

臨床檢體中致病菌的鑑定－毛細管電泳／串聯質譜儀的應用

Identification of Pathogens in Clinical Samples- Application of Capillary Electrophoresis-Selective Tandem Mass Spectrometry

林呈穎、何彥鵬

Cheng-Ying Lin, Yen-Peng Ho

利用質譜分析檢體這種複雜樣品是一個很大的挑戰，因為樣品中可能含有多種細菌或其他干擾物。在本研究中我們成功的利用資料庫，搜尋藉由細菌蛋白質萃取後消化所得到的毛細管電泳串聯質譜圖與病菌所特有的蛋白質比對，鑑定出檢體中所含有的病菌，34 個檢體分別是從尿液、痰、膿汁與創傷所獲得，而且已經使用生化方法確定其中皆含有革蘭氏陽性菌和革蘭氏陰性菌。利用選擇性串聯質譜的方法進行鑑定，所需的樣品直接由檢體中培養，沒有事先作純化，結果顯示與生化方法比較，可以高達 91% 的重複性，且如果扣除 2 個培養失敗的檢體，重複性可以高達 97%。

Analysis of microbial mixtures in complex systems, such as clinical samples, using mass spectrometry can be challenging because the specimens may contain mixtures of several pathogens or both pathogens and nonpathogens. We have successfully applied capillary electrophoresis-selective MS/MS of unique peptide marker ions to the identification of common pathogens in clinical diagnosis. The identified peptides that matched a protein associated with a particular pathogen were selected as marker ions to identify that bacterium in clinical specimens. Thirty-four clinical specimens, obtained from pus, wound, sputum, and urine samples, were analyzed using both biochemical and selective MS/MS methods. The bacteria in these clinical samples were cultivated directly, without prior isolation of a pure colony, before performing the selective MS/MS analyses. The match with respect to the pathogens identified was good between the biochemical and the selective MS/MS methods; the matching rate was 91%. The rate was as high as 97% when not considering two specimens where the bacteria were not grown successfully.

一、前言

微生物的檢驗對於傳染性疾病的診斷及環境中生化危險因子的偵測是很重要的^(1, 2)，目前用於鑑

定致病菌的方法可以區分為兩大類：顯型的 (phenotyping methods) 與基因型的 (genotyping)。基因型的技術如去氧核糖核酸聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 是將核酸 (nucleic

acid) 放大以偵測此物種的序列，顯型的測試是根據物種的生理性質與生化特性，這些特性可提供代謝的路徑及抗菌能力的相關訊息，但是這些傳統的方法通常都很繁雜且耗時。(3-5)

質譜 (mass spectrometry) 提供了一個鑑定微生物的新選擇，不管是利用基質輔助雷射脫附離子法 (MALDI) 或電噴灑離子化法 (ESI) 結合質譜分析微生物在近幾年 (2000 年後) 被廣泛的使用(6-8)。其中使用基質輔助雷射脫附離子質譜法直接分析細菌的好處包含：快速、靈敏度高、以單一電荷的訊號為主、對不同的樣品條件有較高的容忍度。但是對於一個複雜的微生物樣品，經過消化 (digestion) 以後就會產生很多胜肽 (peptide)，在此情況下基質輔助雷射脫附離子化質譜法所得到的圖譜就會變得很複雜，而使較低感度的胜肽會被忽略，導致實驗上的誤差，且要以基質輔助雷射脫附離子化質譜法作線上 (on-line) 分析 (包含前處理及分離)，比起電噴灑離子化質譜法相對上較為困難，而且不易自動化 (automation)。相對的，電噴灑離子化質譜法可以藉由連接微透析 (microdialysis)、固相萃取 (solid phase extraction)、液相層析法 (liquid chromatography)、毛細管電泳 (capillary electrophoresis) 就可以達到線上純化 (purification)、分離、濃縮 (concentration) (9-13)，即使電噴灑離子化質譜較少被使用在微生物的鑑定，但其仍是一個分析複雜系統很有效的工具。

一般來說，利用蛋白質的相關資訊來鑑定微生物最大的問題是：質譜圖的再現性及難以鑑定混合細菌樣品。為了解決再現性的問題，有一些研究團隊在萃取微生物樣品中的蛋白質後，利用酵素進行消化並以串聯質譜 (tandem MS) 得到序列訊息後輸入資料庫，以推斷微生物體的來源及進行蛋白質鑑定(14, 15, 16)。近來有一個利用毛細管電泳分離、選擇特定胜肽進行二次質譜的方法，可以精確的鑑定混合的細菌樣品(17-19)，這種方法與傳統的選擇反應偵測 (selected reaction monitoring, SRM)(20-24) 相似，差別只在於分子量偵測的範圍。結果顯示將質譜與層析的儀器，如毛細管電泳、液相層析儀連接，分析混合物中的成分，是一個具有高選擇性的方法。因此我們將有興趣的致病菌經過蛋白質萃取後進行消

