



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104931572 B

(45)授权公告日 2018.08.21

(21)申请号 201510246677.8

(22)申请日 2015.05.14

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104931572 A

(43)申请公布日 2015.09.23

(73)专利权人 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

地址 102206 北京市昌平区昌百路155号

(72)发明人 肖迪 张建中 张慧芳 孟凡亮

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君 要然

(51)Int. Cl.

G01N 27/62(2006.01) (续)

(56)对比文件

US 2002138210 A1,2002.09.26,

US 2005153380 A1,2005.07.14,

US 2005191677 A1,2005.09.01,

US 2009166529 A1,2009.07.02,

CN 101963595 A,2011.02.02,

CN 102507722 A,2012.06.20,

CN 103424463 A,2013.12.04,

US 2013325771 A1,2013.12.05,

CN 103868876 A,2014.06.18,

CN 104597114 A,2015.05.06,

A. Mellmann 等.High Interlaboratory Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Species Identification of Nonfermenting Bacteria.《JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY》.2009,第47卷(第11期),全文. (续)

审查员 焦小毅

权利要求书2页 说明书6页 附图3页

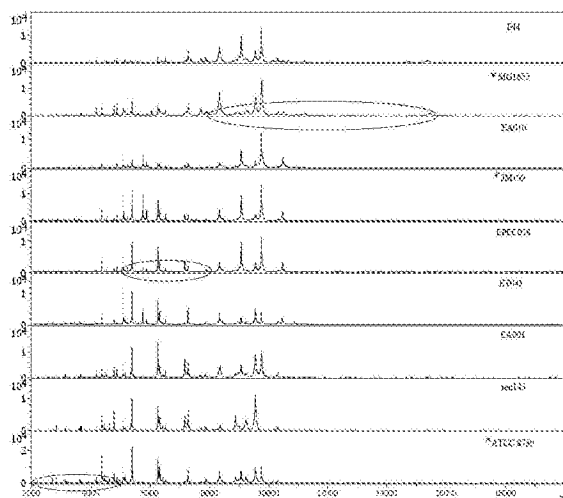
(54)发明名称

微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明提供一种微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品及其制备方法与应用,涉及微生物肽质量指纹谱的基质辅助激光解析飞行时间质谱鉴定技术领域。本发明基于基质辅助激光解析飞行时间质谱技术,通过对多种大肠杆菌的组合与优化,提供一种依据多种大肠杆菌的优化肽序列,以该序列谱为基础构建适用于目前商业化质谱微生物鉴定系统的校正标准品。本发明提供的标准品制备方法简单、成本低廉,利用其作为微生物鉴定的质谱仪分子量校正标准品,具有稳定性好、便于操作、校正时间短、重复性好的优点,且校正峰的肽序列丰富,准确度高,能够解决目前微生物鉴定用质谱仪校正标准品获得困难或

操作条件苛刻的问题,具有良好的经济价值和应用前景。



CN 104931572 B

[接上页]

(51) Int. Cl.

*G01N 1/28*(2006.01)

(56) 对比文件

Witold E Wolski 等. Calibration of mass spectrometric peptide mass fingerprint data without specific external or internal calibrants.《BMC Bioinformatics》.2005,第6卷(第203期),全文.

肖迪. 基于肽质量指纹谱的病原微生物识别及分型研究.《中国博士学位论文全文数据库》.2014,全文.

Naofumi Hosokawa 等. Spectrum

Normalization Method Using an External Standard in Mass Spectrometric Imaging.《J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.》.2008,第56卷(第3期),全文.

Stefan K. Maier 等. PAS-cal A repetitive peptide sequence calibration standard for MALDI mass spectrometry.《Proteomics》.2014,第14卷全文.

Claire E. Evers 等. QCAL—a Novel Standard for Assessing Instrument Conditions for Proteome Analysis.《J Am Soc Mass Spectrom》.2008,第19卷全文.

1. 微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品,其特征在于,含有大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 特征蛋白,该特征蛋白的质荷比 $m/z$ 分别为:2094,2466,3149,4364,5095,5380,6241,6254,6315,6410,6856,7157,7273,7872,8368,9742,10137,10299,12227;

所述的标准品通过以下方法制备得到:

(1) 选择大肠杆菌ATCC8739、MG1655、JM109,将三株菌培养至对数生长期后,收集菌株,按照质量比3-8:1-5:1-3将三者混合;

(2) 按照质量体积比5-10 mg:0.1-0.5mL向三株大肠杆菌混合物中加入蛋白洗涤液A,再按照与蛋白洗涤液A的体积比5-2:1加入蛋白洗涤液B;混匀、离心、弃上清;

所述蛋白洗涤液A为去离子水或超纯水;蛋白洗涤液B为无水乙醇;

(3) 向步骤(2)获得的沉淀中加入蛋白溶解液A,二者的质量体积比为5-10 mg:0.025-0.125 mL,充分混匀后再加入与蛋白溶解液A相同体积的蛋白溶解液B,离心,取上清即为标准品;

