与样品210连接以控制样品的施加,与试剂220连接以控制各种试剂的添加,与泵230连接以控制流体操作、流速等,与样品操作装置215连接以控制样品制备,以及与质谱仪250连接以控制质谱参数。在所示的实施例中,控制单元260还可以作为数据处理单元,例如处理来自质谱仪250的数据,或者将数据传递至服务器进行处理和储存(图2中未示出服务器)。控制单元260还可用于自动将结果传递至医疗专业人员。

[0041] 在一些实施例中,系统200设计成被临床医生或者普通实验室技术人员使用,所述人员不一定是样品制备、液相色谱与质谱联用(LC-MS)操作、LC-MS方法研发等所有方面的专家。同样地,控制单元260可以设计成通过向用户提供简化的应用界面来封闭数据系统环境,从而可以用于启动和监测样品210监测的基本所有方面,而不需要用户与系统200的全部硬件和控制系统交互。因此,控制单元260被构造成在用户和基础服务之间提供了一定程度的隔离,其中所述基础服务控制装置、数据文件和算法从而将数据翻译成用户可读的形式。即,控制单元260消除了对用户了解或控制硬件以分析临床样品的要求,并提供了简化的界面以从质谱仪发送和接收信息。

[0042] 控制单元260可以被构造成内部监测每个样品分析要求,能够通过系统200从开始到结束追踪分析要求。一旦样品210的数正据被系统200获取或者已经获取,控制单元260可以被构造成基于用户选择的化验类型自动开始对数据进行后处理。而且,基于用户选择的化验类型,控制单元260可以被构造成自动选择后处理参数,并且一旦选定了化验并开始分析,其进一步减少了用户与系统的交互需求。控制单元260可以被设计成位于系统200和用户之间的层,以减少需要设置获取的样品化验方法的复杂性。控制系统260还可以被构造成仅仅向用户返回最相关的数据,从而避免用户被无关信息压倒。

[0043] 在一个实施例中,系统200可以进一步包括与样品操作装置215可操作地连接或者整合在一起的样品检测装置(未画出)。该样品检测装置可以与样品操作装置215一起工作,

或者独立于样品操作装置215执行以下功能中的至少一个：

- [0044] i. 鉴定进入系统的样品；
- [0045] ii. 针对进入系统的样品鉴定化验类型；
- [0046] iii. 基于预期的化验类型和/或感兴趣的分析物选择化验协议(protocol)；
- [0047] iv. 指导样品操作装置和/或控制系统以启动对样品中感兴趣分析物的分析；
- [0048] v. 基于针对化验类型和/或感兴趣的分析物而选择的化验协议，指导控制系统以选择一种或多种试剂；
- [0049] vi. 基于针对化验类型和/或感兴趣的分析物而选择的化验协议，指导控制系统以选择液相色谱流动相条件，以及使液相色谱系统进行化验和/或纯化感兴趣的分析物；
- [0050] vii. 基于针对化验类型和/或感兴趣的分析物而选择的化验协议，指导控制系统以选择质谱仪设置，以及使质谱仪创建与选定化验类型和/或感兴趣的分析物相关的质谱数据；或
- [0051] viii. 指导控制系统以分析与选定化验类型和/或感兴趣的分析物相关的质谱数据，从而鉴定感兴趣分析物的存在和/或浓度。

[0052] 在质谱分析之前可以清洗和/或纯化样品或经处理的样品。所述纯化或样品清洗可以指从细胞粗提物中去除盐或脂类的程序，或者使一种或多种感兴趣的分析物相对于样品中的另一或更多其它组分富集的程序。在一个实施例中，所述纯化或样品清洗可以通过蛋白质提取装置235和/或任选的色谱柱240来完成。

[0053] 在一个实施例中，第一和/或第二提取装置235可以包括固相提取(SPE)盒。在一个实施例中，SPE盒235可以与高分辨率/高质量准确性质谱仪250直接连接。在一个实施例中，SPE盒可以是具有小体积二氧化硅或其它吸附剂的聚丙烯尖头，所述吸附剂含有键合的C₄、C₈或C₁₈，或其它固定在盒中的功能团，所述盒例如是StageTip™盒(Thermo Fisher Scientific)。在另外的实施例中，可以采用聚合物吸附剂或螯合剂。床体积可以小至1微升或更小，但是也可以采用更大的体积。该装置和方法更好地适合来源于微生物细胞的复杂样品，这是因为，每个SPE盒仅使用一次，将从一个样品至另一个的过载问题(carryover problem)降至最小。

[0054] 在一个实施例中，任选的色谱柱240可以包括构造为用于对样品的蛋白质进行至少部分色谱分离的柱。色谱柱中的固定相可以是多孔或无孔二氧化硅或琼脂糖颗粒，或在柱内聚合或其它方式形成的单块材料。固定相可以涂覆有适当的材料，例如C₁₈、C₈、C₄或其它合适的衍生物，或者含有阳离子交换剂或其它材料，或上述的组合，从而有利于蛋白质的分离，并且这些材料可以化学键合至柱内的颗粒或单块材料。粒径典型地是约1.5至30微米。孔径是50至300埃。柱的内径典型地是大约50微米至2.1毫米，柱长度是大约0.5厘米至25厘米，或者其它。流动相或洗脱液可以是纯溶剂，或两种或多种溶剂的混合物，可以含有另加的盐、酸和/或其它化学改性剂。基于一种或多种物理化学属性，包括大小、净电荷、疏水性、亲和力或其它物理化学属性，在柱上分离蛋白质。色谱分离法包括一种或多种离子交换、尺寸排阻、亲水相互作用色谱(HILIC)、疏水相互作用、亲和力、正相、或反相色谱法。

[0055] 纯化样品的其它方法可以包括但不限于：液相色谱、高效液相色谱(HPLC)、超高效液相色谱(UHPLC)、沉淀、固相提取、液-液提取、透析、亲和捕获、电泳、过滤、超过滤或其它本领域已知的合适的方法，这些方法用于纯化。

[0056] 已经描述了涉及在质谱分析之前利用HPLC进行样品清洗的各种方法。本领域技术人员可以选择适合用于本发明的HPLC仪器和柱。色谱柱典型地包括有利于在空间和时间上分离化学基团的介质(即填充材料)。介质可以包括细小颗粒。颗粒可以包括与不同化学基团相互作用从而有利于分离感兴趣的分析物的结合表面。一种合适的结合表面是疏水结合表面,例如烷基结合表面。烷基结合表面可以包括C₄、C₈或C₁₈结合的烷基团,优选C₁₈结合集团。色谱柱包括用于接收样品的入口,以及用于排除流出物的出口,所述流出物中包括分馏的(fractionated)样品。例如,可以将测试样品在入口处加入柱中,与溶剂或溶剂混合物一同洗脱,从出口排出。在另一例子中,连续采用一个以上柱子,或者作为2维色谱系统,其中测试样品在入口处加入第一柱中,从第二个柱中与溶剂或溶剂混合物一同洗脱,从出口排出。可以选择不同的溶剂模式以洗脱分析物。例如,可以采用斜坡模式、无斜坡模式或多型(即混合)模式执行液相色谱法。

[0057] 术语“质谱分析”或“MS”在此处是指基于其质量-电荷比或“ m/z ”(有时也称“Da/e”)对离子进行过滤、设陷阱、检测和测量的方法。通常,感兴趣的一种或多种分子例如微生物蛋白质被离子化,之后离子被引入质谱仪器,在其中由于电场、或磁场和电场的组合,离子在取决于质量(m 或Da)和电荷(z 或 e)的空间路径上通过。

[0058] 质谱仪250包括离子源,使分馏或未分馏样品的离子化,并获得带电分子以用于进一步分析。例如,可以通过电喷雾离子化(ESI)使样品离子化。其它离子化的技术包括但不限于:大气压化学离子化(APCI)、光离子化、电子离子化(EI)、化学离子化(CI)、快速原子轰击(FAB)/液体次级离子质谱分析(LSIMIS)、基质辅助激光解吸附离子化(MALDI)、场离子化、场解吸附、热喷雾/等离子体喷雾离子化和颗粒束离子化。本领域技术人员将理解,可以基于待测量的分析物、样品类型、检测器类型、正负模式的选择等选择离子化方法。

[0059] 样品离子化之后,对由此得到的带正电或负电的离子进行分析,以确定质量-电荷比(即, m/z)和信号强度。用于确定质量-电荷比的合适的分析仪包括四极分析仪、离子陷阱分析仪、傅立叶转换离子回旋共振(FTICR)分析仪、静电陷阱分析仪、扇形磁场分析仪和时间飞行分析仪。可以采用几种检测模式检测离子。例如,可以采用选择的离子(即,采用选择离子监测模式(SRM)),或者,可以采用选择的反应监测(SRM)或多反应监测(MRM)(MRM和SRM是基本相同的实验)来检测离子。还可以通过扫描质量分析仪检测离子,从而检测样品的所有离子。

[0060] 在一个实施例中,采用四极分析仪可以确定质量-电荷比。例如,在“四极”或“四极离子陷阱”仪器中,在振荡射频(RF)场中的离子所受到的力与RF信号的振幅、施加在电极之间的直流(DC)电势以及离子的 m/z 成比例。可以选择电压和振幅,使得只有具备特定 m/z 的离子穿过四极的长度,而其它所有离子被偏转。由此,四极仪器可以作为被注入仪器的离子的“质量过滤器”、“质量分离器”或离子透镜。

[0061] 通常采用“串联质谱”或“MS/MS”增强MS技术的分辨率,例如通过采用三重四极质谱仪。在该技术中,由感兴趣的分子产生的初级、或母体或前体离子可以在MS仪器中过滤,之后这些前体离子被裂解而产生一种或多种次级、或产物或片段离子,它们在第二MS程序中被分析。通过对前体离子的仔细选择,只有来自特定分析物的离子通过裂解腔(例如,碰撞室),其中与惰性气体的碰撞产生了这些产物离子。由于在给定的离子化/裂解条件下,能够以可重复的方式产生前体和产物离子,MS/MS技术可以作为一种极其有效的分析工具。例

如,离子选择或过滤与随后的裂解结合起来可以消除干扰物质,在复杂样品例如生物样品中尤其有用。

[0062] 在另一实施例中,采用混合质谱仪系统可以确定质荷比,所述系统包括静电离子陷阱质量分析仪,其具有高分辨率和准确的质量确定,例如Q-Exactive™质谱仪系统(Thermo Fisher Scientific),其含有四极质量分析仪和Orbitrap™质量分析仪。此处,离子经四极质量分析仪选择,之后进入设陷阱装置,在其中,给定的离子群被收集,碰撞冷却,并以高能量和精确的轨道喷射进入Orbitrap质量分析仪。或者,前体离子经四极质量分析仪选择,进入碰撞室,由此产生产物离子,之后产物离子通过设陷阱装置,在其中,给定离子群被收集,冷却碰撞,并以高能量和精确的轨道喷射进入Orbitrap质量分析仪。离子以与 $(z/m)^{1/2}$ 成比例的频率轴向振荡通过阱(trap),其中 z 是离子的电荷, m 是离子的质量。这些振荡离子的影像电流被检测,并采用傅里叶变换将其频域数据变换为质谱信息。瞬态收集时间越长,接下来的质谱数据的分辨率越高。可以获得高分辨率数据,其值超过200000,质量准确性达到5ppm(parts-per-million)或更好。

[0063] 例如,来自色谱柱的液体溶剂流(stream or flow)可能含有一种或多种感兴趣的分析物,其进入LC-MS/MS分析仪的加热雾化器界面,溶剂/分析物混合物变换为蒸汽。随着分析物进入气相,源自感兴趣的分析物的离子可以在液相中形成,之后通过ESI源的雾化或中性分析物和反应离子之间的反应,其被喷射进入气相。

[0064] 离子通过仪器的开口,并且在进入仪器之前通过一系列的透镜、四极、六极和类似装置。在一个实施例中,可以分析任何 m/z 比值的选定 m/z 窗口(例如3,5,10,20,30,40,50,100,1800或更多道尔顿范围的 m/z),以确定窗口内完整蛋白质的分子量。总体上,较小的 m/z 窗口尺寸能够提高信噪比。除了上述的 m/z 窗口大小,根据实验条件,可以在任何地方动态调整 m/z 窗口大小。在另一实施例中,来自窗口的预先确定的离子进入碰撞室,与中性气体分子(例如氩气、氮气等)碰撞并裂解。产生的片段离子进入质量分析仪,其中裂解的离子被分离,并前进至检测器。在其它实施例中,其它裂解过程可以包括但不限于:经红外多光子解离(IRMPD)的红外光子吸收,单一紫外线(UV)光子的吸收,经包括电子转移解离(ETD)的离子-离子反应,或不经历即刻裂解的电子转移产物离子的碰撞激活,电子捕获解离(ECD)。在示范的实施例中,解离方法是高能碰撞诱导的解离(HCD)。当离子与检测器碰撞时,它们产生模拟信号,其进一步变换为数字信号。

[0065] 所获得的数据被中继给计算机,其对电压和时间作图。所得到的质量色谱图类似于传统HPLC法产生的色谱图。可以通过计算色谱图的尖峰下的面积(如果有色谱尖峰的话)或者采用质谱的尖峰强度,来确定感兴趣分析物的浓度。通过现有技术中多种不同技术中的一种确定样品中感兴趣分析物(例如蛋白质)的浓度,包括外校正或内校正、相对定量、尖峰高或面积计数、标准添加、或其它任何本领域的已知方法。

[0066] A.微生物鉴定

[0067] I.微生物破碎和蛋白质溶解

[0068] 再次参见图1A,如步骤102中所示,怀疑含有一种或多种微生物的样品可以被破碎并处理以直接从样品(例如尿)获得微生物细胞,或可以用于分离纯的培养物。之后采用微生物细胞以产生蛋白质的可溶部分。该样品可以是怀疑含有一种或多种微生物的任何类型,包括但不限于:来自培养板的分离菌落;液体生长基质上的细胞;血、唾液、尿、粪便、痰、

伤口和体表拭子；食品和饮料；土壤、水、空气；环境和工业表面拭子。

[0069] 可以通过本领域公知的机械、化学、酶方法进行细胞破碎，上文参照图2对其进行了详细的描述。破碎之后，可以通过离心、过滤（人工或自动进行）或其它本领域已知的方法将样品的不溶部分（典型地，细胞壁材料、特定脂类、沉淀蛋白质和其它细胞组分）从溶液中除去。可以采用一个或多个计算机（见图2中的202和215）控制的机器人系统自动进行样品制备。所述机器人系统可以是更大系统的一部分，并且与其它装置或计算机相连。

[0070] 在一个例子中，采用1毫米的菌环从合适的培养板，例如OXOID™的胰酶大豆琼脂板（Thermo Fisher Scientific）表面收集其上活跃生长的大肠杆菌细胞。细胞悬浮于70%乙醇溶液中，其中采用的水是LC/MS级，处理几分钟之后，离心样品，并弃去上清液。然后采用含有2.5%三氟醋酸的乙腈：水（1:1）对细胞进行裂解，样品以14000转/分钟离心5分钟左右后，除去不溶组分。离心后，上清液被移至新管，可以采用离心浓缩机或在氮气流下按常规完全蒸发。分析前，样品复溶于2%乙腈、含有0.2%甲酸（当采用色谱时）的98%水中，或者复溶于含有2%甲酸的乙腈：水（1:1）中，用于流动注射或直接输入。复溶的样品经高分辨率质谱分析法进行直接分析，或者经高分辨率质谱分析法进行快速部分色谱分离和分析。

[0071] 在另一例子中，采用2毫米菌环从合适的培养板，例如OXOID™的胰酶大豆琼脂板（Thermo Fisher Scientific）表面收集约10毫克（湿重）其上活跃生长的细胞（大肠杆菌，木糖葡萄球菌，玫瑰色库克菌，巨大芽胞杆菌，包皮垢分支杆菌或其它）。细胞移至0.5毫升微离心管内，加入20微升含有25%乙腈、25%水、50%甲酸的溶液中；将吸液体积增加至40微升；对悬浮液剧烈地吸上吸下，直至细胞破碎，其表现为出现泡沫。然后加入180微升乙腈：水（1:1），所得到的溶液以14000转/分钟离心大约5分钟。去除上清液，根据需要进行稀释以用于直接输入或流动注射。

[0072] 在另一例子中，采用离心机从液体生长基，例如沙保罗氏液体培养基（OXOID™，Thermo Fisher Scientific）中收集白念珠菌细胞。用0.9%生理盐水冲洗三次将细胞从生长基中冲下并沉淀。之后可以用乙醇和甲基叔丁基醚（7:3）的混合物在室温下对细胞预处理10分钟或更少。通过离心来沉淀细胞，弃去上清液。可以采用包括大约70%甲酸、15%乙腈和15%水的混合物溶解细胞并使蛋白质溶解。不溶组分以14000转/分钟离心5分钟沉淀，将上清液移至干净小瓶或者离心管内，在色谱分析之前用含有0.2%甲酸的乙腈：水（2:98）进行稀释。当不进行色谱分析时，上清液按照以下方式稀释：调整溶剂溶度至乙腈：水（1:1），其中含有0.2-2%甲酸。除了乙腈，还可以采用甲醇。离心后，稀释后的上清液可以进行在线（in-line）固相提取，可以经过或不经过快速部分色谱分离和高分辨率质谱分析。或者，乙腈：水（1:1）的0.2-2%甲酸中的样品要么流动注射，要么直接输入质谱仪进行分析。

[0073] II. 样品脱盐、浓缩和色谱分离

[0074] 步骤102中微生物破碎产生的上清液含有完整蛋白质，可以对其进行进一步处理以对蛋白质脱盐和浓缩，如附图1A的步骤104中所示。在一个实施例中，采用自动固相提取/液相色谱样品引入界面系统以同时对完整蛋白质进行脱盐、浓缩和分离。所述系统300的简要示意图参见图3。在第一流路302中，系统300可以采用一次性的固相提取（SPE）盒304，该盒与泵306、流路管线308、第一开关阀310、第二开关阀312和电喷雾离子化（ESI）喷雾器314连接。SPE盒304是可调的，例如采用2%乙腈/0.2%甲酸水溶液（上样缓冲液）。之后，将图1A的步骤102中制备的样品从基本相同的溶液上样（loaded），例如采用反向流动通过SPE盒

304。之后SPE盒304用2个床 (bed) 体积的上样缓冲液清洗,以去除盐和其它污染物。清洗步骤之后,每个样品从SPE盒304中流出,其溶剂体积可以小至10纳升或更少,或者多至十几微升,以对完整蛋白质进行浓缩和优化以便传递至ESI喷雾器314和质谱仪316。