化，再利用毛細管電泳層析串聯質譜儀 (CE-MSMS) 進行分析。在沖提的過程中，我們也可以選擇在特定時間沖提出的胜肽作串聯質譜，而這段胜肽所相對應的蛋白質必須是只有目標病菌才擁有的，所以藉由這個生物標記和資料庫比對，就可以鑑定細菌混合物中的單一菌種。

經由毛細管電泳分離，可避免質重相同的胜肽被同時沖提出來，因此選擇作為串聯質譜儀分析的特定胜肽片段較不可能為混合物，在複雜的串聯質譜資料中這類混合物可能會造成一些資料庫的比對失敗的情形。另外，有些蛋白質可能同時存在於不同的細菌中，或是不同的蛋白質序列中，一部分的胜肽序列會有雷同，進而導致串聯質譜儀資料可能出現微生物的多重辨識或是錯誤辨識。經由資料庫比對，初步分析純的細菌，我們可以找出一些多重或是錯誤的辨識，並且排除這類胜肽以利選擇性串聯質譜分析。

在本研究中，以生化方法鑑定三十四項臨床樣品，同時利用選擇性毛細管電泳層析串聯質譜方法，直接分析沒有前處理過的上述樣品中的細菌。我們以選擇性毛細管電泳層析串聯質譜儀同時偵測八種細菌，之後比較生化與質譜方法的分析結果。

二、細菌樣品製備

所有的細菌培養、處理皆在生物防護等級二 (BLS2) 的實驗室中進行。實驗用的細菌分為兩種，一為單一的細菌樣品，一為臨床樣品。單一成分的細菌樣品包含了糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、沙門氏桿菌 (*Salmonella typhimurium*)、腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、無乳鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 與化膿性鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 等，其中糞腸球菌、大腸桿菌、綠膿桿菌、沙門氏菌與腸炎弧菌是直接於 LB 培養液中培養，並且維持溫度在攝氏 37 度 24 小時，而其他的細菌，如金黃色葡萄球菌、無乳鏈球菌、表皮葡萄球菌與化膿性鏈球菌，是直接於 tryptic soy 培養液

中培養，並且在培養液中加入 0.5% 酵母萃取物 (TSBY)，維持溫度在攝氏 37 度 24 小時。在細菌培養完成後先用水清洗 3 次後，放入沸水中加熱 10 分鐘，以除去細菌的致病力，最後用乾燥設備 (lyophilizer) 除去溶液中的水，在放入攝氏 -20 度冰箱保存。除此之外，臨床檢體為 2004—2005 年度間由花蓮慈濟醫院細菌部門提供，樣品包含尿液、痰、膿汁與創傷，並且先用生化的方法鑑定出這些樣品都含有革蘭氏陽性菌 (gram positive) 和革蘭氏陰性菌 (gram negative) 的物種，然後直接放入 tryptic soy 培養液中培養，並且在培養液中加入 0.5% 酵母萃取物，維持溫度在攝氏 37 度 6 小時，培養完成後一樣用水清洗 3 次，且放入沸水中 10 分鐘後離心。不管是單一成分的細菌樣品或是臨床樣品，在使用的時候都是先用水作萃取後離心，並取 1 微升 (μL) 的澄清液過濾，使用 YM3 除去溶液中的鹽類後抽乾。在作蛋白質水解時，將萃取完成的蛋白質溶於 5 微升的 55 毫體積莫耳濃度、酸鹼值為 8.5 的碳酸氫銨 (ammonium bicarbonate) 的緩衝溶液中，並在溶液中加入 0.5 微升 0.1 毫體積莫耳濃度的胰蛋白酶 (trypsin) 攪拌均勻後，放入最大輸出為 600 瓦的家用微波爐 15 分鐘，以加速消化進行⁽²⁵⁾。最後放入分離式離心濃縮機中除去溶液，再以 1 微升水回溶即完成。

三、生化鑑定

所有的臨床樣品先根據革蘭氏染色法 (gram stain) 分為革蘭氏陽性菌與革蘭氏陰性菌，並且利用一般生化實驗室的實驗流程對蘭氏陽性菌與革蘭氏陰性菌作菌種鑑定⁽²⁶⁾。