所述蛋白溶解液A为50%-80%的色谱级甲酸,蛋白溶解液B为色谱级乙腈。

2. 如权利要求1所述的标准品,其特征在于,步骤(1)中三株菌的质量比为4-7:1-4:1-2;步骤(2)和步骤(3)的离心均为10000-13000 rpm,2-5 min。

3. 一种用于微生物鉴定用质谱仪分子量校正试剂盒,其特征在于,含有权利要求1-2任一所述的标准品。

4. 如权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述标准品为冻干品,还含有蛋白溶解液A、蛋白溶解液B和基质溶解液,所述蛋白溶解液A为50%-80%的色谱级甲酸,蛋白溶解液B为100%色谱级乙腈;基质溶解液为49%的乙腈、2.0%的三氟乙酸、49%超纯水。

5. 权利要求1-2任一所述的标准品或权利要求3-4任一所述的试剂盒在质谱鉴定微生物中的应用。

6. 权利要求1-2任一所述的标准品或权利要求3-4任一所述的试剂盒在MALDI-TOF MS鉴定微生物中的应用。

7. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,包括以下步骤:

1) 取权利要求1-2任一所述的标准品点于质谱样品靶板上,室温干燥后在蛋白标准品上覆盖用基质溶解液制备的 $\alpha$ -氨基-4-羟基肉桂酸饱和溶液,室温干燥后进质谱使用,或

取权利要求3-4任一所述试剂盒中标准品1管,按照体积比1:1-2加入蛋白溶解液A,振荡溶解后加入与蛋白溶解液A等体积的蛋白溶解液B,混匀;取标准品液,点于质谱样品靶板上,室温干燥后在蛋白标准品上覆盖用基质溶解液制备的 $\alpha$ -氨基-4-羟基肉桂酸饱和溶液,室温干燥后进质谱使用;

所述蛋白溶解液A为50%-80%的色谱级甲酸,蛋白溶解液B为色谱级乙腈;

2) 质谱采集的参数设定:线性阳离子采样模式,采集质荷比范围2000-20000Da,对于目前商业化的微生物鉴定用质谱仪,源电压、透镜电压、延迟提取时间、激光频率、采集谱图扫描数目参数的设定以各自的要求及仪器状态为准。

8. 微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 选择大肠杆菌ATCC8739、MG1655、JM109,将三株菌培养至对数生长期后,收集菌株,按照质量比3-8:1-5:1-3将三者混合;

(2) 按照质量体积比5-10 mg:0.1-0.5mL向三株大肠杆菌混合物中加入蛋白洗涤液A,

再按照与蛋白洗涤液A的体积比5-2:1加入蛋白洗涤液B;混匀、离心、弃上清;

所述蛋白洗涤液A为去离子水或超纯水;蛋白洗涤液B为无水乙醇;

(3) 向步骤(2)获得的沉淀中加入蛋白溶解液A,二者的质量体积比为5-10 mg:0.025-0.125 mL,充分混匀后再加入与蛋白溶解液A相同体积的蛋白溶解液B,离心,取上清即为标准品;

所述蛋白溶解液A为50%-80%的色谱级甲酸,蛋白溶解液B为色谱级乙腈。

9. 如权利要求8所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中三株菌的质量比为4-7:1-4:1-2;步骤(2)和步骤(3)的离心均为10000-13000 rpm,2-5 min。

## 微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基于肽质量指纹谱的基质辅助激光解析飞行时间质谱鉴定微生物的技术领域,具体地,涉及微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 病原体的快速、准确识别是临床感染诊断、传染病预防控制、食品安全等公共卫生问题的关键因素。随着软电离技术的发展,基于肽质量指纹谱的基质辅助激光解析飞行时间质谱(MALDI-TOFMS)微生物识别技术也随之问世。该技术是在完整的微生物中添加酸性基质辅助细胞裂解,激光激发细胞裂解物(小蛋白或多肽)形成肽质量指纹谱,与已构建的属、种水平的共性参考谱库进行比对分析,从而实现微生物的鉴定。其快速、自动化、高通量、准确的特性已使其在全球临床诊断、质检、传染病监测、食品安全等领域占有一席之地。目前商业化的质谱微生物鉴定系统有布鲁克公司的Microflex/Auto-Biotyper及岛津公司的AXIMA Assurance-SRAMIS/VITEK MS系统。

[0003] 质谱仪采集样本的准确性是肽质量指纹谱微生物识别体系的关键因素。而仪器校正用标准品决定质谱仪采样的准确性。目前商业化的微生物鉴定用质谱仪校正标准品只有布鲁克公司的Bruker Bacterial Test Standard(BTS255343)。鉴于病原微生物的敏感性,该标准品因涉及病原菌及其提取物,国内购进手续繁琐、价格昂贵。微生物鉴定用质谱仪分子量校正,不同厂家给出的方案不同。布鲁克公司采用大肠杆菌提取物,现用现提,需反复培养大肠杆菌;且每个用户使用的菌株不同,对各个实验室检测结果平行性比对造成影响。岛津公司采用大肠杆菌8739菌落直接涂抹,菌株需新鲜培养且传代不超过7次。由于基质与菌落直接结合,结晶均一性差;且人工涂抹菌落,造成每个样本点均一性较差。这两个因素造成校正点稳定性不够好,系统采集谱图较为困难,校正时间长;谱图基线较高,在10,000至14,000Da范围内峰数明显减少,尤其大于12,000Da没有峰出现,直接造成校正匹配漏点增多,尤其是高质量数的校正峰。以上这些因素均会直接影响微生物的鉴定结果。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是为了弥补目前微生物鉴定用质谱仪分子量校正品难以获得或者校正过程费时、费力且效果不稳定等不足之处,提供一种成本低廉、校正谱图优质、校正效果稳定的微生物鉴定用质谱仪分子量校正品。