[0075] 在一个实施例中,在线SPE盒可以是聚丙烯头,例如Stage™头 (Thermo Fisher Scientific),其中含有的小体积二氧化硅吸附剂包含键合的C₄、C₈、C₁₈或其它固定在该头中的功能基团。在替换实施例中,可以采用聚合物吸附剂或螯合剂。床体积可以是约1微升至1毫升。该设备和方法非常适用于源自微生物细胞的复杂样品,这是因为,每个SPE盒仅使用一次,将一个样品至另一个的过载问题降至最低。

[0076] III. 离子化,质谱分析,氨基酸序列信息

[0077] 如图1A的步骤106所示,样品接受质谱分析。流出的蛋白质被离子化,例如被电喷雾离子化 (ESI) 或其它大气压或亚大气压的离子化技术来离子化,这些技术易于与液相色谱在线结合。对于ESI,基于游离N端、组氨酸、赖氨酸、精氨酸或序列中存在的其它带电氨基酸的数量,蛋白质积累多个电荷。所得到的质谱反映了来自相同蛋白质、表现为不同质量/电荷 (m/z) 值的多电荷离子 (“电荷状态的外壳 (envelope)”) 的分布。m/z比值是同一分析物从电喷雾离子过程获得不同电荷数量的结果。电荷状态的分布易于经单级或多级高分辨率质谱分析、通过由上至下的方法检测出样品是否包含完整蛋白质和/或其片段。可通过多种方法计算出蛋白质的分子量。其包括简单的方法,例如观察单电荷状态的相邻同位素之间的距离,采用源自相同蛋白质的几个相邻同位素未分辨尖峰的m/z比值以确定或计算,以及确定这些尖峰之间m/z的间隔距离。其它计算分子量的方法包括颠簸 (thrash) 算法和最大熵法。

[0078] 离子化之后,蛋白质通过质量分析仪进行分析。如步骤108和110所示,以全扫描高分辨MS模式在选择的m/z范围内对样品重复扫描。在一个实施例中,以全扫描高分辨MS模式在m/z是150至m/z是2000的范围内,在大约1秒内对样品重复扫描,以大约5ppm、3ppm、1ppm或更好的质量准确性对完整蛋白质进行质量测量。在该实施例中,源参数设置如下:喷雾电压=4千伏,毛细管温度=270摄氏度,源温度=60摄氏度。对于示例性的液相色谱流速是400微升/分钟,源鞘气体的流速是35 (任何单位),辅助气体的流速是5 (任何单位),源温度=60摄氏度。所得到的质量准确性足以提供蛋白质的元素组成信息 (例如,蛋白质中存在的碳、氮、氧、氢、硫或其它原子的数量)。该信息可以进一步用作算法的一部分以鉴定微生物。

[0079] 本公开中,术语“质量准确性”和“ppm”是指测量得到的量与实际真值的一致程度。在质谱分析测量离子质量或尤其是质荷比时,实验测量的质量和离子的真实质量之间的差值或误差根据下面的等式用ppm单位表示: $((\text{测量质量} - \text{真实质量}) / \text{真实质量}) \times 10^6 = \text{质量准确性 (ppm)}$ 。

[0080] 将分子的单独同位素的质量相加得到离子的真实质量,包括对离子电荷状态的任何校正。例如,含有两个氢1原子、一个氧16原子、电荷是+1的离子化水分子的真实质量是: $((1.007825 + 1.007825 + 15.994915) - 0.000549) = 18.010016$ 道尔顿。如果该离子的测量质量是18.010200道尔顿 (Da),则测量的准确性是 $((18.010200 \text{道尔顿} - 18.010016 \text{道尔顿}) / (18.010016 \text{道尔顿}) \times 10^6 = 10.2 \text{ppm}$ 。

[0081] 由于未知蛋白质、或任何源自生物学的或源自MSⁿ的蛋白质片段的质量测定准确性达到5ppm或更好,所以当搜索已知蛋白质数据库时,可以缩小所发现的候选者的数量。

[0082] 图4描述了通过直接输入对大肠杆菌提取物进行的全扫描电喷雾质谱。扫描范围是 m/z 是400至 m/z 是1800。如本申请中所述获取该提取物,不进行进一步的纯化或脱盐。除了一些小分子、小肽和脂类之外,尖峰主要代表多电荷的中至高质量蛋白质。该扫描提供质量控制信息,即该仪器工作正常,其信号稳定地用于进一步的详细分析。总分析时间是1秒。

[0083] 图4中所示的50道尔顿的窗口的质量分离见图5。扫描的质量范围是 m/z 是750至 m/z 是800。图中显示了多于9个的同位素分辨尖峰,表示9个不同蛋白质的不同电荷状态,其 m/z 比值是如下:759.4283(+18)、761.7664(+14)、766.8419(+12)、769.7618(+12)、771.5050(+10)、782.8381(+8)、788.1067(+10)、793.2172(+13)、795.5254(+12)。基于电荷状态特定同位素间隔,之后这些电荷状态变换为分子量数值。其产生以下分子量:13651.71、10735.79、9190.10、9237.14、7705.05、6254.70、7871.07、10311.82 和9546.30。可以实时对病原体分子量数据库搜索这些分子量,以便使潜在的病原体鉴定的检索数量减少。例如,50S核糖体蛋白质L27、类核相关蛋白质YbaB、50S核糖体蛋白质L17、整合宿主因子亚单元b、30S核糖体蛋白质S16、未表征蛋白质YehE和r50S核糖体蛋白质L31从该搜索中暂时鉴定,其中输入的数据来源于高分辨质谱分析,其具有非常高的测量质量准确性。

[0084] 在数据获得期间或之后可以实时进行鉴定过程。图1A的步骤110中限定的数据获得过程可以包括将蛋白质提取物直接输入或流动注射,并结合SPE清洗,如本申请中所述。关键因素是将实验获得的经计算的分子量与微生物/病原体数据库中的分子量匹配。当鉴定过程发生在数据获取期间时,针对定义的获取窗口所获得的高度精确的分子量信息与高度准确的分子量微生物/病原体数据库进行匹配。其实时地(几秒内)有效减少了可能的微生物鉴定候选者的数量。

[0085] 在本发明的另一实施例中,不仅通过如上所述的它们的分子量,还采用关于它们独有的氨基酸序列的数据来分析蛋白质,之后将所述氨基酸序列数据与含有微生物来源的已知氨基酸序列的参考数据库进行比较。在该实施例中,确定完整蛋白质的分子量,经多级质谱分析获得蛋白质序列信息。这在图1A的步骤112中示出。采用步骤108和110确定的分子量允许串联质谱分析的随后步骤明确鉴定感兴趣的微生物/病原体。在获取数据时,可以从同位素分辨尖峰的同位素之间的距离直接计算分子量,或者通过确定较高质量蛋白质(尖峰不是可同位素分辨的)的质心和 m/z 间隔来计算分子量。

[0086] 典型地,被选择的蛋白质电荷状态是质量分离的,并且过多能量沉积于蛋白质前体离子群,从而作为与惰性气体(原子的或分子的)的碰撞结果或通过本领域其它已知的方法,诱发形成序列特定的片段离子。该能量沉积过程可以源自低或高能量碰撞激发(CA)解离事件、经红外多光子解离(IRMPD)的红外光子吸收、单一UV光子的吸收,经包括电子转移解离(ETD)或电子转移产物离子的碰撞激发(其不立即发生裂解)的离子-离子反应、电子捕获解离(ECD),或其它。

[0087] 在示例性实施例中,解离方法是低或高能量碰撞诱发解离(CID),其中规范化的碰撞能量范围是5%至高达50%(规范化碰撞能量,任何单位)。前体离子典型地自动选自任何给定蛋白质所产生的电荷状态分布中的最强尖峰。

[0088] 图6显示了上文参照图4和5所描述的 m/z 是750至 m/z 是800的50道尔顿的窗口的串联质谱扫描。图5所列的所有前体离子通过Q Exactive高分辨/质量准确性质谱仪上的HCD室而受到碰撞诱导的解离(CID)。规范化的碰撞能量设为18%,分辨率是35000。对于30个最

显著尖峰,所得到的片段离子的电荷状态是+1至+9。这些尖峰对应于源自于图5所示的经标记的(通过电荷状态)前体离子代表组的片段离子。之后这些片段离子的身份与上述所列的前体进行匹配,但是可以用非常低的信噪比与前体离子相关联。该匹配过程还可以实时进行,用于将病原体的鉴定缩小为大肠杆菌。

[0089] 然而,在本发明的一个实施例中,选择给定蛋白质的更高电荷状态离子进行CID。其通过图7所示的数据支持。此处,所得到的产物离子的分辨率是35000,质量准确性是3ppm或更好。所示蛋白质被鉴定为来自大肠杆菌氨比西林耐受株型的DNA结合蛋白质H-ns。碰撞诱导解离(CID)法使完整蛋白质在前体 m/z 比值是811.9018(+19的电荷状态,分子量大约是15.4千道尔顿)处的碎片。通过选择该前体离子,所得到的源自完整蛋白质的片段(b-y系列离子)可以通过优选的切割位点鉴定。在该例中, m/z 比值是813.82440,904.13885和1017.03210是 b_{70} 离子,其在天冬氨酸(D)和脯氨酸残基(P)之间切割。其它 m/z 是742.90741和1077.57056的突出尖峰在谷氨酸(E)的C端侧切割,从而产生 b_{26} 和 b_{27} 离子。该算法的片段匹配部分优先对强度更高的片段离子进行权重,从而快速精确地鉴定蛋白质。通过将该信息与完整蛋白质的分子量结合,蛋白质可以被鉴定,病原体可以在种级上鉴定,在很多情况下是株型级。

[0090] 在一个实施例中,还可以产生序列标签信息以确定蛋白质的鉴定。计算机软件程序检查产物离子质谱来得到明显序列标签。序列标签是产物离子质谱中主要片段离子之间的质量差别所产生的两个或多个氨基酸短串。该序列标签和其在肽或蛋白质中相对于氨基端和羧基端的位置而用作在数据库搜索中的限制条件。与分子量结合使用,序列标签信息提供了高可信度的蛋白质鉴定。由于原核和真核细胞所产生的蛋白质经历了N端甲硫氨酸、信号肽的丢失,或其它翻译后修饰事件(modification events),采用计算以考虑这些修饰。该原理也在图7中有显示。图7显示了一系列单电荷y型离子,其对应于序列标签I/L I/L F D。其与15.4千道尔顿的分子量结合可用于鉴定蛋白质。此外,所观察到的强度最大的片段是在天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的C端侧、脯氨酸(P)的N端侧发生切割。这些典型地在蛋白质CID质谱中观察到的优先切割,通过基于强度对这些尖峰进行权重,可用于加快数据库的搜索过程。

[0091] 另外,例如ProSight PTM、MS-Align、UStag、MS-Topdown、PIITA和OMMSA(开放质谱搜索引擎(Open Mass Spectrometry Search Engine))的程序可以用于鉴定源自于由上至下的质谱分析实验的完整蛋白质。通过几个不同数据库搜索引擎中的一个,对相应产物离子的质谱分析而得的更小肽和蛋白质片段进行鉴定,所述引擎包括基于相关性(Sequest)、基于可能性(Mascot)、预期值计算程序(!Xtandem)或其它本领域已知的方法。之后采用上述方法而进行的蛋白质鉴定用于鉴定微生物的属、种、亚种、株型和/或血清型。同样的蛋白质鉴定流程方法可以用于毒力因子、耐受性标记物和其它相关标记物所特定的蛋白质。

[0092] 在本发明的另一实施例中,串联质谱分析用于产生肽或蛋白质的片段离子,所得到的质谱与多级质谱参考数据库进行匹配从而鉴定微生物。这种数据库还可以包括色谱保留时间信息,包括经任何翻译后修饰的蛋白质的质量,肽或蛋白质片段的质量,元素组成(C、H、N、O、S或其它原子),总的尖峰强度或与优先切割相关的尖峰强度,以及源自已知微生物的序列标签信息。

[0093] IV. 对属-种级的数据分析和鉴定

[0094] 色谱保留时间、质量、强度、元素组成、氨基酸组成和蛋白质序列信息中的一种或多种可以用于鉴定样品中存在的微生物。鉴定基于与已知参考数据库进行比较的MS和MSⁿ数据、以及上述的任何参数。色谱保留时间可以是绝对的,通过采用限定的柱和色谱条件集合对样品中的组分或组分群进行分离而测量得到,或者可以是相对于待分析样品中存在的或者加入的其它一种或多种组分的保留时间的相对值。

[0095] 为样品中未知微生物提供初始ID(身份鉴定)的算法步骤可以在少于一分钟内完成。鉴定过程可以在色谱分离和获取数据期间、或者在数据获取和/或色谱分离之后实时进行。在数据获取期间,诸如保留时间、质荷比(m/z)、强度信息的参数被存储在系统板上存储器。当鉴定过程发生在色谱分离/数据获取步骤期间,基于MS/MS(串联质谱分析)原理和通过鉴定算法进行分子量匹配,对原始数据进行实时处理。鉴定算法涉及基于保留时间、质量、元素组成、氨基酸序列和强度将实验尖峰与参考数据库进行匹配。一旦获取足够的数据以鉴定感兴趣的微生物,可以执行鉴定的确认和/或毒力因子和耐受性标记物的检测。对于MS/MS过程,基于微生物的鉴定实时选择确认尖峰。MS/MS过程自动进行,根据MS/MS数据库搜索所得到结果,该数据库含有已知微生物的序列信息。

[0096] 或者,采用另一算法可以直接鉴定尖峰。同样的原理适用于对特定微生物确定毒力因子或耐受性标记物。一旦获取所有数据,基于MS的信息和基于MS/MS的蛋白质/微生物鉴定信息被实时更新,并被用于评分处理,其中所述评分处理通过采用特别为此目的而研发的算法而执行。

[0097] 现在参照图1B,图示了合适的算法130的一个例子,其基于步骤102至112(图1A)、步骤110以及112(图1A)所获得的数据,尤其可以用于鉴定微生物。该算法包括获得质谱数据以确定分子量的步骤132。其可以在附图1A的步骤110中完成。之后算法包括尖峰检测的步骤134,以及确定是否存在可分辨同位素的(isotopically resolved)尖峰的步骤136。如果尖峰是可分辨同位素的,则该算法在步骤142中计算与尖峰相关的分子量。如果尖峰不是可分辨同位素的,则算法包括检查其它未分辨的尖峰的存在步骤,所述未分辨的尖峰可分配给相同电荷状态外壳。如果有其它尖峰,则根据步骤142可以计算分子量。如果在相同质谱中没有其它尖峰,则算法在显示相邻质量范围的质谱内寻找候选者。如果没有发现尖峰,则从步骤140中将原始尖峰从分析中去除。

[0098] 基于计算得到的分子量(步骤142),算法130可以创建分子量搜索列表(步骤144),并在分子量/微生物数据库中搜索该分子量搜索列表(步骤146)。算法130在步骤148中询问是否所有分子量匹配。如果分子量不匹配,则算法130为后MS/MS匹配创建未知列表(步骤150),并创建目标鉴定列表(步骤152)。如果分子量匹配,则该算法创建目标鉴定列表(步骤152)。

[0099] 算法130能够采用之前所得到的关于样品中蛋白质分子量的信息进行随后的分析,从而改善对微生物身份的鉴定。在步骤154中,该算法可以指导质谱仪对在步骤132中获得的尖峰执行串联质谱分析。之后该算法在步骤156中由步骤152的目标鉴定列表创建串联MS片段数据库,之后在步骤158中将步骤154中的片段与步骤156中的数据库进行匹配。这些数据(步骤152和158的)被用于在步骤160中鉴定微生物。

[0100] 之后算法130在步骤162中检查其是否与单一ID进行匹配。如果在步骤162中存在单一匹配,则算法130包括任选步骤,用于将步骤150所生成的列表中的质量与数据库注释

中的可能翻译后修饰和/或错误进行匹配。可以对样品进行如下文步骤172中所述的进一步分析。如果步骤162中的匹配不是对单一的ID进行的,则算法重复步骤132至160,并在步骤132中采用不同的质量范围。如果匹配与步骤162中获得的相同,则对样品进行如下文步骤172中所述的进一步分析。如果匹配与步骤162中获得的相同,则样品被标记以供进一步分析(步骤168)。

[0101] 所有的鉴定过程可以全部自动进行,并在给定的数据获取过程中进行。或者,这些步骤也可以在获取后进行。微生物鉴定的结果可以以用户友好的形式提供,例如提供给远程装置、移动装置和/或中央计算机系统,这在样品操作之前可以预先选择。

[0102] 可以采用其它方法将高分辨率/质量准确性ESI数据与参考数据库中的质谱匹配。所述方法包括但不限于基于线性、随机化和神经网络模式匹配的方法。电喷雾离子化可以对来自任何给定微生物的更多数量蛋白质进行检测,从而基于模式匹配的方法的特异性相对于基于MALDI的技术显著改善。基于LC-MS和MS/MS的本发明方法可得到的增多的信息,其可以对微生物在株型或亚种级进行更加详细的表征,从而可以将假阳性率降至最低。例如,单一样品中存在的两个或多个不同种、株型或亚种对于之前基于MALDI-TOF质谱的分析提出了挑战。而本发明的MS和MS/MS (MSⁿ) 组合方法的优势在于:任何独特蛋白质可用于检查鉴定的准确性。数据库可以包括关于种的信息,能够基于单一蛋白质的存在进行确定无疑的鉴定。需要进一步检查的种可以单独分析。

[0103] B. 特定特征的目标分析

[0104] 当在属/种级进行鉴定时,样品可以选择性地再分析,以获得详细信息,其中所述详细信息包括但不限于与分型(株型和/或血清型)、毒力、或抗生素耐受性和/或敏感性相关的信息。基于第一分析期间鉴定的微生物的身份,可以对一种或多种特定蛋白质进行第二分析(再分析)。这在附图1A中用箭头114表示,其显示来自第一分析的信息用于指导第二分析。

[0105] 基于图1A的步骤104至112的事件序列所获得的属或种的鉴定,仪器软件可以采用仪器高级编程接口(Instrument Advanced Programming Interface) (I-API) 编码的软件。I-API软件(Thermo Fisher Scientific)是数据获取指导主控制程序,其可以对决定逻辑进行编程,用于接下来的实时获取步骤,同时对样品进行分析,并且仍然可以随时对分析物进行进一步分析。该软件是.NET兼容事件驱动软件,其实际上没有给分析增加开销时间。由于软件系统具有非同步控制,多个“倾听者”可以对单一事件或触发进行响应。可以采用任何种类的计算机语言,包括C编程语言,visual basic和Python的所有演变,这里仅仅例举一小部分。例如,软件用于驱动之前描述的分子量数据库减少处理,并在数据获取期间执行。在该部分描述的方法用于触发进行分型、毒力检测和耐受性标记物鉴定的选择试验。