四、毛細管電泳分析

本實驗乃利用自製的毛細管電泳系統，其中裝置有電源供應器 (型號 PS/EH30R03.0, Glassman High Voltage, Inc., Whitehouse Station, NJ)、一組安捷倫科技股份有限公司出產的聚乙烯醇 (poly(vinyl alcohol)) 包覆毛細管 (100 公分 \times 75 微米內徑 \times 380 微米外徑)，進樣為氣壓注射 (一百毫巴持續五秒

鐘)，全程溫度維持在攝氏二十五度，且供給電壓為兩萬伏特。緩衝液為百分之七十的十毫體積莫耳濃度的醋酸胺，以及百分之三十的十毫體積莫耳濃度醋酸，酸鹼值為四點八。毛細管在第一次使用前以水及緩衝液各平衡三十分鐘，並且在接下來每次進行之間同樣各平衡五分鐘。

五、質譜分析

結合電噴灑離子化法 (ESI) 及離子阱 (ion trap) 質譜儀，毛細管電泳直接經由 Finnigan coaxial sheath flow 介面連接，儀器相關的參數設定如下：電噴灑電壓 (spray voltage) 維持在 4 千伏、毛細管電壓 (capillary voltage) 27 伏特、加熱毛細管溫度攝氏 200 度。鞘流氣體 (sheath gas) 的流速設定：如果實驗使用數據相關模式 (data dependent experiments) 為 20，若使用選擇性串聯質譜模式 (selective MS/MS experiments) 為 40，用於進樣的鞘流液體 (sheath liquid) 為 50% 甲醇內含 0.5% 醋酸，進樣的速度為每分鐘 4 微升。質譜相關的操作都是透過 Xcaliber 軟體，且是以正電模式作圖譜收集。

另外，自動補償控制 (automatic gain control) 維持在 5×10^8 ，微掃描 (microscan) 數為 3，最大注射時間設定為 200 毫秒 (ms)。當使用數據相關模式時，質譜偵測的分子量範圍定為 400 m/z 至 2000 m/z ，並且對訊號強度前三名的訊號峰作串聯質譜，串聯質譜的碰撞能量 (collision energy) 為 42% 維持 30 毫秒。在選擇性串聯質譜模式中，圖譜收集是使用選擇反應偵測模式 (selective reaction monitoring)，且偵測範圍是根據可以容納選擇的離子及其斷裂的碎片為主。這種選擇性串聯質譜模式與一般的選擇反應偵測模式差別在於選擇性串聯質譜模式偵測從分子離子 (molecular ions) 解離的所有碎片離子 (product ions)。假設使用了選擇性串聯質譜模式同時偵測 8 個離子，質譜在有效工作週期內會對這 8 個離子輪流且重複作串聯質譜。

在臨床樣品中，我們利用了選擇性串聯質譜找到了與糞腸球菌、綠膿桿菌、沙門氏菌、金黃色葡萄球菌、無乳鏈球菌、表皮葡萄球菌、化膿性鏈球菌與腸炎弧菌相關的標記離子 (marker ions)。另

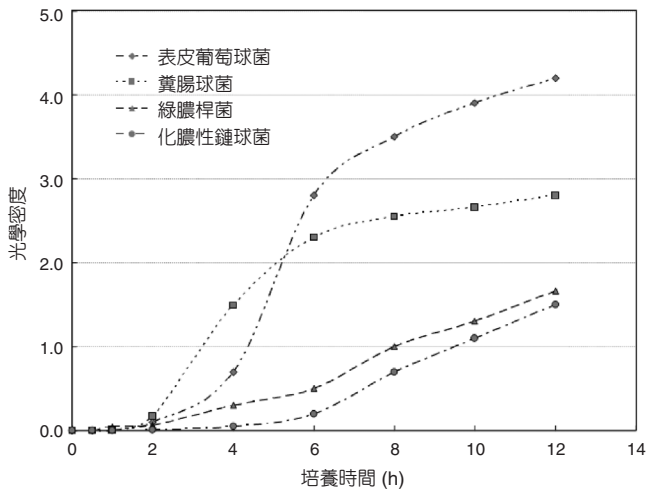


圖 1. 各種細菌在不同培養時間下，於 600 nm 波長處的光學密度。

外，也使用基質輔助雷射脫附離子化飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF MS) 來比較臨床樣品與純菌種培養而得到的質譜差異，基質配製是利用阿魏酸 (ferulic acid, FA) 加上 33 比 50 比 17 的氰甲烷 (acetonitrile)、水與甲酸 (formic acid)，阿魏酸的濃度約 50 mM。