[0005] 本发明的另一目的是提供一种用于微生物鉴定用质谱仪分子量校正的试剂盒。

[0006] 本发明提供的微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品,含有大肠杆菌(*Escherichia coli*)特征蛋白,该特征蛋白的质荷比 $m/z$ 分别为:2094,2466,3149,4364,5095,5380,6241,6254,6315,6410,6856,7157,7273,7872,8368,9742,10137,10299,12227。

[0007] 进一步地,本发明的微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品通过以下方法制备得到:

[0008] (1) 选择大肠杆菌ATCC8739、MG1655、JM109,将三株菌培养至对数生长期后,收集菌株,按照质量比3-8:1-5:1-3将三者混合;

[0009] 本发明从85株大肠杆菌中筛选了9株菌,进一步优化组合后确定了3株菌,即上述的ATCC8739、MG1655、JM109,并优化了这3株菌的配比。

[0010] (2) 按照质量体积比5-10mg:0.1-0.5mL向三株大肠杆菌混合物中加入蛋白洗涤液A,再按照与蛋白洗涤液A的体积比5-2:1加入蛋白洗涤液B;混匀、离心、弃上清;

[0011] 所述蛋白洗涤液A为去离子水或超纯水;蛋白洗涤液B为无水乙醇;

[0012] 优选地,步骤(2)是按照质量体积比5-10mg:0.2-0.4mL向三株大肠杆菌混合物中加入蛋白洗涤液A,再按照与蛋白洗涤液A的体积比3-2:1加入蛋白洗涤液B;混匀、离心、弃上清;

[0013] (3) 向步骤(2)获得的沉淀中加入蛋白溶解液A,二者的质量体积比为5-10mg:0.025-0.125mL,充分混匀后再加入与蛋白溶解液A相同体积的蛋白溶解液B,离心,取上清,即为标准品;

[0014] 所述蛋白溶解液A为40%-80%的色谱级甲酸,蛋白溶解液B为色谱级乙腈。

[0015] 冻干是保持蛋白稳定性的良好方法,为了方便保存与运输,本领域技术人员可以将本发明制得的标准品制备为冻干品,通常可以按每管5-20 $\mu$ L分装,冻干。

[0016] 其中,步骤(1)中三株菌的质量比为4-7:1-4:1-2;步骤(2)和步骤(3)的离心均为10000-13000rpm,2-5min。

[0017] 优选地,步骤(1)中三株菌的质量比为5-6:1-3:1-2;步骤(2)和步骤(3)的离心均为12000rpm,2-3min。

[0018] 更优选地,步骤(1)中三株菌的质量比为5:2:1;步骤(2)和步骤(3)的离心均为12000rpm,2min。

[0019] 本发明提供一种用于微生物鉴定用质谱仪分子量校正试剂盒,含有微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品。

[0020] 进一步地,所述标准品为冻干品,还含有蛋白溶解液A、蛋白溶解液B和基质溶解液,所述为蛋白溶解液A为50%-80%的色谱级甲酸,蛋白溶解液B为100%色谱级乙腈;基质溶解液为49%的乙腈、2.0%的三氟乙酸、49%超纯水。

[0021] 优选地,所述为蛋白溶解液A为50%-70%的色谱级甲酸。

[0022] 本发明提供了上述微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品或含有该标准品的试剂盒在质谱鉴定微生物中的应用。

[0023] 本发明提供了上述微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品或含有该标准品的试剂盒在应用MALDI-TOFMS鉴定微生物中的应用。

[0024] 本发明提供的标准品在实际应用时,包括以下步骤:

[0025] 1) 若为非冻干品,可以直接将标准品点于质谱样品靶板上,室温干燥后在蛋白标准品上覆盖用基质溶解液制备的 $\alpha$ -氨基-4-羟基肉桂酸饱和溶液,室温干燥后进质谱使用,

[0026] 具体地,标准品1 $\mu$ L点于质谱样品靶板上,室温干燥后在蛋白标准品上覆盖1 $\mu$ L用基质溶解液制备的 $\alpha$ -氨基-4-羟基肉桂酸饱和溶液,室温干燥后进质谱使用;或

[0027] 若为冻干品,按照体积比1:1-2加入蛋白溶解液A,振荡溶解后加入与蛋白溶解液A等体积的蛋白溶解液B,混匀;取标准品液,点于质谱样品靶板上,室温干燥后在蛋白标准品

上覆盖用基质溶解液制备的 $\alpha$ -氨基-4-羟基肉桂酸饱和溶液,室温干燥后进质谱使用;