[0106] 对于病原体大肠杆菌的例子,该软件可以立即建立快速扫描,以检测适当表达的毒力、耐受性或分型标记物。对于大肠杆菌,其可以包括粘附性、侵入性、活动性/趋药性、毒力、抗吞噬蛋白质/分子,和抑制免疫反应涉及的蛋白质。可以采用本申请以下部分所述的快速部分分离质谱(FPCS-MS)和目标串联质谱对其进行监测。

[0107] I. 固相提取

[0108] 参见图1A的步骤116,从怀疑含有一种或多种微生物的样品中提取出的可溶蛋白质(与上述的用于鉴定目的的相同提取物,或者从相同样品制备的另一提取物)经第二注

入,以进行第二固相提取(SPE)程序。

[0109] 再次参见图3,对于第二SPE程序,系统300可以包括第二流路318,第二流路318可用于将SPE盒320经流体管道322、第一开关阀326、第二开关阀328和电喷雾离子化(ESI)喷雾器314与色谱柱324相连。上述的SPE盒320与图1A的步骤104相关。首先,采用例如100%甲醇或乙腈或其它溶剂的合适的组合,之后采用2%乙腈/0.2%甲酸水溶液(上样缓冲液),对SPE盒320进行调节。接下来,将样品上样,采用基本相同的溶液,采用反向流动通过SPE盒320。SPE盒320可以用2或更多床体积的上样缓冲液或其它LC/MS适用的缓冲液清洗,以除去盐和其它污染物。

[0110] 清洗步骤之后,样品可以从SPE盒中洗脱,其溶剂体积可以小至10纳升或更少,或十几微升,以浓缩和优化完整蛋白质从而用于传递至色谱柱。之后SPE盒与色谱柱324流体连接,对源自微生物细胞的完整蛋白质进行快速部分色谱分离。

[0111] II.快速部分色谱分离质谱分析(FPCS-MS)

[0112] 参照图1A的步骤118,样品经过部分色谱分离,之后进行质谱分析。通常,进行FPCS-MS时,含有不同有机和无机分析物(小有机分子、蛋白质和其天然存在的片段、脂类、核酸、多糖、脂蛋白质等)的复杂混合物的微生物细胞粗提物被上样至色谱柱,进行色谱分析。然而,与采用斜坡(gradient)分别洗脱每个分析物(理想地,每个色谱尖峰一个分析物)相反,故意加速该斜坡至在大约8分钟或更少、优选5分钟或更少内基本没有色谱尖峰,而不是在长得多的、需要获得基线分离的运行时间内。相反,根据它们的特性和采用的色谱类型(反相,HILIC等),故意使许多分析物在任何给定时间从柱中共同洗脱。还可以通过本领域技术人员知晓的其它方法执行部分或不完全分离,包括但不限于:采用流动相溶剂和/或改性剂以减少化合物在柱上的保留,选择固定相介质(包括粒径、孔径等)以减少柱上化合物的保留,以较高流速运行色谱系统,以升高的温度运行色谱系统,或选择不同的色谱分离模式(即反相、尺寸排阻等)。

[0113] 由于在整个斜坡上基本没有色谱尖峰,关于混合物中的分析物的所有信息基本都来自质谱。基本上,源自色谱图的唯一相关信息是从柱中洗脱的时间。所记录的每个质谱代表接下来在质谱仪中离子化、分离并检测的共同洗脱分析物子集。由于所有共同洗脱的分析物同时离子化,它们受到混合物中离子化抑制的已知效应,该效应来自但不限于:(1)电荷的竞争和(2)含量少的分析物的信号抑制。尽管离子化抑制效应对于许多质谱法来说通常被认为是“不希望的”,但是在FPCS-MS中,这些效应有利于分析。然而,由于离子化抑制的效应/含量多抑制含量少的效应,在质谱中记录了来自数量显著减少的蛋白质的信号。

[0114] 图11A-11C图示了在34摄氏度下,在Oxoid原装胰酶大豆琼脂上生长20小时的各种微生物的FPCS-MA总离子电流图谱。(A)一大肠杆菌ATCC 8739;(B)一鹌鹑肠球菌ATCC 700425;(C)一枯草芽孢杆菌斯皮兹仁亚种ATCC 6633。关于样品中分析物的总信息由整个色谱实验中从每个质谱提取的数据中收集,由此代表所有共洗脱的分析物“集”。由于几乎没有色谱尖峰(例如,在5分钟斜坡中3-5个宽尖峰,如图11A-11C),所有必需信息源自质谱(m/z ,强度),来自液相色谱(LC)的唯一信息是分析物“集”的共洗脱时间(如上所述,由于离子化/分离效应,原始混合物组分中只有一些在质谱中表示出来)。

[0115] FPCS-MS要求无高流速的特殊柱、或小柱或非寻常形状的柱(例如,V型柱),因此通常称为“弹道色谱”或“弹道斜坡”。FPCS-MS采用的柱可以是标准的色谱柱。例如,柱的长度

可以是20毫米、30毫米、50毫米、100毫米、150毫米、250毫米等,和/或这类柱的内径可以是2.1毫米、1毫米、500微米、150微米、75微米等。粒径和孔径也可以是本领域标准的。

[0116] FPCS-MS中采用的流速对于所采用的柱类型来说是标准的。例如,流速可以是900微升/分钟、400微升/分钟、100微升/分钟、30微升/分钟、200纳升/分钟等。

[0117] 通过改变色谱条件(柱大小和化学性质、粒径和孔径、流动相和流动相改性剂)、色谱类型、以及复杂样品的离线分馏(其中单独部分仍然留在复杂混合物中),可以关注原始复杂混合物的非常不同的组分集。

[0118] 即使少至仅仅通过一个质谱仪扫描,共洗脱分析物的质谱也可以被记录,因此,能够获得的关于混合物中分析物的信息非常丰富,如图12所示。

[0119] 结合起来看,采用静电离子陷阱(例如Q-Exactive、Exactive质谱仪(Thermo Fisher Scientific)或类似质谱仪的一部分)而得到的极高分辨率和质量准确性,为例如毒力因子、耐抗生素和/或抗生素敏感性的生物标记物、株型的分化等的发现和目标分析提供了强有力的工具。

[0120] 总体来说,FPCS-MS提供了快速分析,使设定时间期间内可分析的样品数量达到最大,同时提供了关于样品的必要信息。

[0121] 在优选实施例中,对于采用的色谱柱,反相色谱分离中的流动相组合物以快得多的方式前行,使得分子量差别很大的蛋白质一起从色谱柱中洗脱。

[0122] 色谱柱中的固定相可以是多孔或无孔二氧化硅、或琼脂糖颗粒、或在柱内聚合或其它方式形成的整块材料。固定相可以涂覆有适当材料,例如C₁₈、C₈、C₄或另一合适的衍生物,以有利于蛋白质的分离,该材料可以化学结合至柱内的颗粒或整料。粒径典型地是大约1.5至30微米。孔径可以是50至300埃。柱内径典型地是大约50微米至2.1毫米,柱长度是大约0.5厘米至15厘米及以上。流动相或者洗脱剂可以是纯溶剂,或两种或多种溶剂的混合物,可以含有添加的盐、酸和/或其它化学改性剂。基于一种或多种物理化学属性,包括大小、净电荷、疏水性、亲合力或其它物理化学属性,蛋白质在该柱上、或者两个顺序连接或平行连接的柱上分离。色谱分离法包括一个或多个离子交换、尺寸排阻、疏水交互作用、亲合力、正相、反相或其它色谱法。

[0123] 在一个实施例中,反相色谱分离在50毫米×2.1毫米内径(ID)色谱柱上进行,其内部填充1.9微米的颗粒,孔径是175埃(C₁₈固定相),采用以下两种流动相:流速是400微升/分钟的0.2%甲酸水溶液(流动相A)和0.2%甲酸的乙腈溶液(流动相B)。在2、5或8分钟内,流动相B在流动相A中的斜坡是2-80%,以此进行分离。

[0124] 为了适应快速分析和样品周转时间,在本发明的一个实施例中,以大于8分钟或更低来实现所述斜坡。该压缩的斜坡模式使得分子量差别很大的蛋白质紧密地一起洗脱。采用该实施例,可以检测质量至70千道尔顿的蛋白质。该方法的一个显著优势在于,从较大质量范围得到改善的检测特异性。基于ESI/MS方法的质量范围显著超过MALDI方法,其实际上限是大约是12-15千道尔顿的质量,另外,通常在MALDI谱中观察到的所有蛋白质均在ESI/MS质谱中被发现。

[0125] 在其它实施例中,内径0.32毫米或更小并填充有C₄固定相的色谱柱,采用位于流动相A(具有0.2%甲酸的水)中、斜坡是20-60%的流动相B(具有0.2%甲酸的乙腈),流速大约是10微升/分钟。色谱分离的斜坡洗脱时间可以是大约10分钟至20分钟,之后具有短暂的

再平衡时间,其通常小于分离时间。

[0126] III. 离子化和质谱分析

[0127] 参见图1A的步骤120,如本公开其它处详细描述,样品可以离子化并接受质谱分析。参见图8A-8E,来自地衣芽孢杆菌、白假丝酵母菌、大肠杆菌、玫瑰考克氏菌、木糖葡萄球菌和耻垢分枝杆菌的蛋白质提取物经上述FPCS-MS程序部分分离。在5厘米×2.1毫米内径柱中进行分离,该柱中充填有Hypersil Gold C₁₈类柱,粒径是1.9微米,孔径是170埃。溶剂A由100%水和0.2%甲酸组成,溶剂B由100%乙腈和0.2%甲酸组成。起始条件是98%A和2%B,流速是400微升/分钟,柱温度是40摄氏度。采用与全扫描分析关联的前三个最强尖峰的数据依赖分析,来执行串联质谱分析。经过MS/MS的物质被放置在动态排阻表中20秒种。得到的串联质谱被3.0版本Prosight M软件搜索。

[0128] 图8A-8E所示的数据显示FPCS-MS对跨越不同微生物种属的大范围微生物起作用。此外,应当认识到,本公开描述的FPCS-MS程序可以进行图1A步骤116-122的第二分析程序,与对于不同微生物采用特定斜坡以及在某些情况下采用特定流动相的程序相比,其快得多。类似地,由于本公开所述的程序不依赖于对混合物组分的基线色谱分离,所以斜坡可以进行得快得多(例如5分钟vs.30分钟,或vs.90分钟)。本发明所描述方法缺乏基线分离,当组分从柱中流出时被挤在一起,这实际上是一个优点。例如,如上所述,蛋白质子集的被追共同洗脱导致混合物的离子化被抑制。尽管离子抑制通常被认为是不利的,但是在这里,由于在所记录的质谱中,信号仅来自最能离子化和丰富的蛋白质,所以离子抑制具有简化从柱中流出的复杂混合物的离子谱的效果。

[0129] IV. 株型分型

[0130] 如图1A的步骤122所示,给定株型或血清型的特定蛋白质可以用于对单独分离物进行分型。微生物分离物内的变异通常是全基因的删除和/或插入的结果。因此,不同株型可能潜在地缺乏或获得数百个株型特异性蛋白质,该变异可以提供独特的差别分型系统。

[0131] 在一个例子中,采用本发明的方法对十二株型大肠杆菌进行分析。结合十二个菌株型中每一个中的35.4千道尔顿蛋白质的变异,本发明相对于使用常规MALDI法能够检测更多数量、更高分子量的蛋白质并具有更好质量准确性的能力得到了测试。如表1所示,五种不同形式的质量大约是35千道尔顿的蛋白质被检测。

[0132]

大肠杆菌 ATCC 菌株

[0133]

共有蛋白质质量 (Da)	11775	35218	4157	14948	8739	33876	43888	51446	10536	11229	35421	29194
35167	✓	✓	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
35176	---	---	✓	✓	✓	✓	✓	✓	---	---	---	---
35413	---	---	---	---	---	---	---	---	✓	---	---	---
35426	---	---	---	---	---	---	---	---	---	✓	---	---
35497	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	✓	✓

[0134] 表1

[0135] 从表1可以看出,根据该共有蛋白质,大肠杆菌的菌株型可以被分组,由于氨基酸序列的差异,该共有蛋白质具有不同的质量。该蛋白质在ATCC 10536中分子量(MW)是35413道尔顿,在ATCC 11229中其MW是35426道尔顿,在两个菌株型(ATCC 35421和ATCC 29194)中该蛋白质的MW是35497道尔顿。类似地,当从另外两株型即ATCC11775和ATCC35218中分离出来时,该蛋白质的MW是35167道尔顿,在其它五株型中MW是35176道尔顿。在十二个大肠杆菌ATCC菌株型中,在相同的保留时间检测该蛋白质,以表明根据本发明的一个实施例,本发明可以用于区分亲缘关系密切的微生物菌株型。该质谱还含有在不同菌株间存在差异的其它蛋白质(要么是氨基酸序列变化的相同蛋白质,要么是不同菌株型的不同蛋白质)。当对菌株型进行分型时,作为鉴定程序一部分的多个蛋白质检测、以及串联质谱分析的采用,提供了准确的结果和可信度。

[0136] V. 毒力因子和耐受性机制的表征

[0137] 还可以采用第二分析,以鉴定被鉴定的微生物中存在的毒力因子或抗生素耐受性和/或敏感性标记物。该分析可以要求或不要求样品的前处理,其中所述前处理例如是:短暂暴露于一种或多种抗生素或其它应激条件(例如温度、一种或多种营养物的缺乏、铁缺乏、铜暴露等)以诱导与耐受性、敏感性或毒力相关的蛋白质。对于毒力因子和/或耐受性标记物的分析,以目标MS/MS模式(产物离子扫描)运行质谱仪,以检测已知毒力因子或耐受性标记物。

[0138] 该原理显示在图9A-9D中。在图9A-9D中,大肠杆菌(ATCC 35218)的抗生素耐受株型在存在和不存在抗生素的情况下,在37摄氏度下生长于Oxoid马-欣二氏琼脂(Thermo Fisher Scientific)18小时。在图9A中,细胞在有苯甲异恶唑青霉素的情况下生长;在图9B中,细胞在有乙氧萘青霉素的情况下生长;在图9C中,细胞在有青霉素的情况下生长;以及在9D中,细菌在有阿莫西林的情况下生长。在每个例子中,有框的区域表示在质谱中观察到显著改变的色谱部分,所述质谱是从来自经抗生素处理和未经处理的细胞获得。在该质谱实验中,显示了蛋白质表达的改变。然而,来自抗生素暴露的改变可以包括蛋白质表达、脂类以及小分子的单独改变或结合改变,以指示抗生素耐受性。

[0139] 在与抗生素一起短暂培养约10分钟或更短之后,可以检测特定耐受性、敏感性或

毒力标记物。进一步,耐受性标记物和/或毒力因子的分析可以是定量的。标记物信息有助于病理分型和微生物的表征,以便用于病人治疗或者收集流行病学信息。

[0140] 在本发明的一个实施例中,可以采用由上至下的蛋白质组学分析,以研究不同形式的耐受性标记物, β -内酰胺酶。多个 β -内酰胺酶类型(头孢菌素酶(AmpC)、广谱 β -内酰胺酶(ESBL)、产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌酶(KPC)等)可以存在于同一细胞内,从而在筛选(screening)和确认表型测试中发生错误。耐受性标记物信息可以用于校验和校正常规表型易感性结果。例如,膜孔蛋白质的改变和/或AmpC过表达可以模拟ESBL的表型。KPC β -内酰胺酶的存在掩盖了ESBL表型。采用本发明由上至下的方法可以鉴定这些蛋白质,这是因为,MS/MS方法能够检测完整蛋白质的氨基酸序列中的任何改变或替代。

[0141] 直接与蛋白质组学实验室通常采用的传统由下至上的程序相比,进一步强化了本发明由上至下方法的优点。举例来说,如果分析之前有机物的完整DNA序列是已知的,则可以判断该 β -内酰胺酶是否可以被表达。如果 β -内酰胺酶确实被表达了,则与该酶有关的一种或多种肽就有机会在由下至上的蛋白质组学实验中确定。如果鉴定出的肽是1000种已知 β -内酰胺酶变种中的某一个 β -内酰胺酶所特有的,则可以毫无疑问地说该特定型被确认。然而,所检测和鉴定的肽可能碰巧是许多不同 β -内酰胺酶变种所共有的。采用由下至上方法,如果不是不可能的话,甚至区分两个大肠杆菌菌株型(其中在这两个菌株型中, β -内酰胺酶变体的一些氨基酸例如两种氨基酸是不同的)都受限制。

[0142] 在本发明的另一实施例中,可以采用耐药性标记物的独特形式,例如 β -内酰胺酶,来促进给定微生物的鉴定。例如,对跨越所有已知微生物的特定扩展谱 β -内酰胺酶(ESBL)的直接比较显示:只有两个物种具有100%同源性(homology),即绿脓假单胞菌和鲍曼不动杆菌。如果特定ESBL被表达和检测到,则微生物鉴定将缩窄至两种微生物,甚至不用考虑任何其它蛋白质。一种或多种蛋白质的鉴定足以确认每个的鉴定。

[0143] 另一例子,可以针对所有已知序列搜索大肠杆菌特定的共有变体 β -内酰胺酶,以寻找相似性。然而,该酶的细微修饰产生许多不同微生物共有的变体。大肠杆菌特定的 β -内酰胺酶可以用于区分大肠杆菌和志贺氏杆菌。应当注意的是:弗累克斯纳氏杆菌和痢疾志贺氏菌的 β -内酰胺酶含有包括286个氨基酸的 β -内酰胺酶,而这是在大肠杆菌 β -内酰胺酶中发现的数量;然而,志贺氏杆菌的 β -内酰胺酶的序列在一个氨基酸上不同(丝氨酸被甘氨酸置换),这足以精确鉴定该微生物。

[0144] 对于包括微生物混合物的样品,耐受性标记物序列所提供的判断信息可以用于确定表达每个抗生素耐受性标记物的微生物。其它能够提供有用信息的耐受性标记物包括但不限于:DNA旋转酶、aminoglycosidases、外排泵(efflux pumps)(信号鉴定颗粒A(SrpA)和膜融合蛋白(MFP))、涉及叶酸代谢的蛋白质、以及核糖体核糖核酸(rRNA)结合的蛋白质。