六、資料庫搜尋

將實驗得到的串聯質譜圖，利用 SEQUEST 在美國國家生物科技資訊中心 (National Center Biotechnology Information, NCBI) 資料庫進行搜尋。在數據相關模式時，前驅離子 (precursor ions) 和碎片離子 (fragment ions) 的質量容忍度 (mass tolerances) 為 2.5，且對一價的胜肽交叉相關性分數 (xcorr scores) 必須要大於 1.8；對二價的胜肽交叉相關性分數必須要大於 2.2；對三價的胜肽交叉相關性分數必須要大於 3.3 的胜肽才會被視為合理的鑑定。除此之外，這些胜肽的碎片離子必須是合理的訊號，由這些胜肽可推得蛋白質及有機體的來源。

七、結果與討論

在臨床樣品中的細菌我們直接使用選擇性串聯

質譜作分析，在一開始研究得到等量的標的細菌所需最少的時間。在圖 1 中於不同時間量測表皮葡萄球菌、糞腸球菌、綠膿桿菌與化膿性鏈球菌在培養 0.5 小時至 12 小時的光學密度 (optical densities, OD)，光學密度越高表示單位內細菌菌落越多，在圖 1 中化膿性鏈球菌與其他種細菌作比較，發現有較小的光學密度值，那就表示它較難以培育。在培育 4 小時以後將表皮葡萄球菌、化膿性鏈球菌經過細胞萃取及消化後，經由選擇性串聯質譜儀分析，並且根據交叉相關性分數很成功的鑑定出表皮葡萄球菌、化膿性鏈球菌分數為 2.7 與 2.0。其中對表皮葡萄球菌來說，培養 2 小時就可以以 1.6 的交叉相關性分數被比對出來，相對的，化膿性鏈球菌不行，主要也是因為化膿性鏈球菌相對於其他種病原體是較難被培養的。我們認為培養 4 小時應是菌落放大分析所需最長的時間。

在臨床樣品的部分，我們培養六小時，因為臨床樣品中所含的細菌數量可能差異非常大，通常在培養六小時後可得到細菌的量遠超過分析一次所需的用量，不論 4 或 6 小時，相較於傳統培養方法的 1 至 2 天，我們所需的時間已縮短很多。

將九個純的細菌萃取出來的蛋白質在消化過後利用毛細管電泳進行分離，再進行選擇性串聯質譜分析得到的串聯質譜圖 (MS/MS spectra)。圖 2 為糞腸球菌在數據相關模式下全離子 (total ion) 的層析圖，我們將實驗所有的串聯質譜圖透過美國國家生