[0028] 在本发明的一个实施例中,取冻干的标准品1管,加入25 $\mu$ L蛋白溶解液A,振荡溶解后加入25 $\mu$ L蛋白溶解液B,混匀;用移液器取1 $\mu$ L标准品液,点于质谱样品靶板上,室温干燥后在蛋白标准品上覆盖1 $\mu$ L用基质溶解液制备的 $\alpha$ -氨基-4-羟基肉桂酸饱和溶液,室温干燥后进质谱使用;

[0029] 所述蛋白溶解液A为50%-80%的色谱级甲酸,蛋白溶解液B为色谱级乙腈;

[0030] 2) 质谱采集的参数设定:线性阳离子采样模式,采集质荷比范围2000-20000Da,对于目前商业化的微生物鉴定用质谱仪,源电压、透镜电压、延迟提取时间、激光频率、采集谱图扫描数目。

[0031] 步骤2)中参数的设定以各自的要求及仪器状态为准。

[0032] 本发明提供了微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品的制备方法,包括以下步骤:

[0033] (1) 选择大肠杆菌ATCC8739、MG1655、JM109,将三株菌培养至对数生长期后,收集菌株,按照质量比3-8:1-5:1-3将三者混合;

[0034] (2) 按照质量体积比5-10mg:0.1-0.5mL向三株大肠杆菌混合物中加入蛋白洗涤液A,再按照与蛋白洗涤液A的体积比5-2:1加入蛋白洗涤液B;混匀、离心、弃上清;

[0035] 优选地,步骤(2)是按照质量体积比5-10mg:0.2-0.4mL向三株大肠杆菌混合物中加入蛋白洗涤液A,再按照与蛋白洗涤液A的体积比3-2:1加入蛋白洗涤液B;混匀、离心、弃上清;

[0036] 所述蛋白洗涤液A为去离子水或超纯水;蛋白洗涤液B为无水乙醇;

[0037] (3) 向步骤(2)获得的沉淀中加入蛋白溶解液A,二者的质量体积比为5-10mg:0.025-0.125mL,充分混匀后再加入与蛋白溶解液A相同体积的蛋白溶解液B,离心,取上清即为标准品;

[0038] 所述蛋白溶解液A为50%-80%的色谱级甲酸,蛋白溶解液B为色谱级乙腈。

[0039] 进一步地,步骤(1)中三株菌的质量比为4-7:1-4:1-2;步骤(2)和步骤(3)的离心均为10000-13000rpm,2-5min。

[0040] 优选地,步骤(1)中三株菌的质量比为5-6:1-3:1-2;步骤(2)和步骤(3)的离心均为12000rpm,2-3min。

[0041] 更优选地,步骤(1)中三株菌的质量比为5:2:1;步骤(2)和步骤(3)的离心均为12000rpm,2-3min。

[0042] 本发明提供的微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品,含有大肠杆菌(*Escherichia coli*)特征蛋白的质荷比m/z包括了目前国际上仅有的商业化微生物鉴定用质谱AXIMA Assurance、Microflex/Auto校正峰列表的全部肽序列。

[0043] 采用各自的校正参数,用本发明的标准蛋白肽质量谱进行校正,校正结果判断标准如下:

[0044] 德国布鲁克公司的Microflex/Auto基质辅助激光解析飞行时间质谱FlexControl采集软件中,本发明的标准品肽谱图与Calibration选项中Ecoil\_Standards列表中峰值匹配率达到该系统设定要求,自动校正通过,且偏差在300-500ppm之间,即为校正成功。

[0045] 日本岛津公司的AXIMA Assurance基质辅助激光解析飞行时间质谱Launchpad采

集软件中,本发明标准肽谱与Calibration references选项中ECAL alpha校正文件中各峰值匹配率达到系统设定要求,漏配峰不高于3个,偏差小于500ppm,即为校正成功。

[0046] 本发明基于基质辅助激光解析飞行时间质谱技术,通过对85株大肠杆菌肽质量谱的比对、对多种大肠杆菌的组合与优化,提供一种依据多种大肠杆菌的优化肽序列,以该序列谱为基础构建适用于目前商业化质谱微生物鉴定系统的校正标准品。本发明优化筛选出了3株大肠杆菌,经过配比优化确定了标准品母株组合及其最佳配比。进一步地,通过确定标准溶液的浓度与比例,提高标准品肽质量谱的敏感性。根据上述方法构建的质谱仪分子量校正标准品,其制备成本低廉、校正谱图优质、校正效果稳定,用于国际上商业化的、用于微生物鉴定的基质辅助激光解析飞行时间质谱仪,均能获得优质的校正谱图,校正效果、稳定性优于常规的校正方法,填补目前微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品商业化的国内空白,弥补了校正过程费时、费力且效果不稳定等不足之处,适合推广使用。

### 附图说明

[0047] 图1为9株目标菌株的肽质量谱(2000-20000Da),图中星标的MG1655、JM109、ATCC8739为选定的标准品母株。圈起部分为其被选为母株的特征部分。