[0145] 在本发明的另一实施例中,靶蛋白质的特定标记物组(panels)可以用于确定微生物的身份。这些组可能需要监测作为时间函数的特定蛋白质的强度图。采用单级四极、并跟随一系列离子转换装置、低能量碰撞室、C陷阱、HCD室和轨道离子阱质量分析仪的混合串联质谱仪,可以用于鉴定靶蛋白质。通过对完整蛋白质的MS/MS分析完成蛋白质鉴定,并针对减少的、仅含有与特定微生物或微生物组相关的蛋白质的微生物蛋白质组数据库进行搜索。

[0146] 该原理见图10。表征被鉴定的病原体的一部分是检查耐受性标记物、毒力因子、株

型分型和抗生素敏感性对患者恢复结果的潜在影响。除了经全扫描或选择的离子监测对靶进行鉴定外,在某些情况下需要定量分析,以确定毒力因子(例如粘附性、磷酸酶和分泌性门冬氨酸蛋白质酶)的水平是否足以影响患者的恢复结果。在图10中显示了,从源自白假丝酵母菌的四个不同蛋白质提取的离子图谱的高分辨率/质量准确性数据。这些离子的 m/z 比值是539.68431 (+12)、698.09351 (+6)、698.99127 (+10) 和703.70038 (+20),如插图所示,在跨越3.5至8分钟的保留时间范围内,对应于质量是6.46、7.27、6.97和14.0千道尔顿的蛋白质。采用外标准方法或内标准方法、标准添加、或相对定量方法,可以实现定量分析。例子包括采用免标记技术、经选择的反应监测、在线光度法、代谢标记或化学标记。与采用解析(resolved)或未解析的同位素簇针对给定蛋白质的每个电荷状态而获得的值一起,尖峰面积或高度可用于量的计算。

[0147] 在不偏离其精神或本质特征的情况下,本发明还实施为其它特定形式。所描述的实施例在所有方面仅能理解为描述性的,而非限制性的。因此,本发明的范围由所附权利要求而不是之前描述所限定。在权利要求等价的意义上和范围内提出的所有改变均包含在所述范围内。