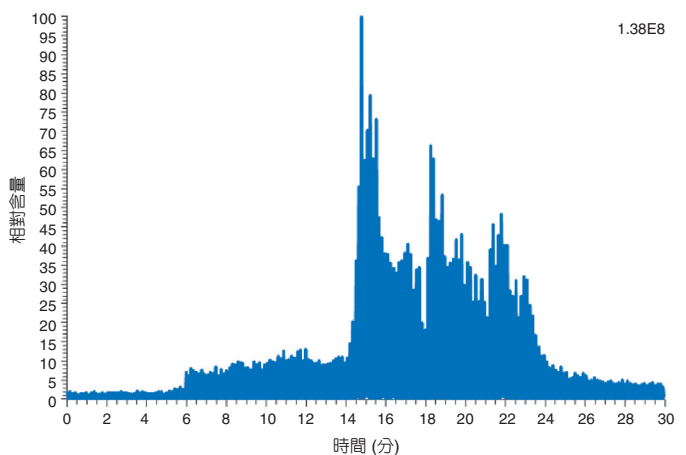


圖 2. 糞腸球菌利用毛細管電泳串聯質譜儀及數據相關模式得到的全離子層析圖。

表 1. 在數據相關模式中找到細菌含有的特有胜肽片段。

細菌	實驗分子量 (價數)	序列	對應蛋白質	理論分子量	胜肽位置
金黃色葡萄球菌	1076.52 (+1)	-.ETVGNVTDNK.-	hypothetical protein	6996	16–25
	1262.60 (+1)	-.SGEESVLVADK.-	hypothetical protein	21243	92–103
表皮葡萄球菌	1040.49 (+2)	-.YGPVDGDPITSTEEIPFDK.-	accumulation-associated protein	157025	1086–1104
	949.99 (+2)	-.AHLVDLAQHNPEELNAK.-	immunodominant antigen A	24514	37–53
綠膿桿菌	1638.79 (+1)	-.IEDTDFAAETANLTK.-	flagellin	34341	307–321
	1036.04 (+2)	-.TVIHDTNAPAAIGTYSQAIK.-	conserved hypothetical protein	13583	4–23
化膿性鏈球菌	1087.56 (+1)	-.EAVEGAVDVAVK.-	hypothetical protein SPy2005	6939	52–62
	1374.69 (+1)	-.HGELLSEYDALK.-	M protein	11914	54–65
沙門氏桿菌	1968.99 (+1)	-.AQPDLAEAAATTTENPLQK.-	phase 1 flagellin	41275	340–358
	1272.67 (+2)	-.TLHLADSELSEEALIQALVEHPK.-	putative arsenate reductase	13351	70–92
沙門氏桿菌	1451.74 (+1)	-.DFHVVAETGIHAR.-	phosphocarrier protein of the PTS	8916	5–17
	1521.80 (+1)	-.TVGDLVAYVEEQAK.-	Acyl carrier protein	8245	61–74
大腸桿菌	1833.97 (+1)	-.EAAIQVSNVAIFNATTGK.-	50S ribosomal protein L24	11321	62–79
	1681.78 (+1)	-.EAIGYADSVHDYVSR.-	Bacterioferritin	18495	103–117
糞腸球菌	955.93 (+2)	-.TLEEGQAVTFDVEDSDR.-	cold-shock domain family protein	4949	29–45
	1935.93 (+1)	-.TLEEGQAVTFEIEEGQR.-	cold-shock domain family protein	7163	40–56
無乳鏈球菌	1308.67 (+1)	-.VTVEVTYPDGTK.-	alpha like protein 4	38597	286–297
	1073.55 (+1)	-.DAVEGAVDVAVK.-	hypothetical protein	6999	52–62

物科技資訊中心資料庫進行蛋白質及菌種比對，如果這些胜肽經由比對結果得到可信任的蛋白質及微生物，即認定此段胜肽是該物種的生物標記。但是當選擇生物標記時必須考量到，用來進行資料庫比對的胜肽必須是該細菌唯一的，因為如果選擇當生物標記的胜肽出現在不同菌種的話，那麼作資料庫比對的時候，就會比對到其他的菌種，而造成鑑定上的困難。在表 1 中列出利用數據相關模式所找到的生物標記胜肽及其相對應的蛋白質。

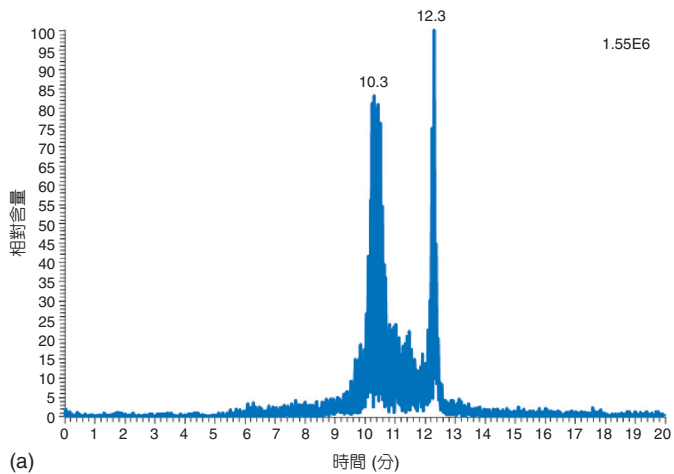
目前已經有很多致病菌的基因組被定序，因此有越來越多的微生物蛋白質資料庫供人使用。於是我們利用上述的實驗方法，針對獨特的胜肽進行選擇性質譜偵測及資料庫比對後，得到致病菌中獨特的蛋白質，並鑑定出細菌，因為此蛋白質只在標的致病菌中出現，所以利用胜肽進行比對的時候，只要鑑定出此蛋白質，就表示會有該種致病菌存在。

圖 3(a) 為將尿液樣品經由蛋白質萃取消化後，利用選擇性毛細管電泳串聯質譜法所得到的層析圖。經由質譜偵測得到在 10.3 分鐘與 12.3 分鐘出現胜肽的分子量為 955.9 (二價) 與 1935.9 (一