[0048] 图2为Microflex系统谱图,其中A图为大肠杆菌8739按布鲁克公司蛋白处理流程采集的谱图;B图为本发明标准品的谱图。

[0049] 图3为标准蛋白稳定性测试谱图,图中1-12分别代表1-12个月。

### 具体实施方式

[0050] 以下实施例进一步说明本发明的内容,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0051] 若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。实施例中所用的试剂为市售。

[0052] 实施例1 标准品母株的优化与确定

[0053] 选择85株大肠杆菌菌株,包括标准菌株及野生株。采用FlexAnalysis软件对85株大肠杆菌的2000-20000Da的肽质量谱进行分析,从肽数目、覆盖范围、信噪比几方面对85株菌进行综合分析:肽数目大于50个,质荷比范围(2000-5000Da、5000-8000Da、8000-16000Da)具有优势,信噪比大于5的菌株被选定为母株,据此,锁定了9株目标菌株(图1)。根据肽谱质量范围分布将9株菌分为4组,通过优化各组分百分比确定最佳肽质量谱,最终确定3株菌MG1655、JM109、ATCC8739为标准品母株(图1)。ATCC8739、MG043、JM012三者的质量比例为3-8:1-5:1-3。通过实验发现,更优的质量比例为4-7:1-4:1-2,最优的质量比例为5-6:1-3:1-2。

[0054] 上述最佳配比的3株标准品母株混合后,其特征蛋白的质荷比m/z分别为:2094, 2466, 3149, 4364, 5095, 5380, 6241, 6254, 6315, 6410, 6856, 7157, 7273, 7872, 8368, 9742, 10137, 10299, 12227。

[0055] 实施例2 微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品的制备

[0056] (1) 蛋白溶解液甲酸百分比优化



[0057] 按比例取适量(5-10mg)标准品母株5:2:1(ATCC8739、MG1655、JM109)对数期菌落,加入0.1-0.5mL超纯水(即蛋白洗涤液A),仔细混匀;再加入与蛋白洗涤液A体积比5-2:1的无水乙醇(蛋白洗涤液B),仔细混匀。12,000rpm离心2分钟,弃去上清(必要时,再离心一次尽量去除乙醇和水)。加入0.25-0.125mL以下百分比的甲酸,仔细混匀,再加入0.25-0.125mL 100%的乙腈,仔细混匀,12000rpm离心2分钟,上清即为标准蛋白。在标准品蛋白制备过程中,蛋白溶解液中甲酸的浓度选择影响肽谱质量。将体系中甲酸浓度设定为40%、50%、60%、70%、80%、90%六个梯度进行优化。采用布鲁克公司的Micrflex LT质谱仪进行采样。固定激光强度为42,采集shots叠加总数为500。最终谱图的强度值显示50%-80%的甲酸浓度时,标准品肽质量谱强度在 $1.2-1.8 \times 10^4$ 之间,质量均较好,优以50%-70%的甲酸为最好,适合于校正用。

[0058] (2) 基质溶解液中三氟乙酸浓度优化

[0059] 标准蛋白在样本靶上与基质结合后的结晶状态,直接影响肽质量谱的质量。将基质溶解液中三氟乙酸浓度设定为0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%等8个梯度进行优化。采用布鲁克公司的Micrflex LT质谱仪进行采样。固定激光强度为42,采集shots叠加总数为500。根据各浓度的谱图强度评价确定最优浓度。0.5%-4.0%三氟乙酸对应的各谱图的强度依次为4000、8000、8000、12500、8000、8000、9000,2.0%的体系标准品与基质结晶状态最佳、采集速度最快、谱图理想。

[0060] (3) 本发明微生物鉴定用质谱仪分子量校正标准品的制备

[0061] 1) 选择大肠杆菌ATCC8739、MG1655、JM109,将三株菌培养至对数生长期后,收集菌株,按照质量比5:2:1将三者混合;

[0062] 2) 按照质量体积比5mg:0.2mL向三株大肠杆菌混合物中加入蛋白洗涤液A,再按照与蛋白洗涤液A的体积比3:1加入蛋白洗涤液B;混匀、离心、弃上清;

[0063] 所述蛋白洗涤液A为去离子水或超纯水;蛋白洗涤液B为无水乙醇;

[0064] 3) 向步骤2)获得的沉淀中加入蛋白溶解液A,二者的质量体积比为5mg:0.1mL,充分混匀后再加入与蛋白溶解液A相同体积的蛋白溶解液B,离心,取上清即为标准品成品;也可将上清按每管20 $\mu$ L分装冻干。上述蛋白溶解液A为50%-80%的色谱级甲酸,蛋白溶解液B为色谱级乙腈。

[0065] 实施例3 标准品校正效果评价

[0066] 取试剂盒中冻干的标准品1管,加入25 $\mu$ L蛋白溶解液A,振荡溶解后加入25 $\mu$ L蛋白溶解液B,混匀。用移液器取1 $\mu$ L标准品液,点于质谱样品靶板上,室温干燥后在蛋白标准品上覆盖1 $\mu$ L用基质溶解液制备的 $\alpha$ -氨基-4-羟基肉桂酸饱和溶液,室温干燥后进质谱。