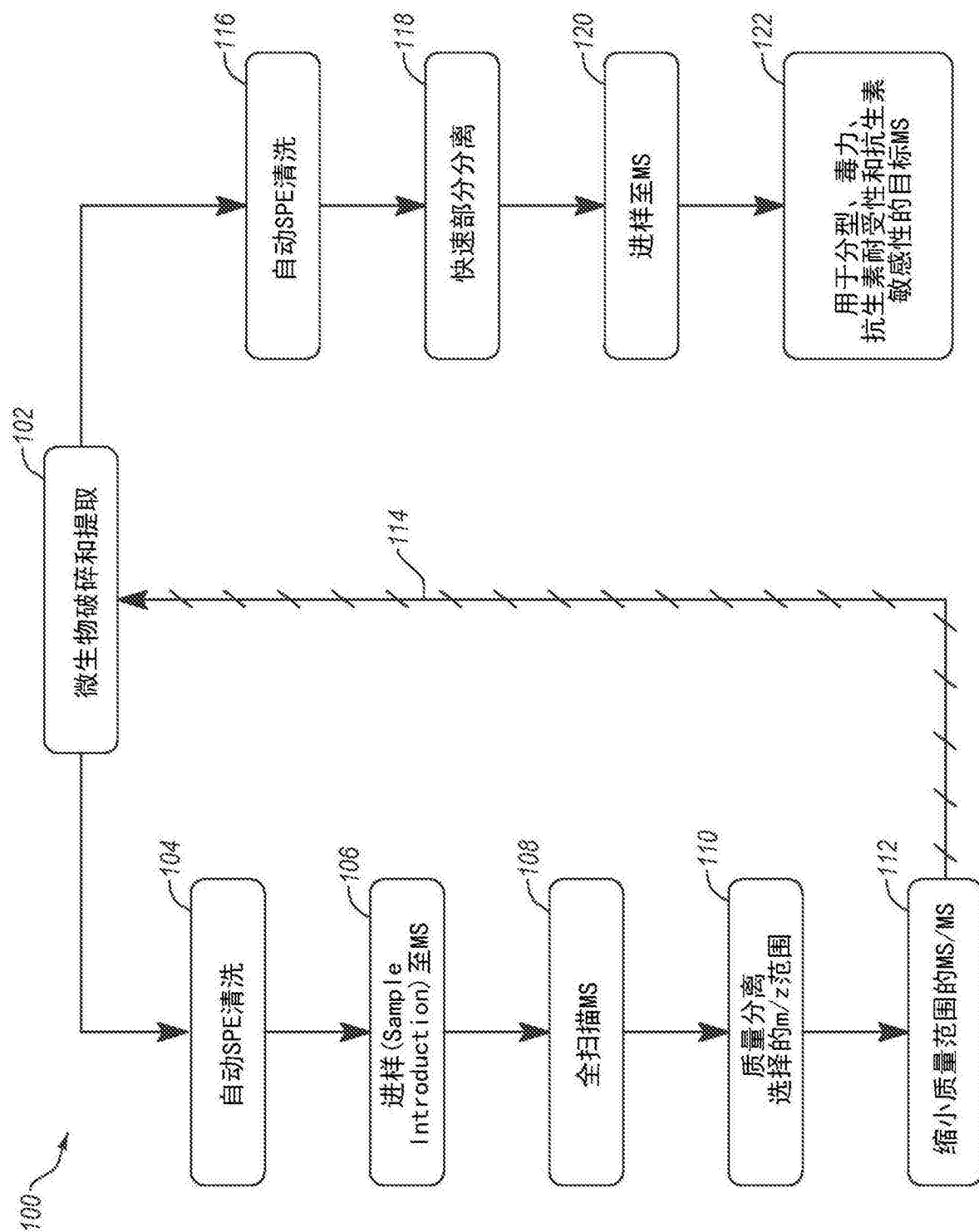


图1A

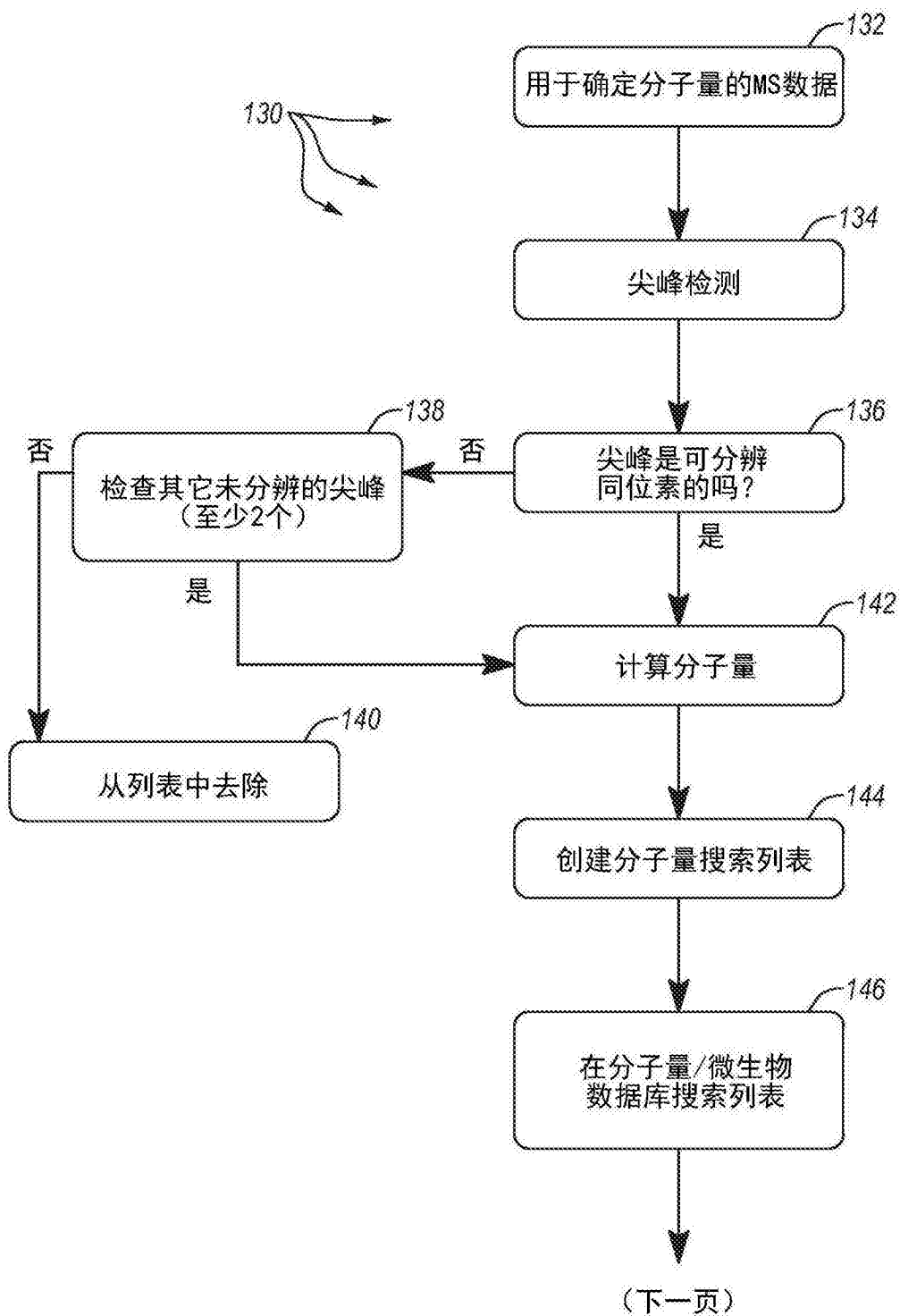


图1B

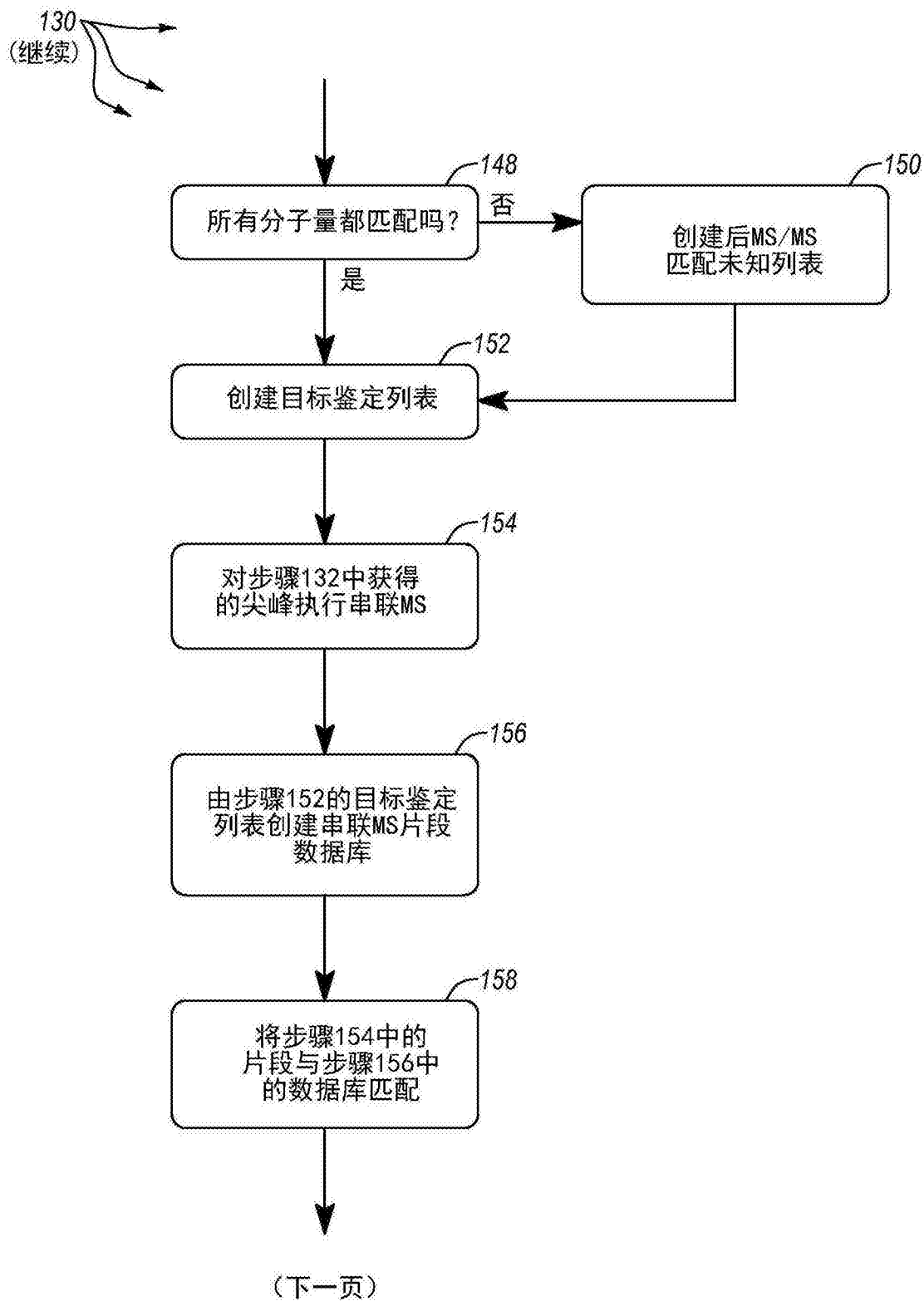


图1B续

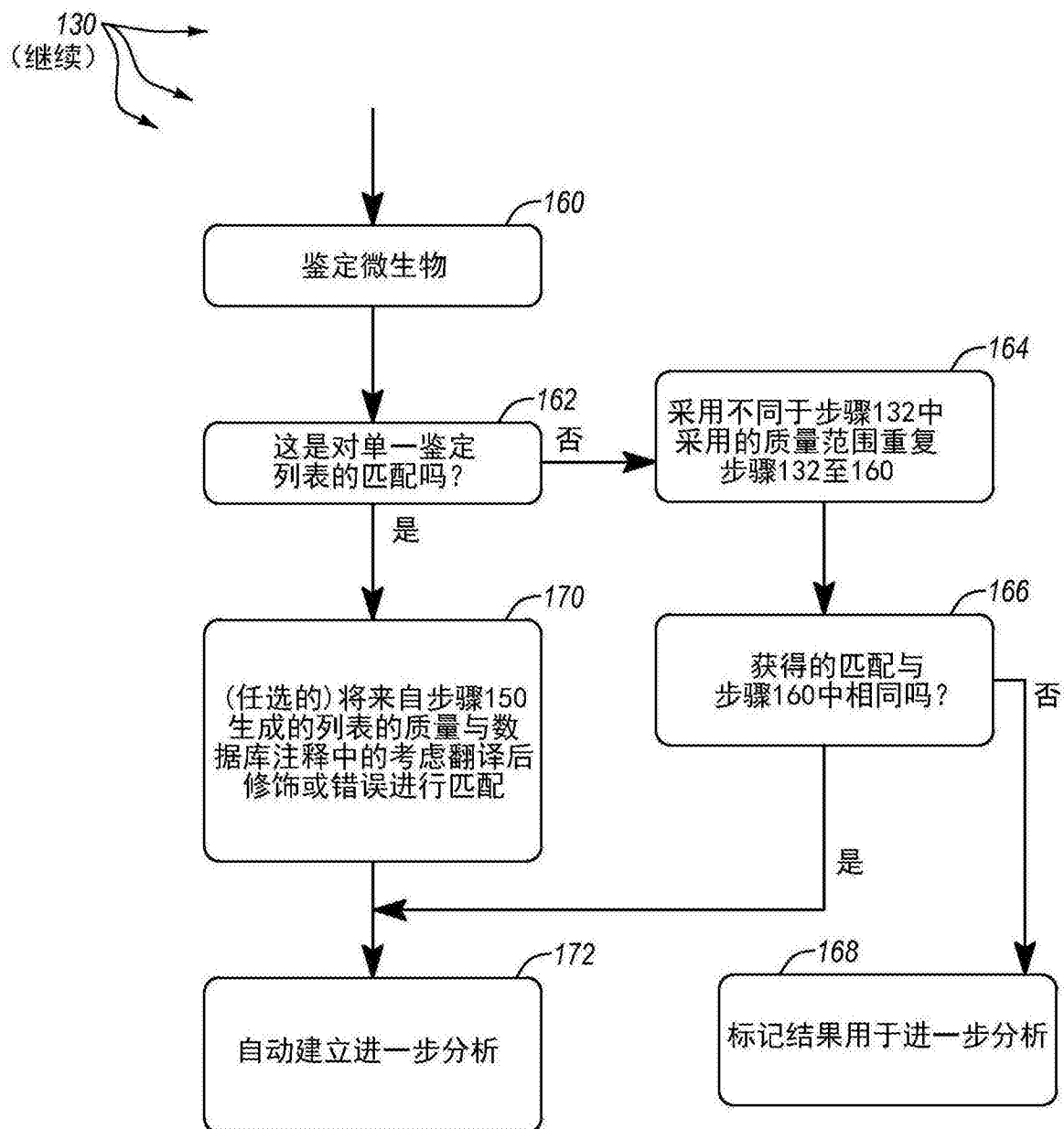


图1B续

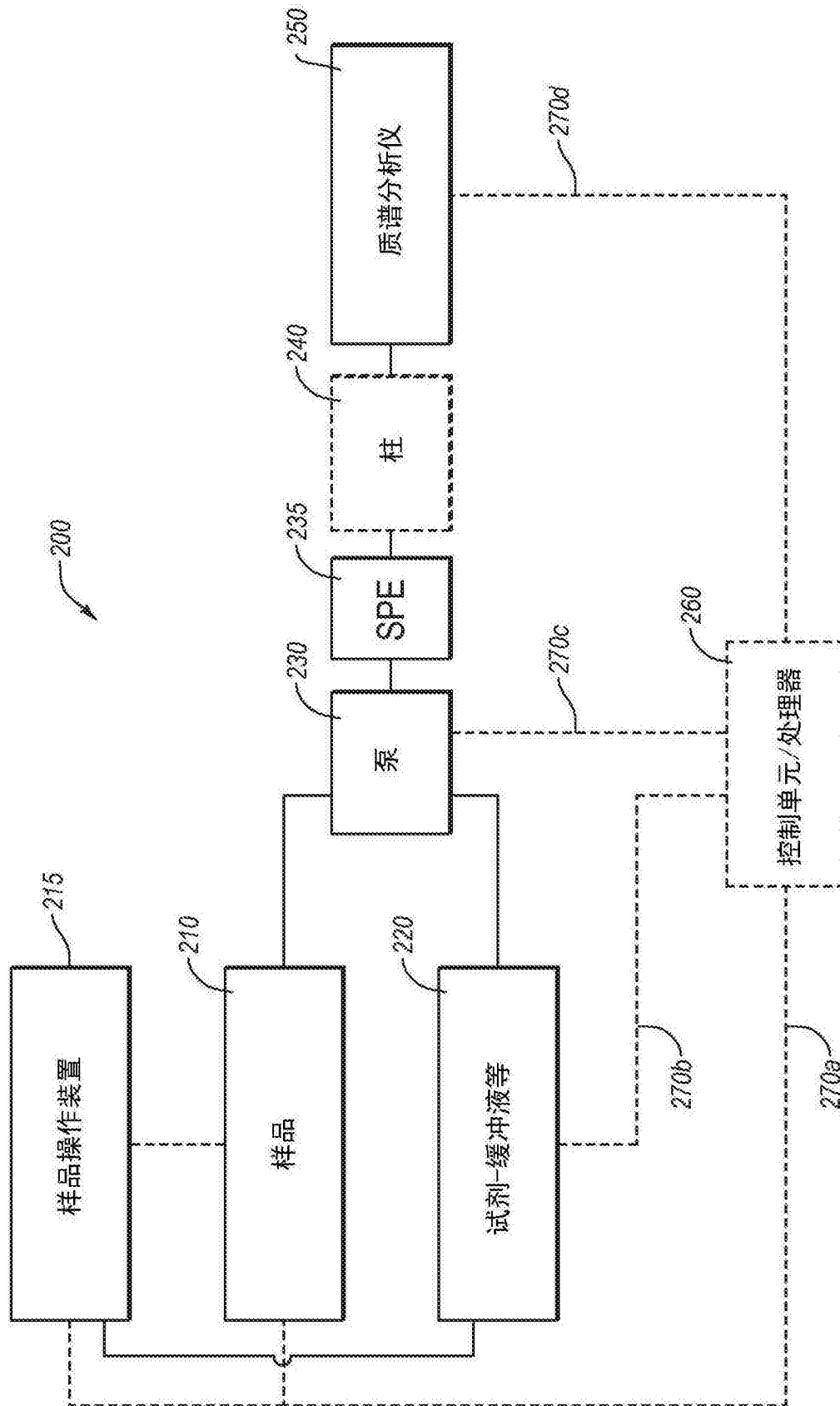


图2

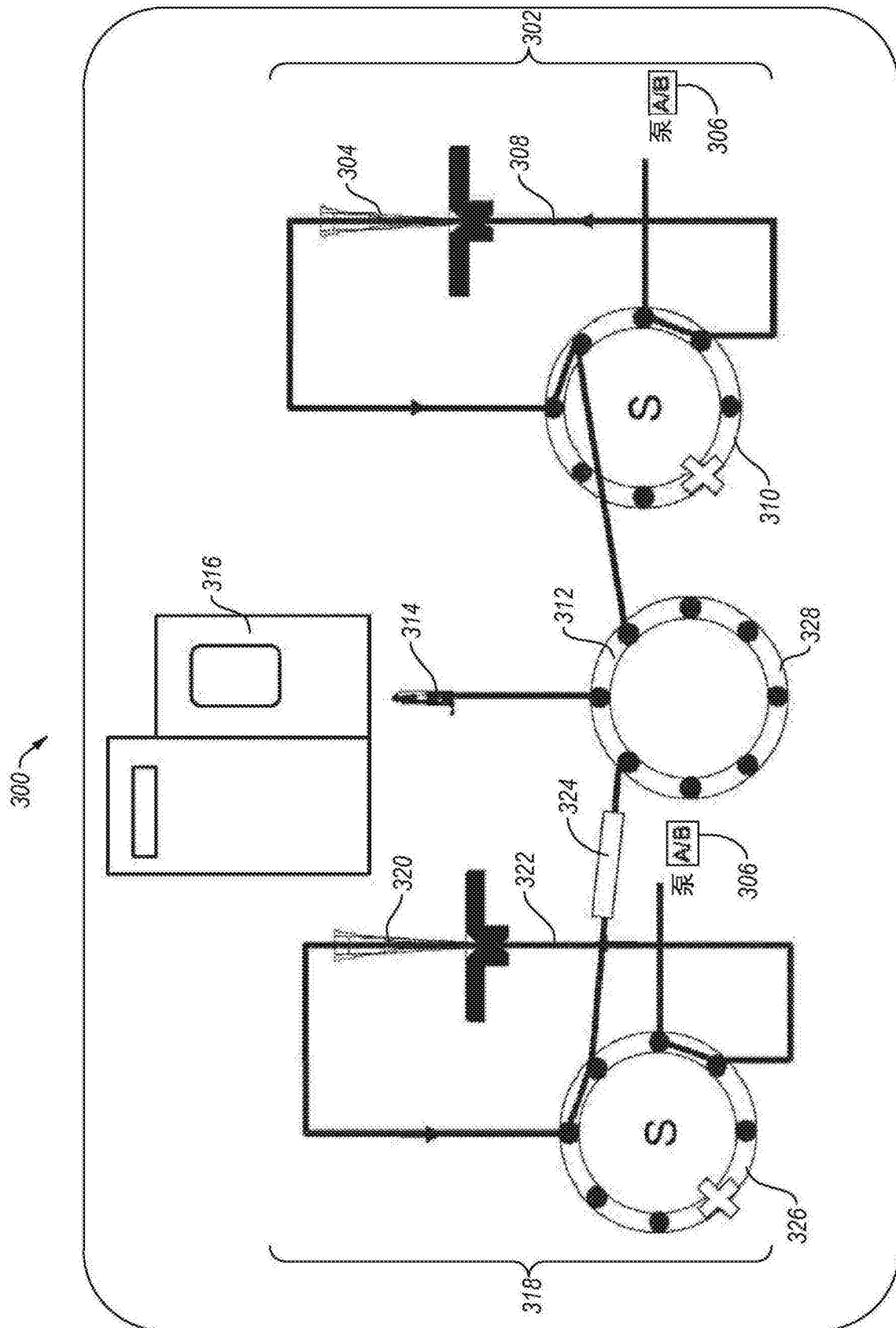


图3