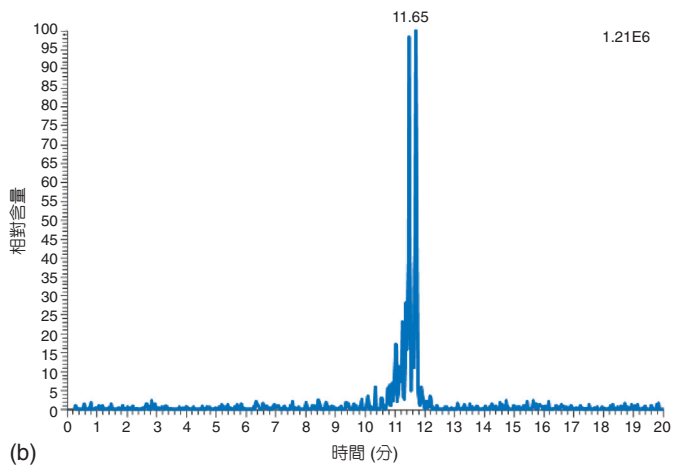
價)，剛好與表 1 的糞腸球菌中選用來當生物標記的胜肽分子量相同，而且其串聯質譜圖經由蛋白質資料庫搜尋的結果，得到相當高的交叉相關性分數，分別為 4.7 與 3.9，所以確定選擇的胜肽的確是糞腸球菌所擁有。

利用毛細管電泳質譜儀 (CE-MS) 可以用來尋找與多種細菌樣品相關的生物標記。圖 3(b) 為包含糞腸球菌的八種物種相關的八種離子藉由選擇性離子層析法分離得到的層析圖，其中 11.65 分鐘出現胜肽的分子量為 955.9 (二價)，一樣是屬於糞腸球菌的生物標記。目前的軟體最多可以同時偵測 8 個特定離子，我們將這個 955.9 (二價) 的離子作串聯質譜分析而得到圖 3(c)，經由資料庫比對出其序列為 TLEEGQAVTFDVEDSDR，且為與糞腸球菌相關的冷休克蛋白質 (cold-shock protein)。

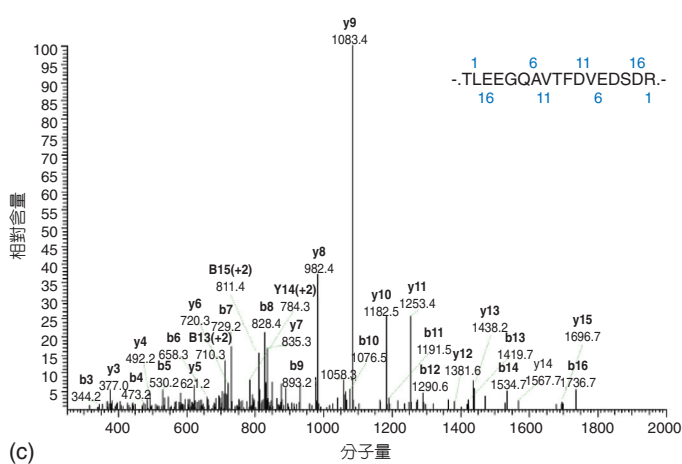
雖然臨床樣品中疾病相關的致病菌在培養後會大量生長，但是不意外的是，在臨床樣品中仍然會有其他的細菌存在。為了說明樣品複雜度的影響，在圖 4 中將臨床樣品及純的無乳鏈球菌直接用基質輔助雷射脫附離子飛行時間質譜儀分析，雖然在純



(a)



(b)



(c)

圖 3. (a) 在臨床尿液樣品萃取出糞腸球菌，利用胰蛋白酶消化後，以毛細管電泳串聯質譜分析。其中標示的兩個波峰分子量分別為 955.9 (二價) 及 1935.9 (一價)。(b) 包含糞腸球菌等八種病原體所相關的八種離子中只有屬於糞腸球菌的 955.9 二價分子量訊號被偵測到。(c) 對分子量 955.9 的訊號做串聯質譜經由資料庫比對的結果得到序列為 TLEEGQAVTFDVEDSDR。

的樣品中出現的分子量訊號都同時出現在臨床樣品中，但是兩張圖譜有明顯的差別，這樣會造成臨床樣品鑑定上的困難，但是如果利用選擇性毛細管電泳串聯質譜先挑選標的勝肽再進行分析的話，就可以降低樣品中其它細菌的干擾。在圖 5(a) 中將包含化膿性鏈球菌的臨床樣品作蛋白質萃取、消化，最後用毛細管電泳串聯質譜儀分析，針對八個與細菌相關的離子作選擇性偵測，其中分子量為 1308.7 的離子，由於作串聯質譜 (圖 5(b))，且藉由資料庫的比對，得到交叉相關性分數為 2.5 且序列為 VTVEVTYPDGTK，證明這段勝肽為化膿性鏈球菌的生物標記。