[0067] (1) AXIMA系统

[0068] 采用岛津公司Launchpad采集软件进行数据采集。质谱参数设定:线性阳离子模式;采集的质荷比范围为2,000-20,000Da;激光频率,50.0Hz;延时提取,200ns;每个样本最少5个shots形成一张谱图。岛津公司标准的校正方法为直接涂抹新鲜培养的大肠杆菌ATCC8739菌落。由于基质 $\alpha$ -氨基-4-羟基肉桂酸与菌落直接结合,结晶均一性差,系统采集谱图较为困难,在相同的采集参数条件下,采用岛津公司提供的制备标准品的方法得到的标准品用于分子量校正,其获得谱图的时间为本发明标准品采集谱图方法的4-8倍。且谱图基线较高、在10000至14000Da范围内峰数目较本发明校正标准品明显减少,尤其大于

12000Da没有峰出现。

[0069] 在系统校正过程中,直接涂抹新鲜培养的大肠杆菌ATCC8739菌落作为标准品与系统内置校正参考谱的匹配情况不稳定:大肠杆菌8739菌落直接涂抹多次校正最佳的匹配是有2个校正峰无法匹配:6241.4、12227.3;本发明的校正标准品匹配稳定,最佳匹配为1个校正峰无法匹配6241.4。除去系统问题的6241.4,本发明的标准品校正质谱分子量的方法在分子量范围的12227.3Da有很好的匹配,这对微生物鉴定采集范围(2000-20000Da)内的校正非常关键。

[0070] (2) Microflex系统

[0071] 布鲁克公司的Microflex质谱系统,采用FlexControl软件进行数据采集。采集参数为:线性阳离子模式;采集的质量范围为2000-20000Da;源1电压,20kV,源2电压,18.5kV,透镜电压,8.45kV;延时提取,320ns;激光频率,20.0Hz,80shots采集一个样品结晶点,平均每个样本结晶点采集8次,共计640shots形成一张谱图。布鲁克公司推荐用大肠杆菌乙醇/甲酸预提取方法进行仪器校正,其提取方法是用300uL的超纯水悬溶一接种环菌落,而后加入900uL的无水乙醇,10000rpm离心3min,弃上清。在沉淀中加入100uL 70%的甲酸溶液、100uL乙腈,10000rpm离心3min,取上清。

[0072] 本发明采用发明实例2制得的标准品进行系统校正,相同采集条件下用本发明的标准蛋白进行系统校正和比较。从肽质量谱来看,布鲁克公司推荐的仪器校正方法谱图中的峰数目明显低于本发明的标准蛋白峰数目,尤其在大于10000Da的高分子量范围(图2)。布鲁克公司推荐的标准品校正偏差小于300ppm时,在微生物鉴定肽谱范围内有4个校正肽段没有匹配:4364、5095、7157、10137;本发明的标准蛋白在同样质量范围能全部匹配。

[0073] 实施例4 标准品稳定性评价

[0074] 将本发明实施例2制备的标准蛋白真空冻干后保存于-80℃冰箱内。每月定时抽取,用标准品溶解液A、标准品溶解液B按要求溶解,时长为1年。采用布鲁克公司的Microflex质谱系统、FlexControl软件进行数据采集。采集参数为:线性阳离子模式;质量范围为2000-20000Da;源1电压,20kV,源2电压,18.5kV,透镜电压,8.45kV;延时提取,320ns;激光频率,20.0Hz,100shots采集一个样品结晶点,平均每个样本结晶点采集5次。结果显示,在1年的时长内,标准蛋白谱没有显著变化,在相同的采集条件下,峰图、标准肽段峰强度均没有明显变化(图3),校正效果稳定。