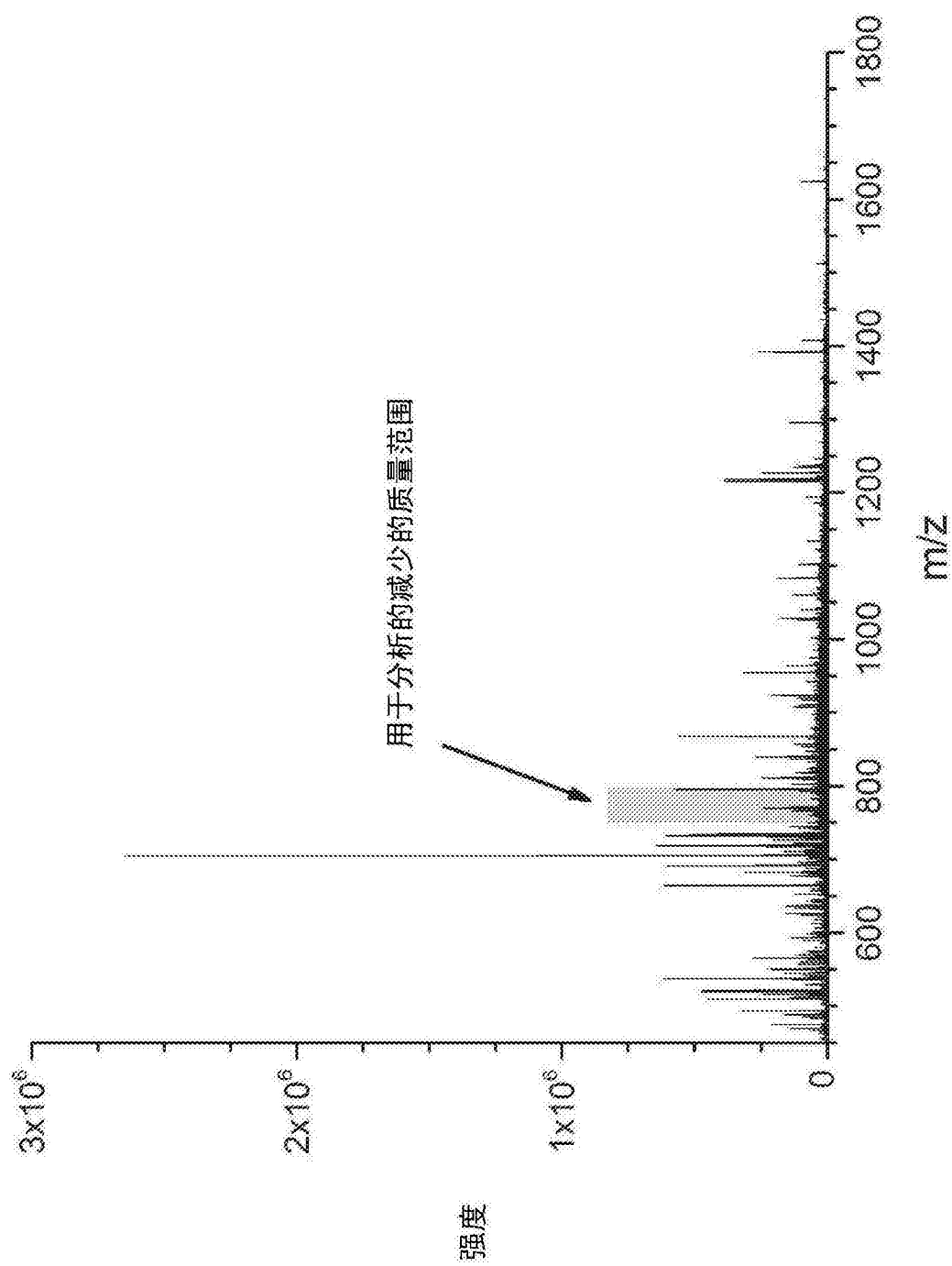


图4

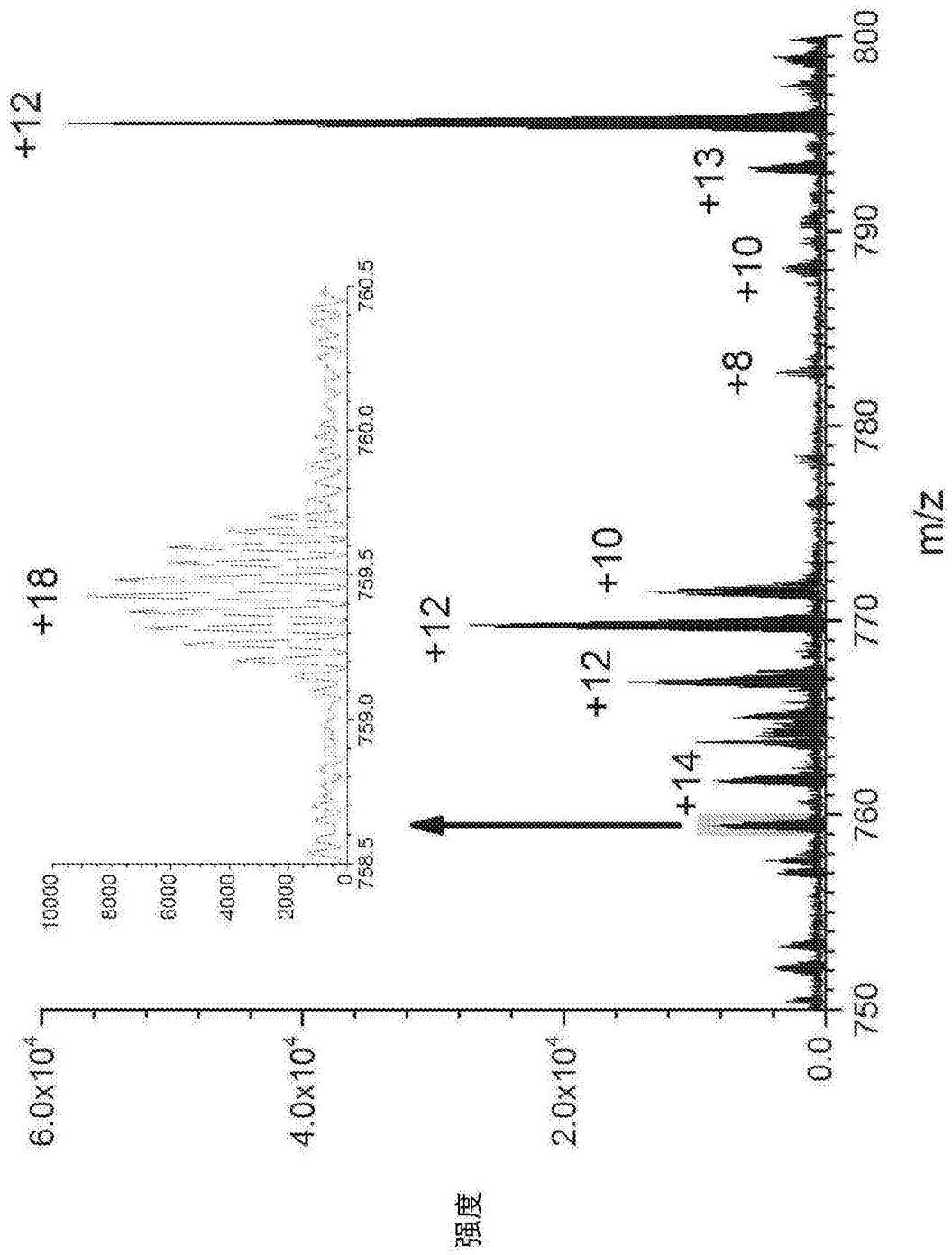


图5

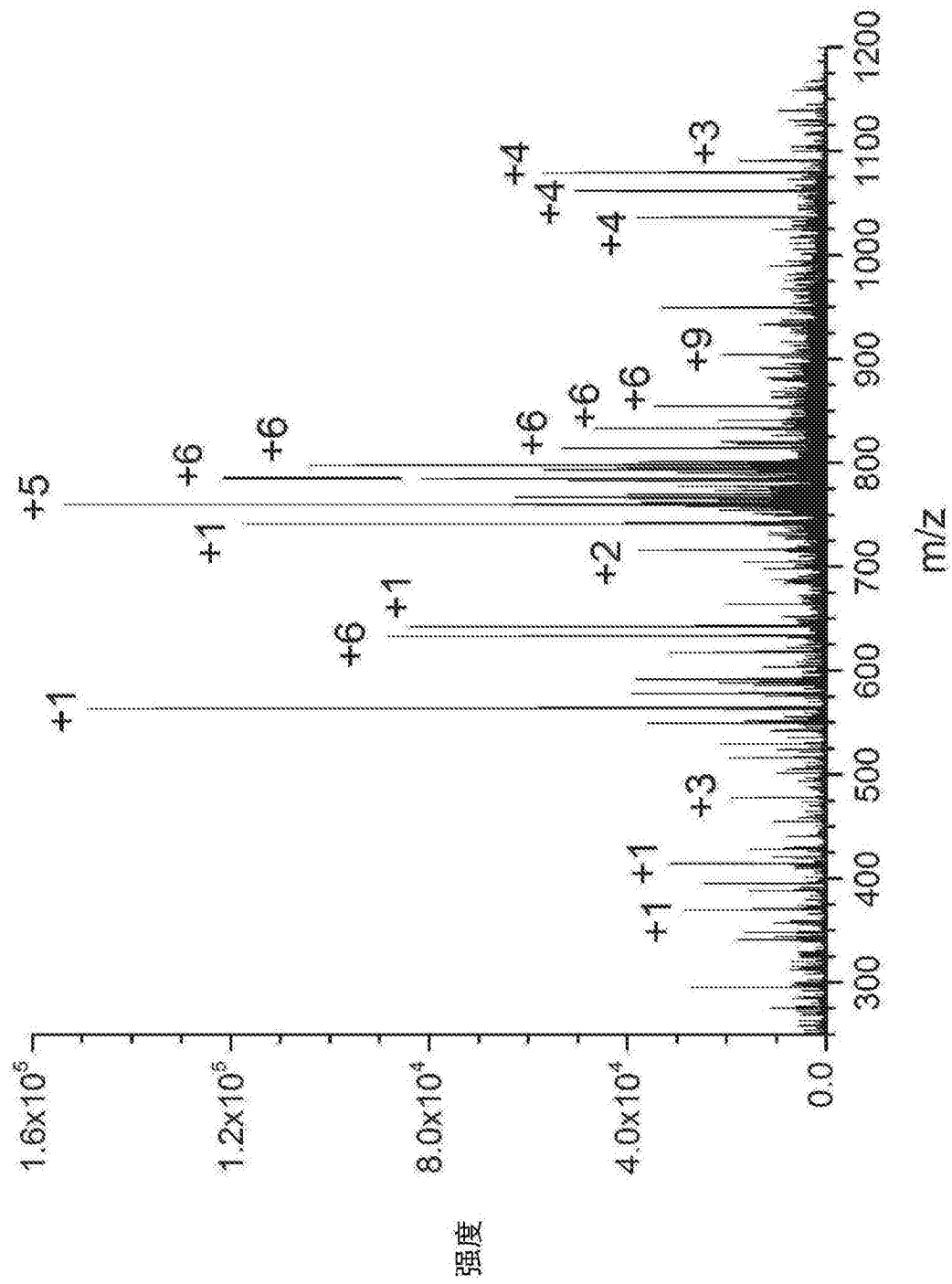


图6

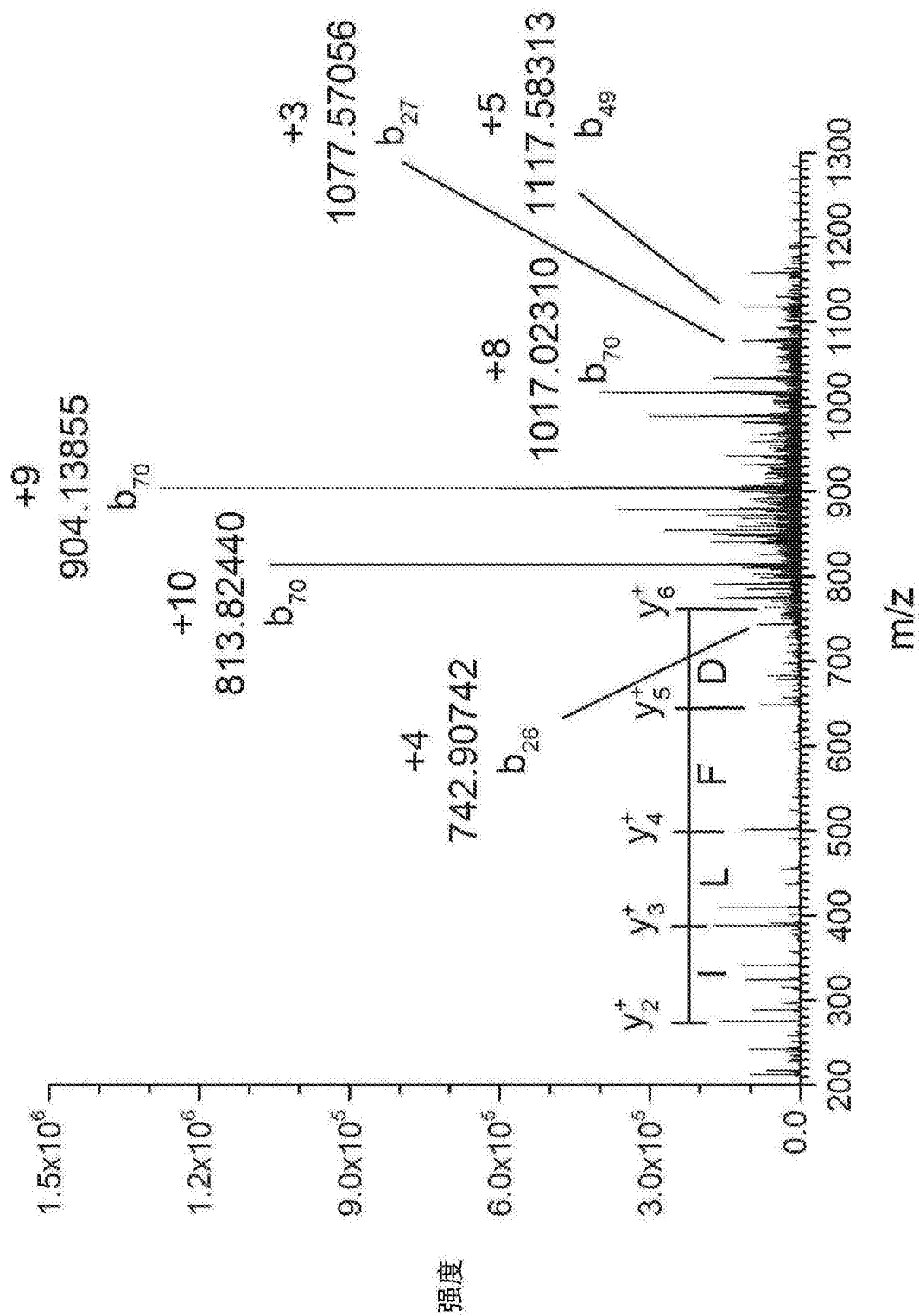


图7

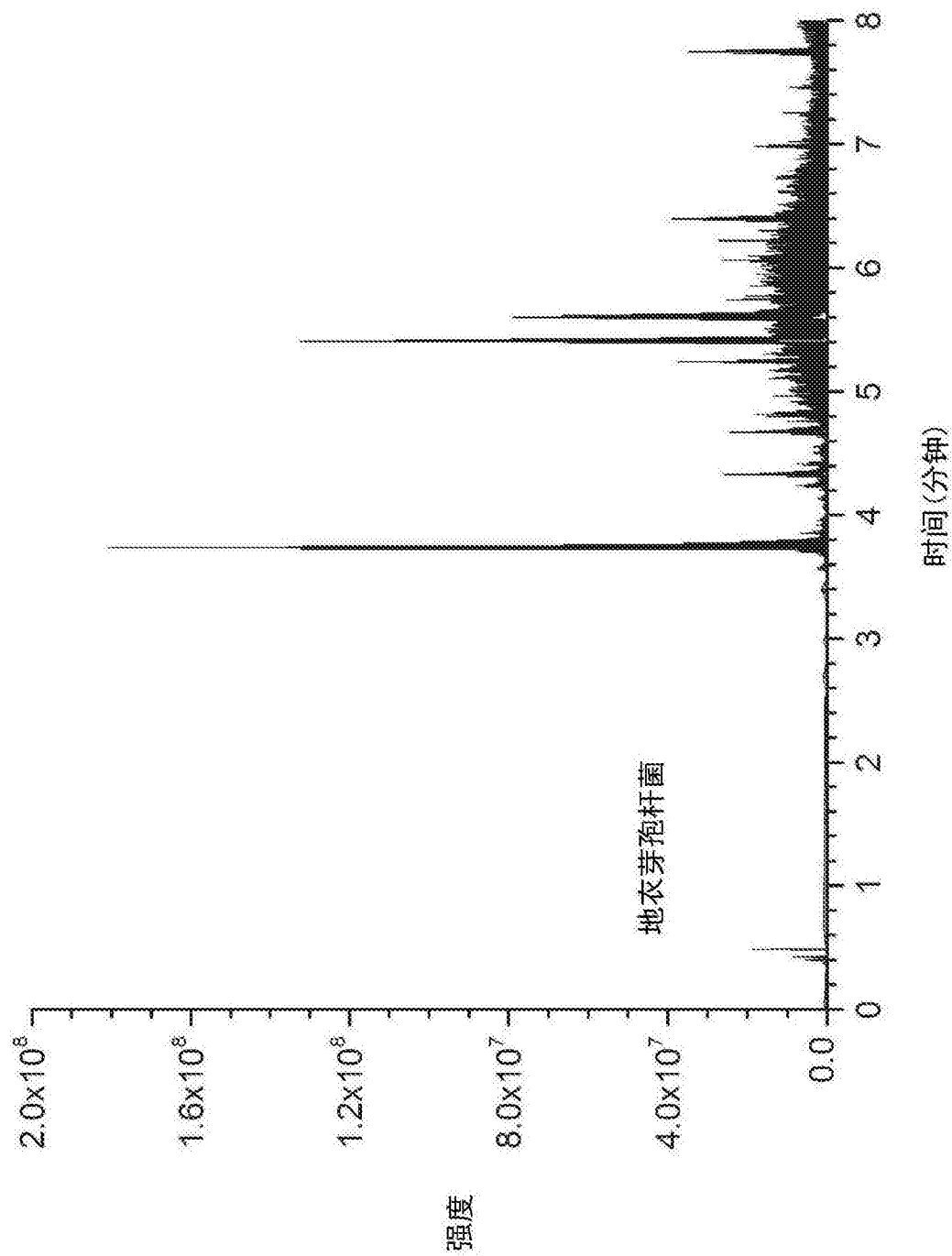


图8A

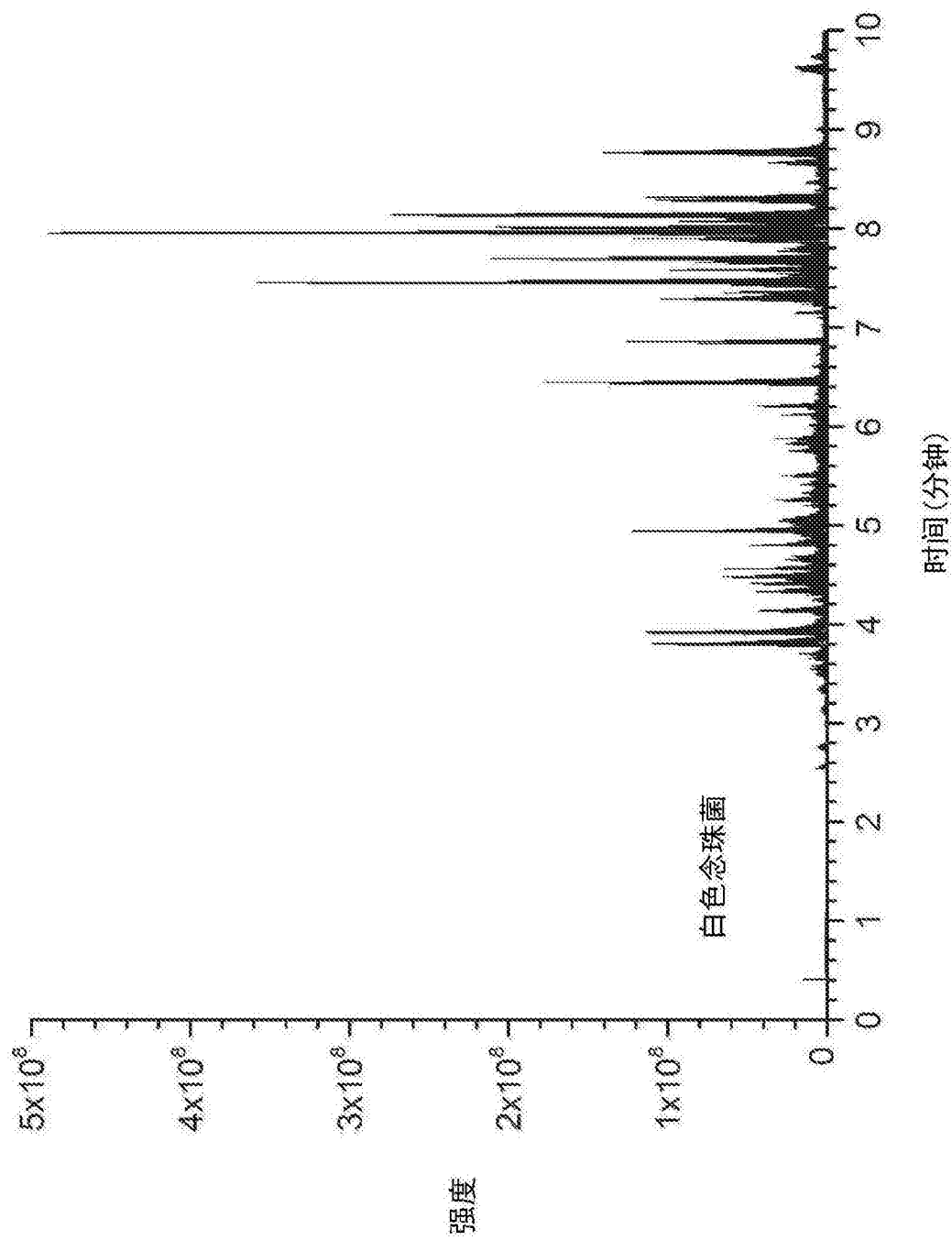


图8B