我們也選擇一個經由生化方法鑑定出含有金黃色葡萄球菌、綠膿桿菌的化膿樣品，利用選擇性串聯質譜儀分析。在圖 6(a) 中，滯留時間在 11 分鐘至 11.6 分鐘出現的訊號為金黃色葡萄球菌相關的離子，經由資料庫的比對，得到其分子量為 1076.5、序列為 ETVGNVTDN (圖 6(b))，交叉相關性分數為 2.3。而在 11.6 分鐘到 12.2 分鐘出現的訊號為綠膿桿菌相關的離子，經由資料庫的比對，得到其分子量為 1638.8、序列為 IEDTDFAAETANLTK，交叉相關性分數為 3.1 (圖 6(c))。

在表 2 中，將 34 個臨床樣品的細菌利用選擇性串聯質譜儀把它們的生物標記給鑑定出來，結果如表 2 所示。在表中有兩個細菌培養失敗可能是因為在樣品中的細菌已經死掉了。比較值得注意的是，在 11 號的細菌，利用生化方法只能鑑定到

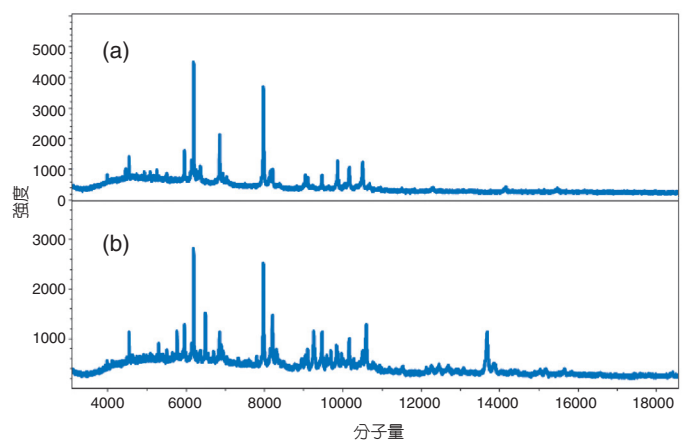


圖 4. 無乳鏈球菌由 (a) 細菌直接培養及 (b) 臨床樣品獲得利用基質輔助雷射脫附質譜儀分析。

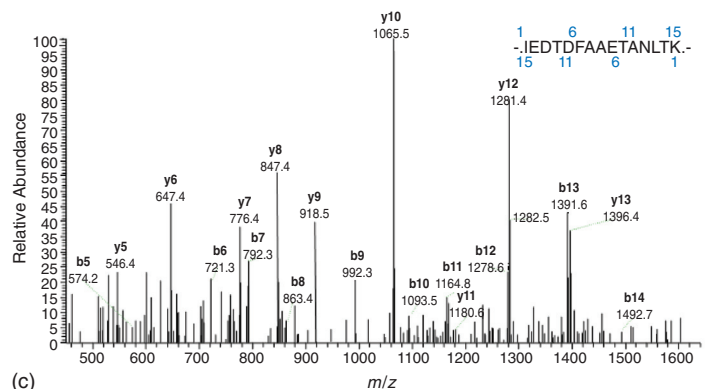
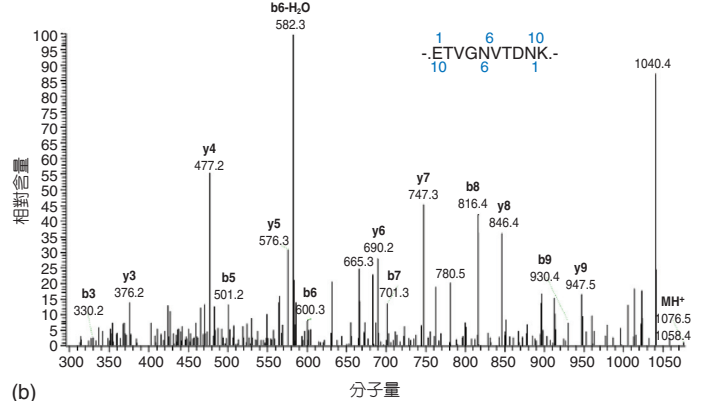
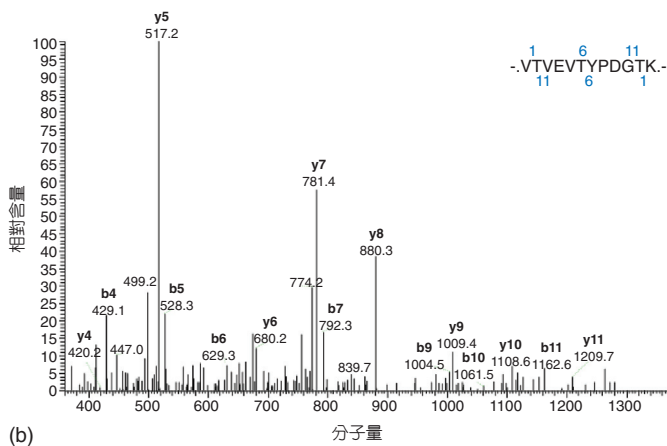
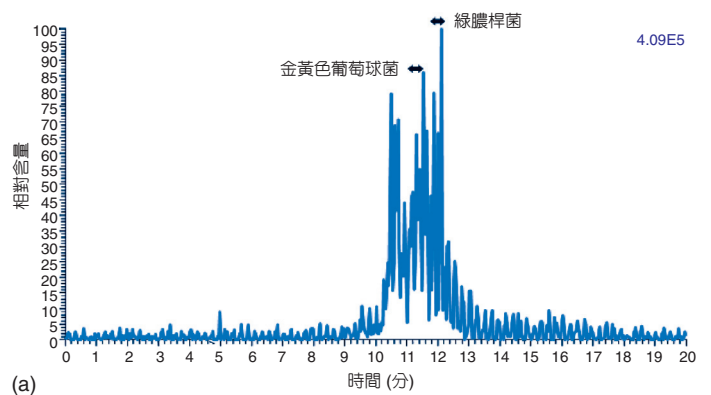
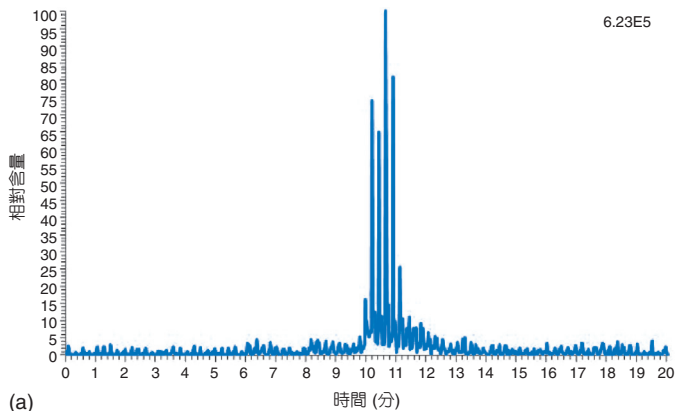