[0075] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

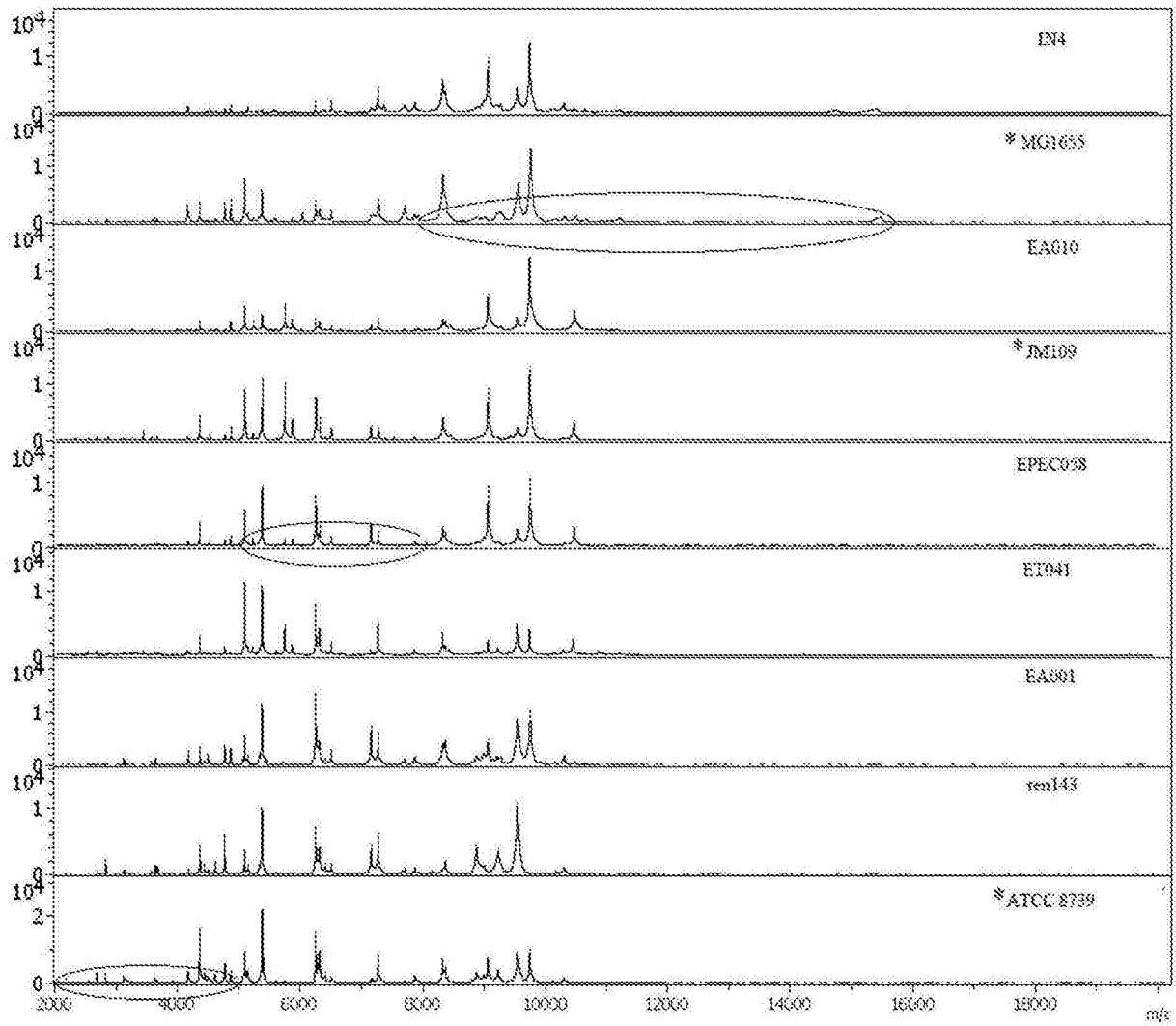