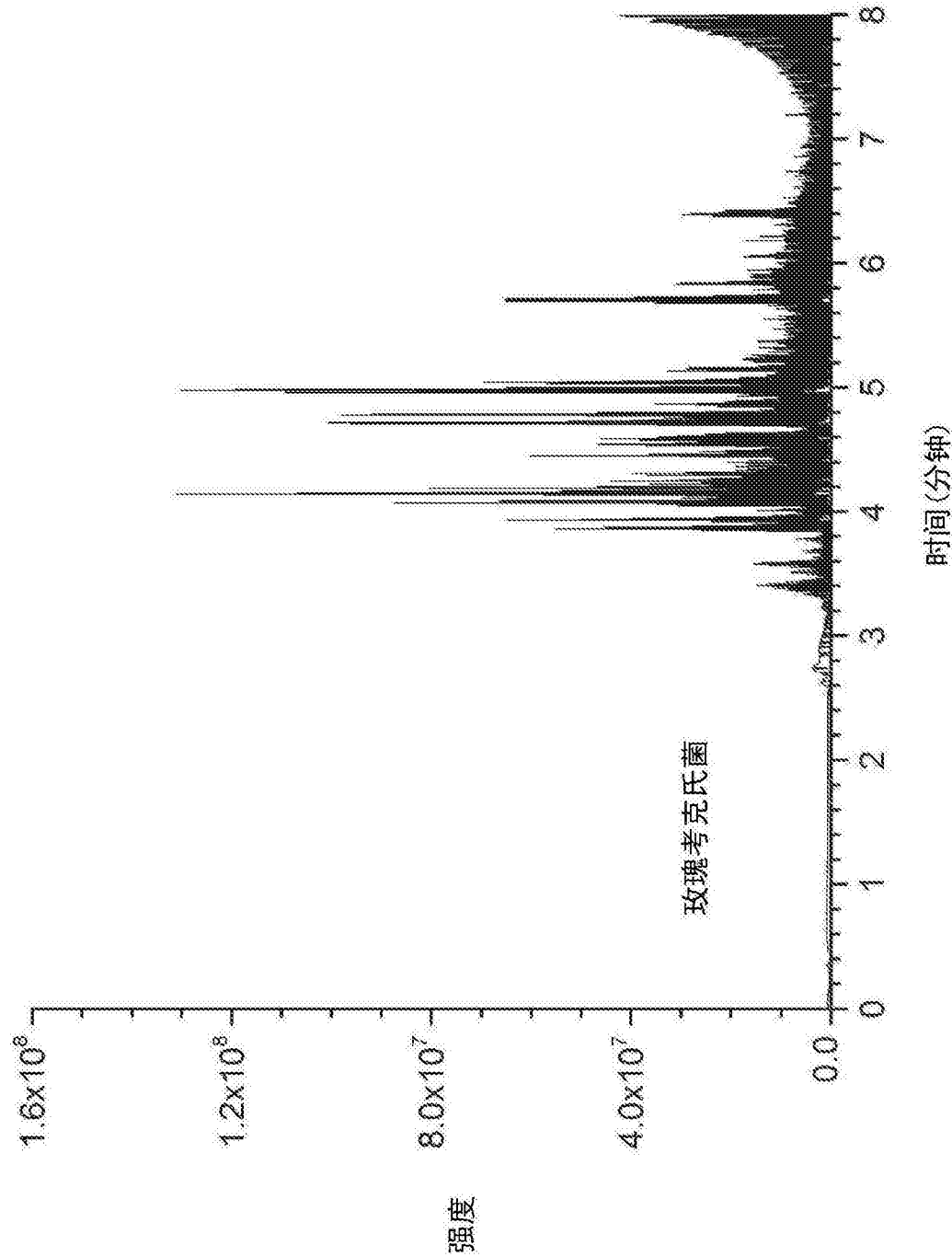


图8C

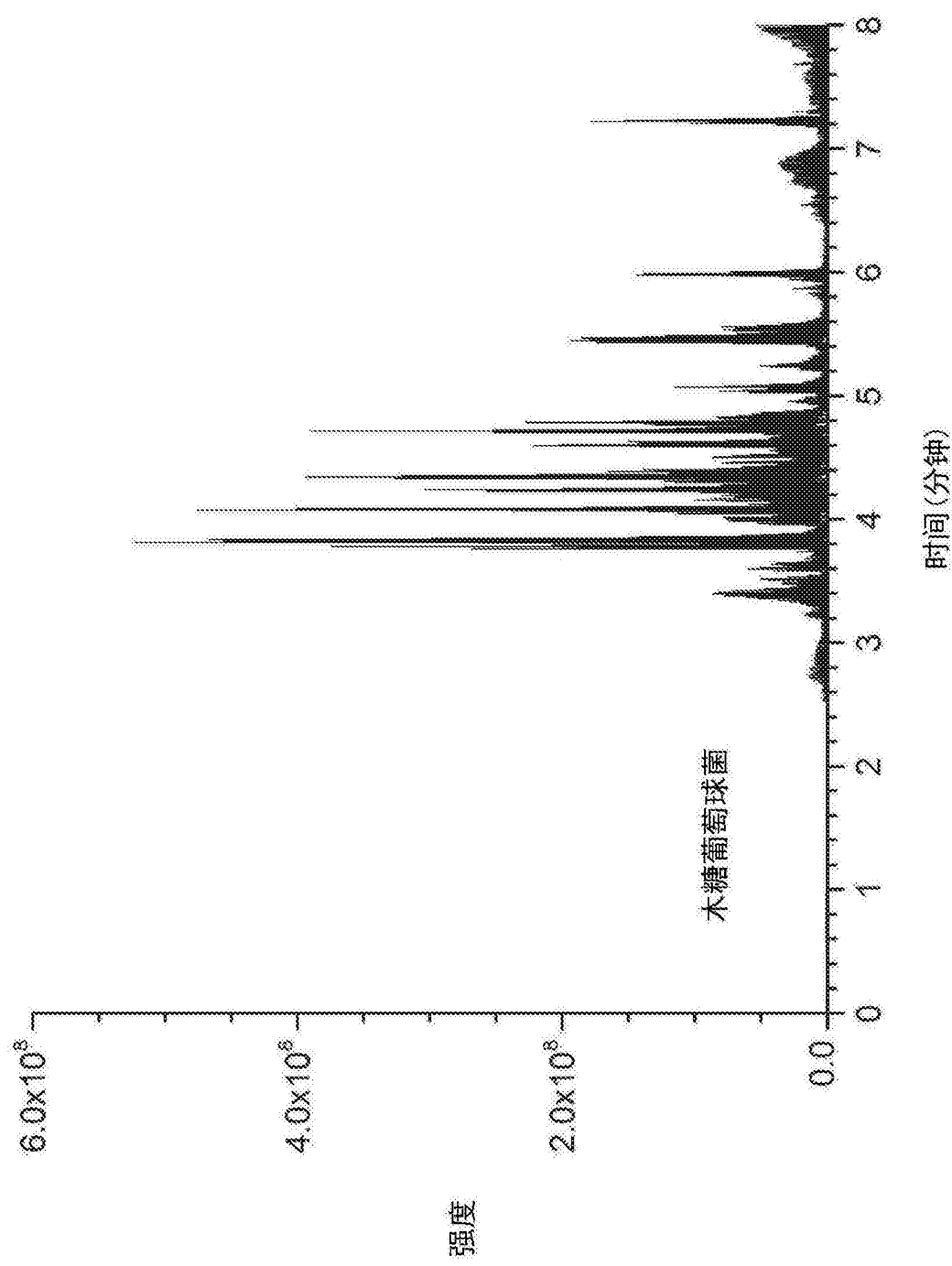


图8D

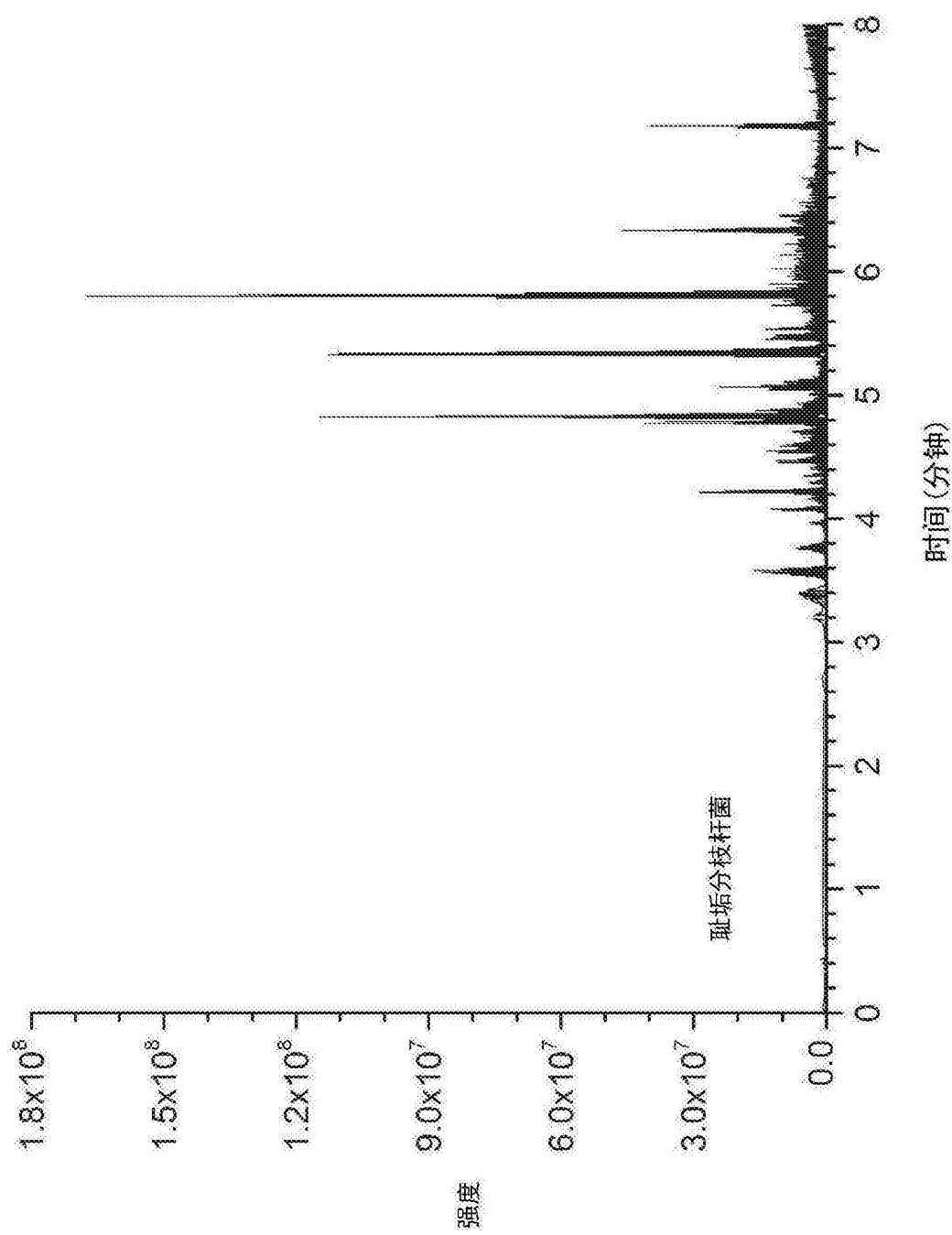


图8E

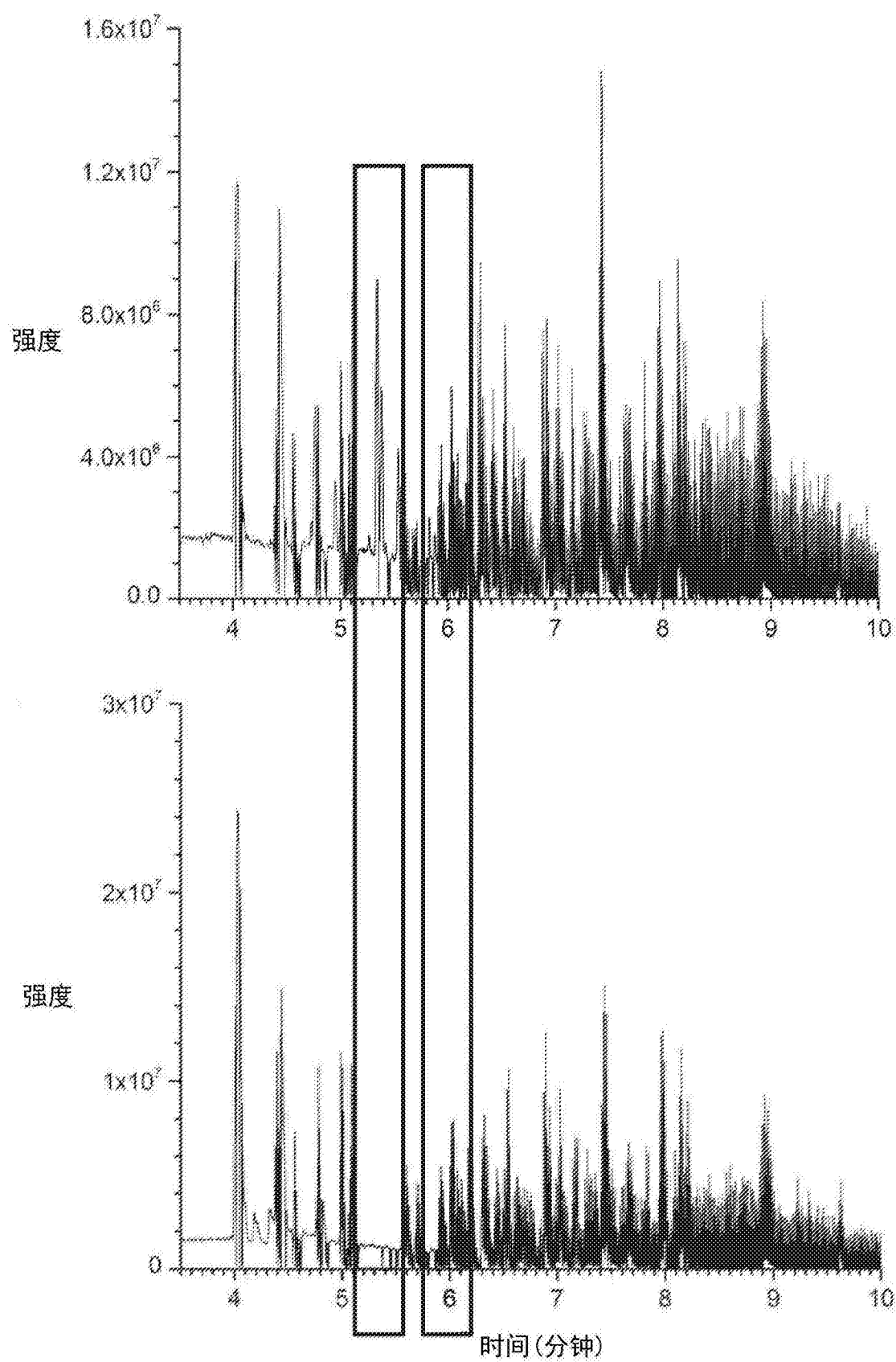


图9A

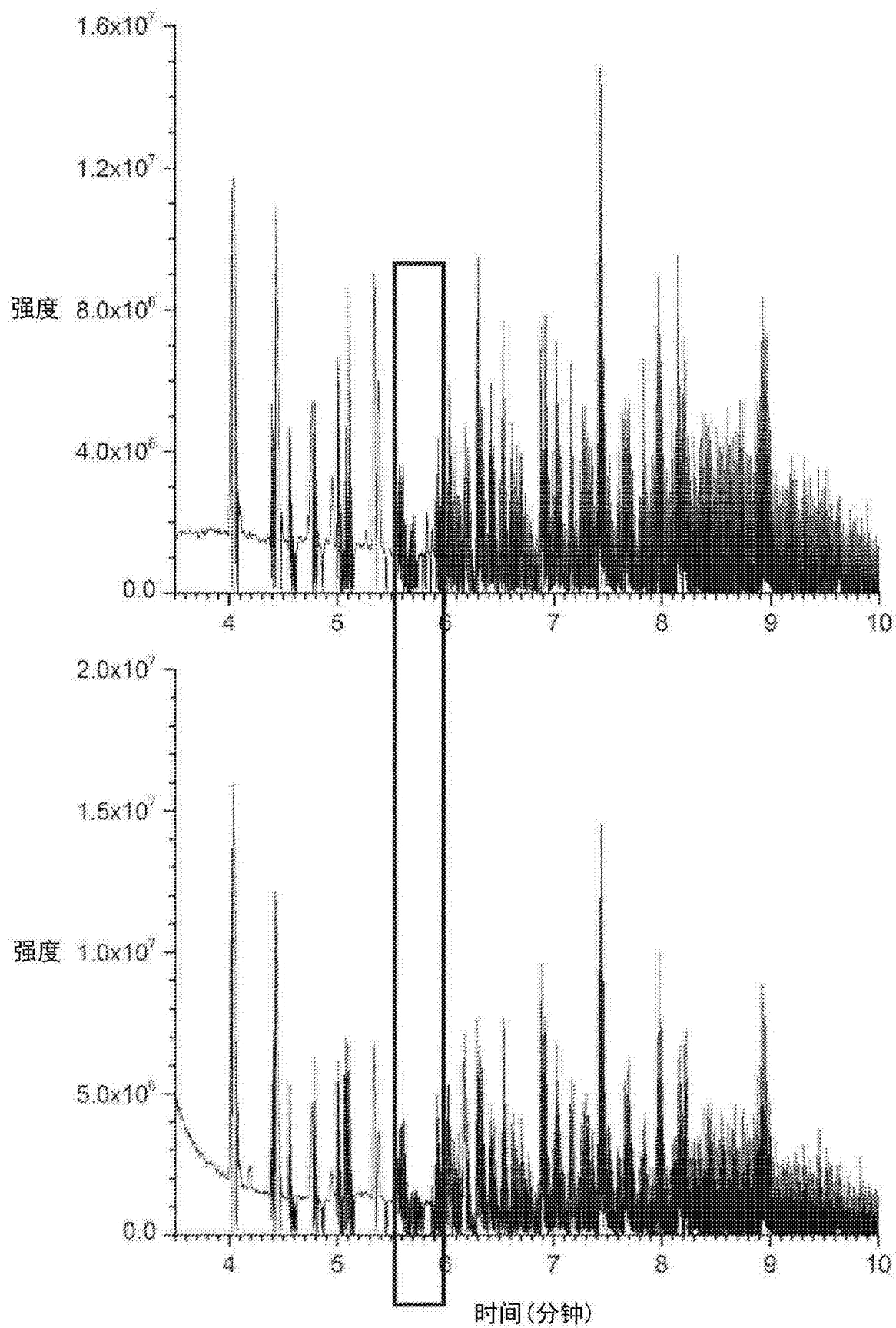


图9B

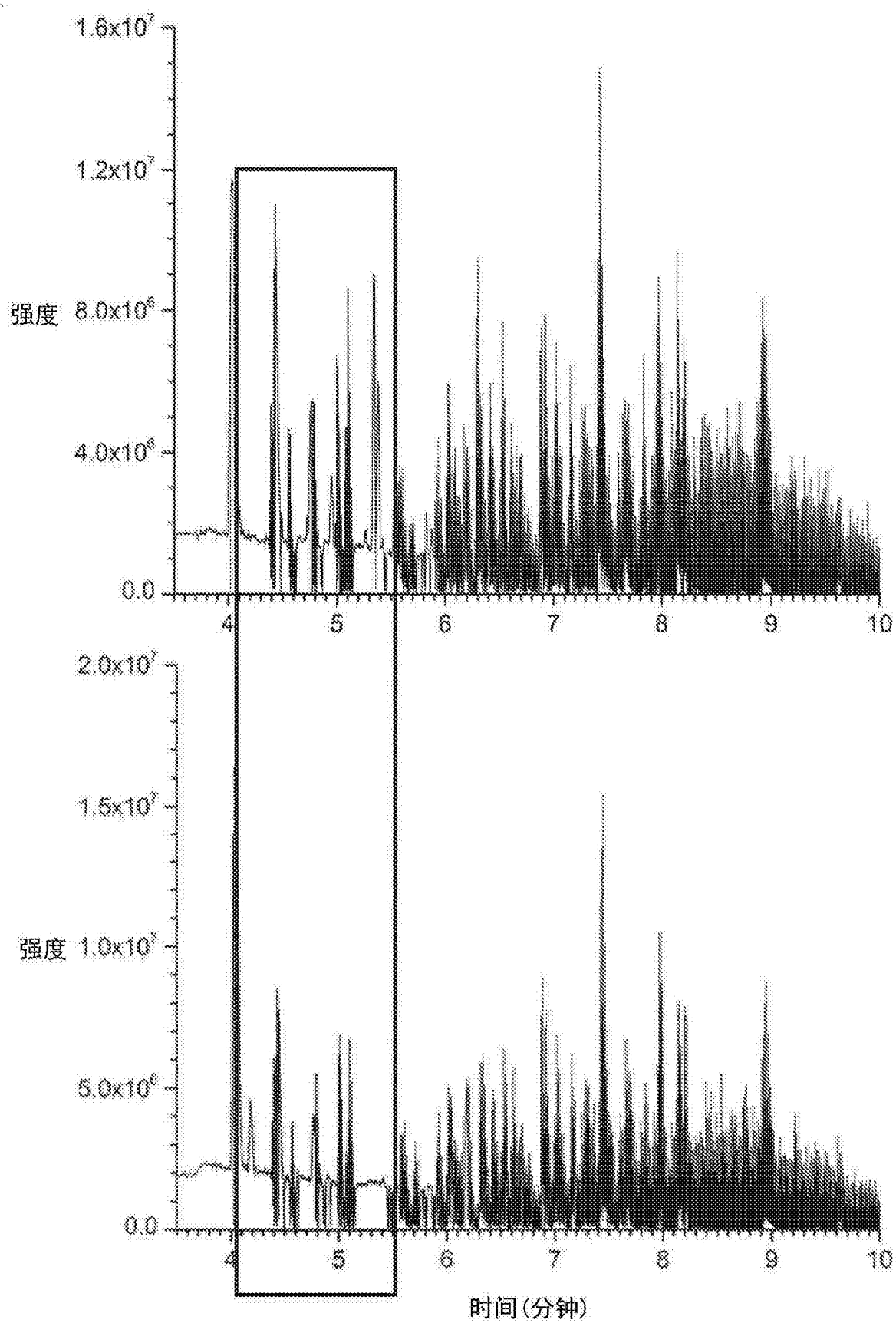


图9C

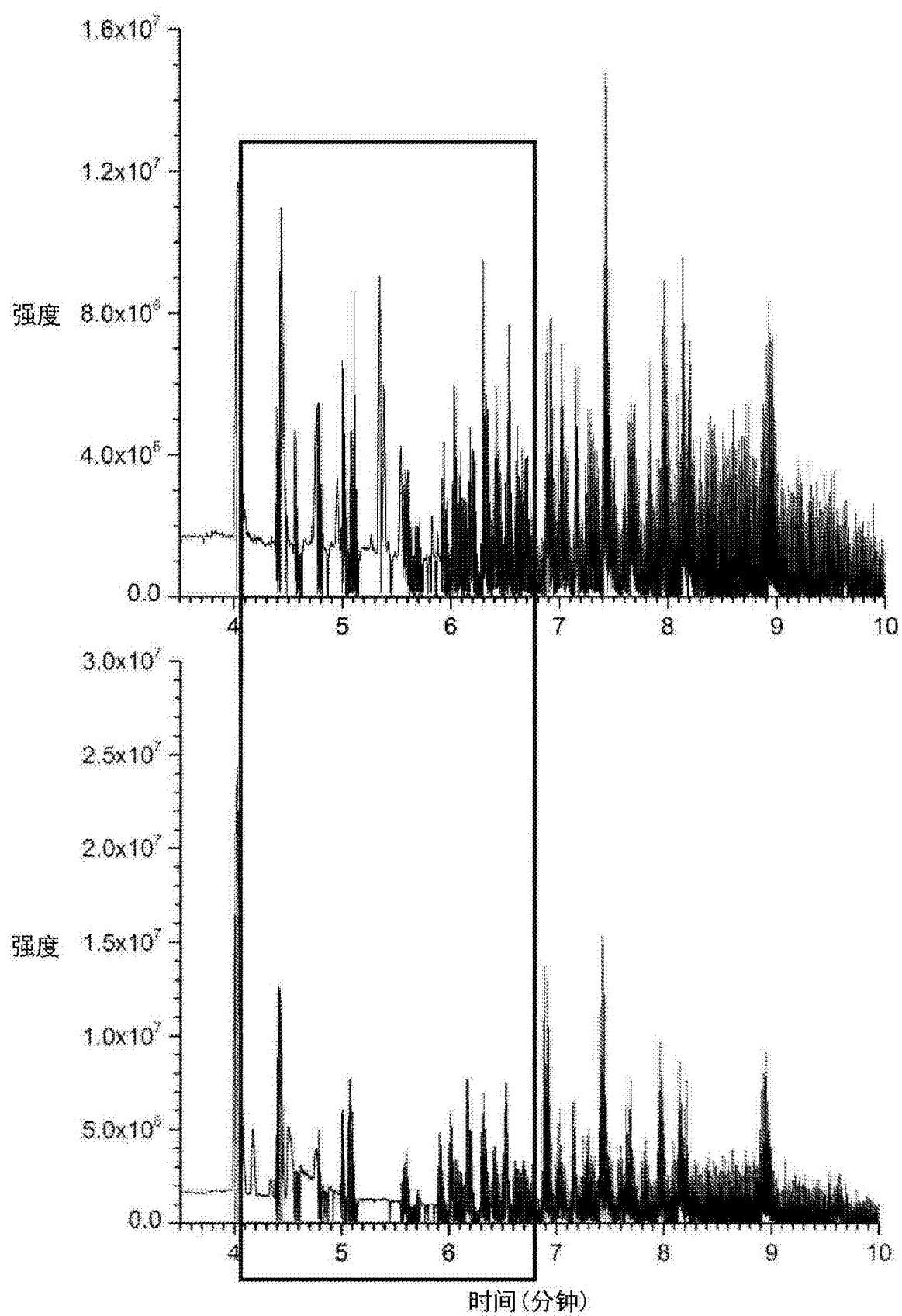


图9D

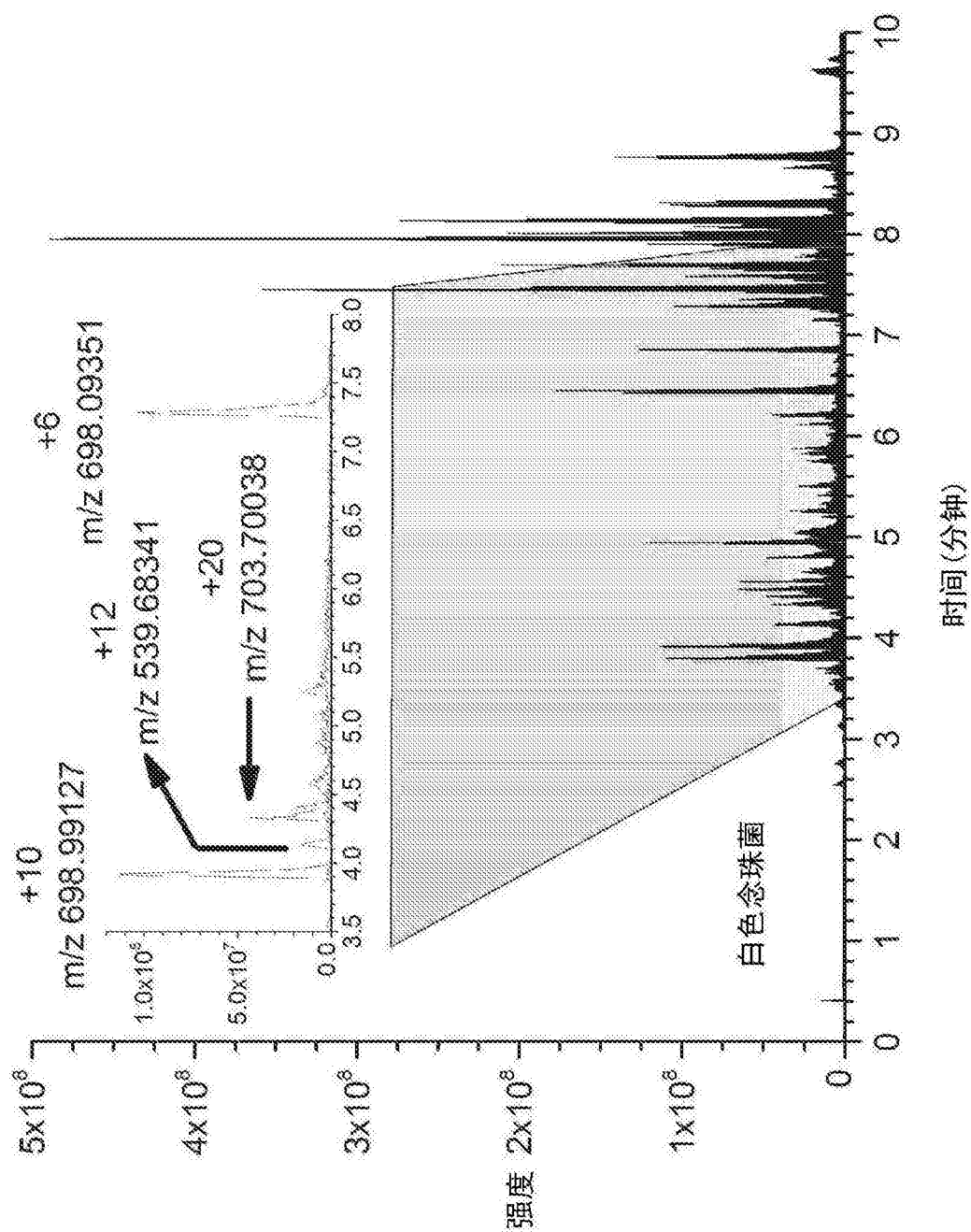


图10

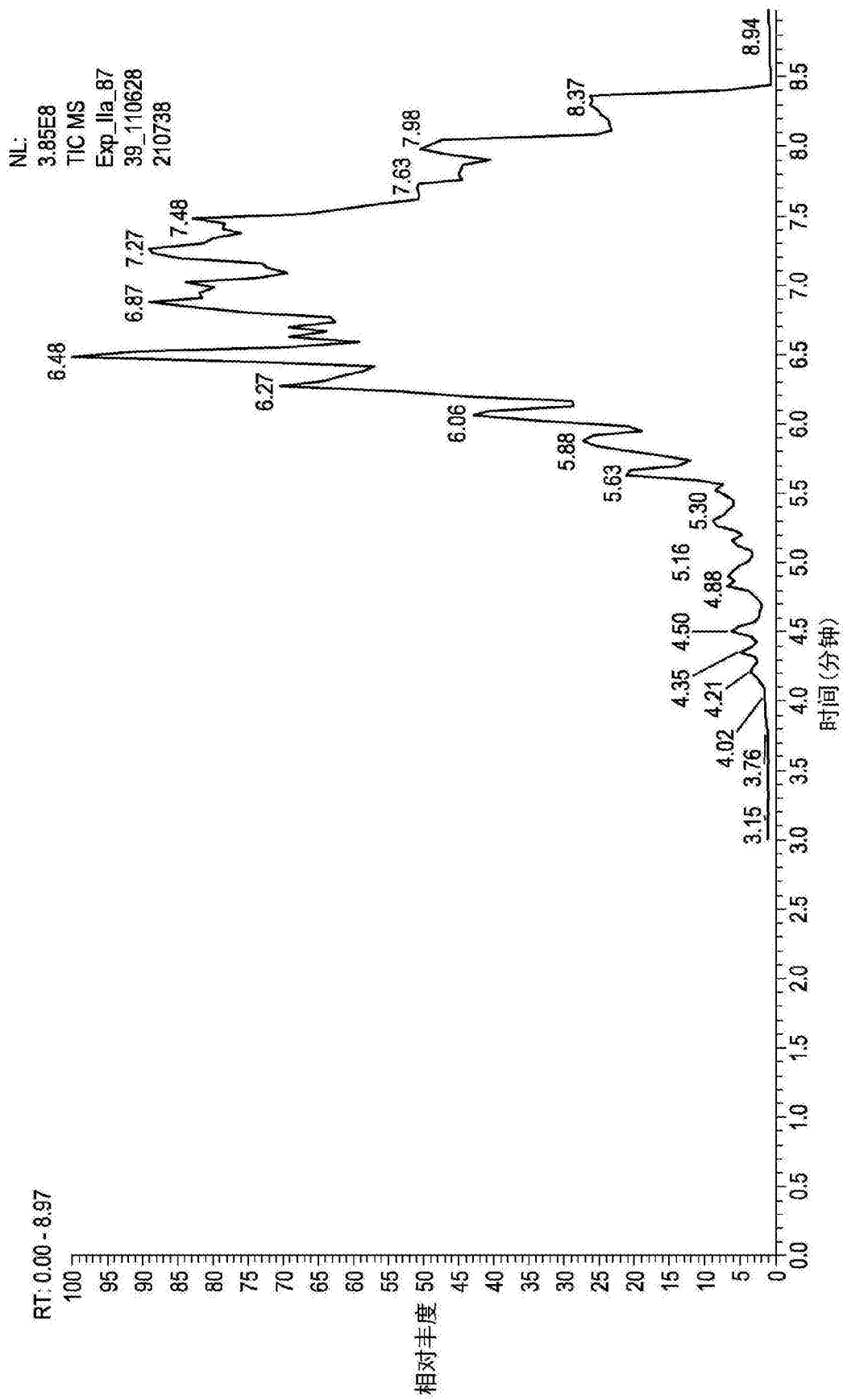


图11A

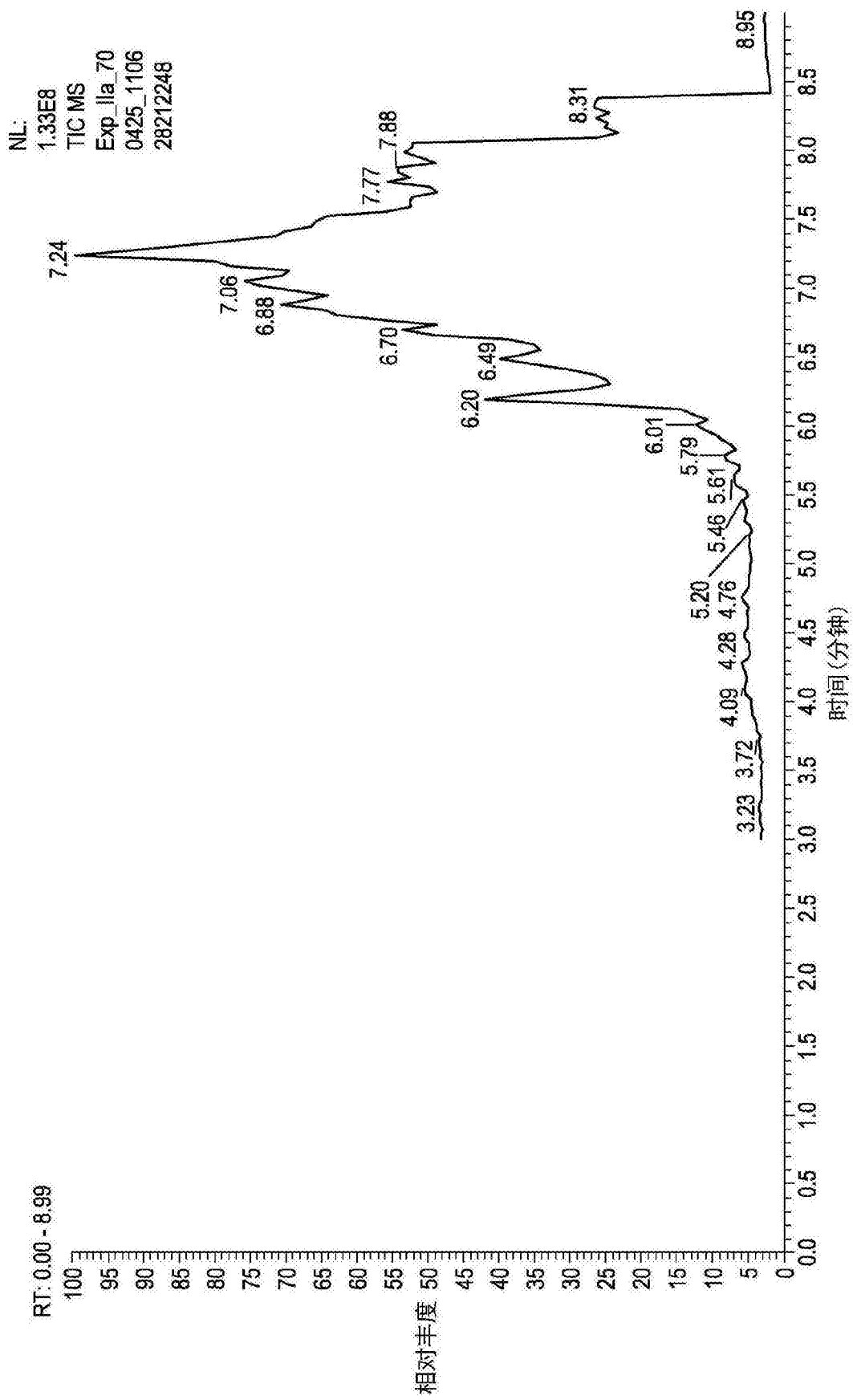


图11B

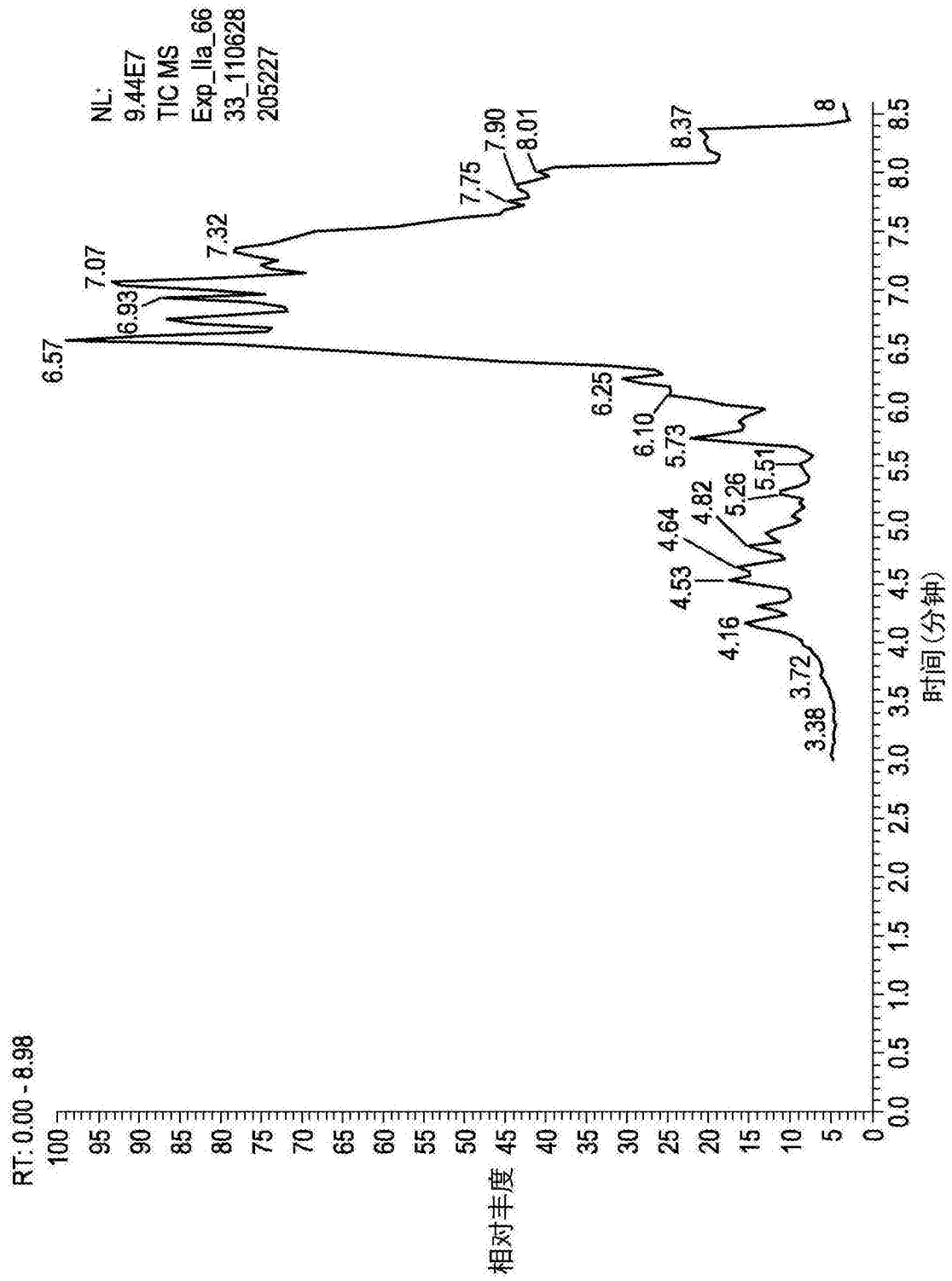


图11C

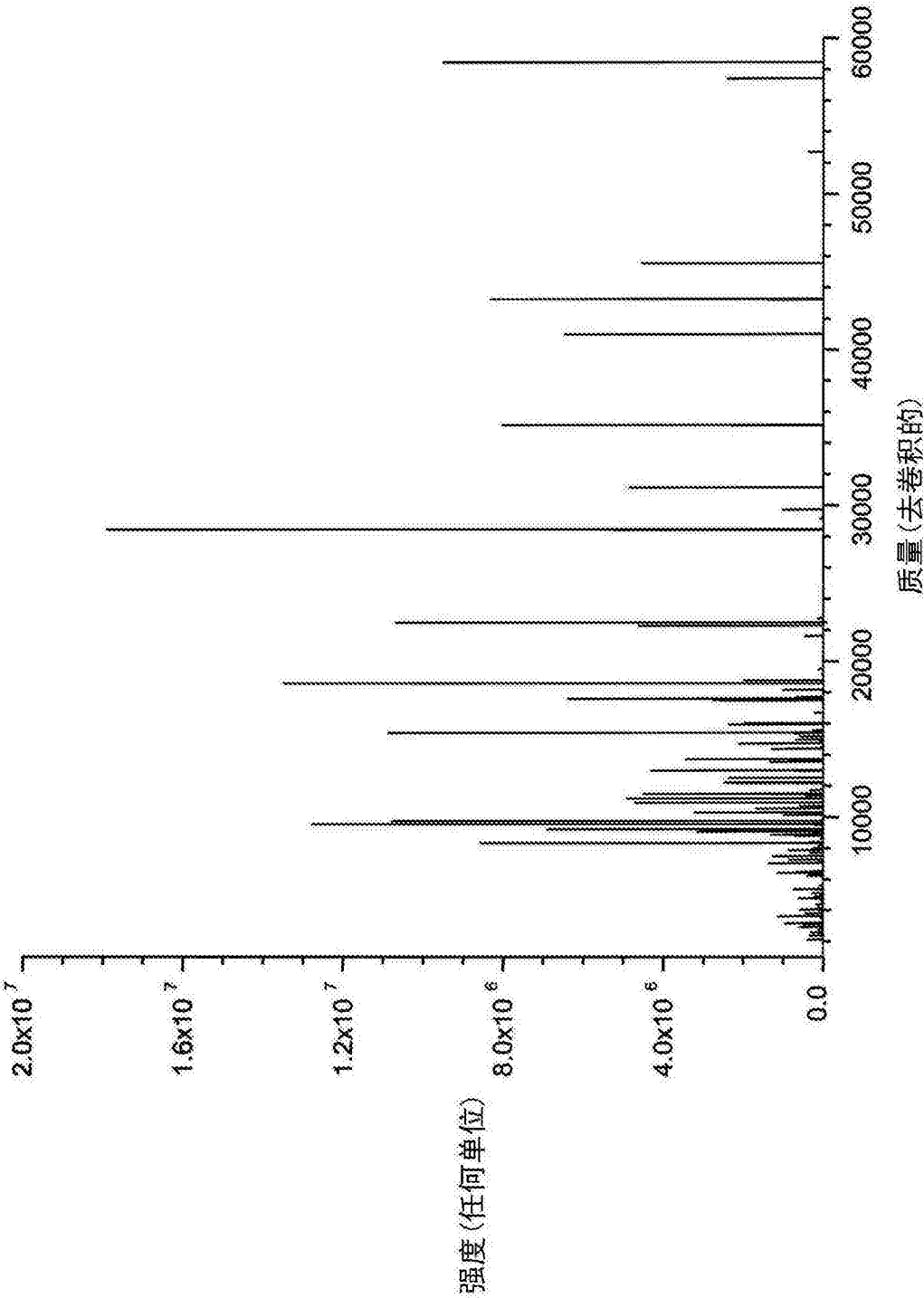


图12