图1

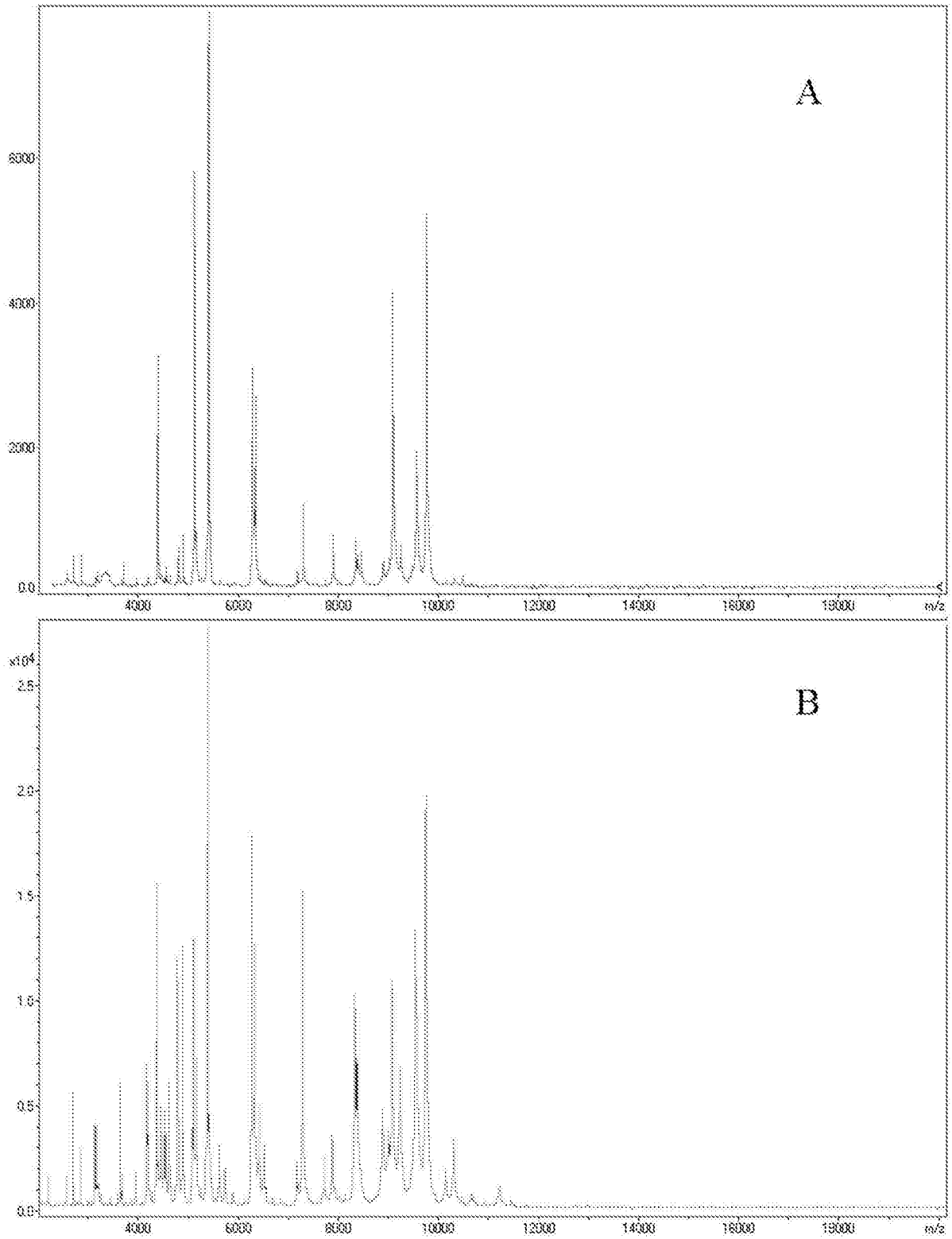


图2

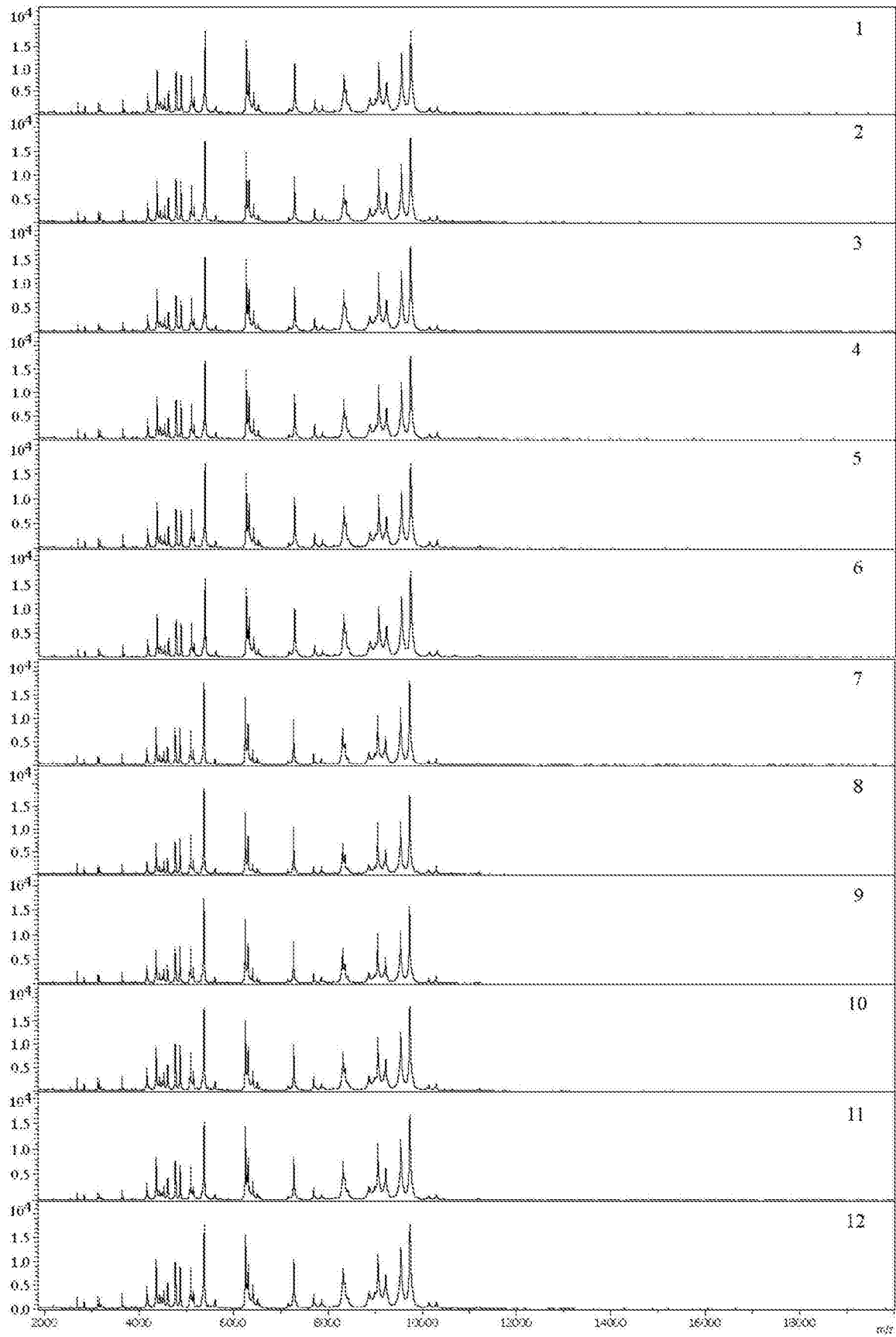


图3