圖 5. (a) 包含無乳鏈球菌等八種致病菌所相關的八種離子利用選擇性毛細管電泳串聯質譜儀分析的層析圖。(b) 將與無乳鏈球菌相關的分子量 1308 的訊號作串聯質譜後利用資料庫比對得到序列為 VTVEVTPDGTK。

「屬」的等級，但是使用選擇性串聯質譜儀就可以鑑定出沙門氏桿菌，且高達 97% 的細菌不管是利用傳統的生化方法還是使用毛細管電泳串聯質譜都可以被鑑定出來。目前我們只能利用這種選擇性串聯質譜的方法鑑定到物種的層級，一般來說，在不同基因組蛋白質在品種 (strain) 會有些微的差距，但是如果可利用實驗發現這個與品種有關的生化標記，應該就可以把細菌鑑定縮小至品種的層級。

一般用質譜都是根據圖譜來偵測微生物，這個圖譜可能包含了蛋白質質量或標記的質量，但是如果微生物樣品為混合物，那麼此圖譜就會變得複雜，而使得偵測結果變得不精確。一旦使用了選擇性串聯質譜分析細菌相關的生物標記胜肽，不只可以獲得胜肽分子量的資訊，而且連它們相關的序列

圖 6. (a) 利用選擇性毛細管電泳質譜儀分析包含金黃色葡萄球菌與綠膿桿菌的生物標記，其中金黃色葡萄球菌生物標記的分子量為 1076.5，綠膿桿菌生物標記的分子量為 1638.8。(b) 將金黃色葡萄球菌相關的生物標記作串聯質譜，經由資料庫比對得到的序列資訊。(c) 將綠膿桿菌相關的生物標記作串聯質譜，經由資料庫比對得到的序列資訊。

也可以知道，即使是多種細菌的混合物樣品，這個方法仍然可以鑑定其中所包含的細菌。

我們利用一次毛細管電泳結合質譜的實驗找出

了九個細菌相關的細菌生物標記，雖然根據儀器的設定可以同時監測十二個離子，但是當電腦監測超過 8 個離子時會停止工作，所以如果需要監測超過 8 個離子的話，就必須要再作第二次的毛細管電泳串聯質譜儀。這個方法對於微生物的鑑定很有幫助，不管是棉棒樣品、膿汁樣品還是傷口樣品都可以使用。除此之外，利用毛細管電泳質譜分析法分析所需的時間只要三十分鐘左右，時間很短，所以對於分析多個樣品(超過八個)時也是很方便的。但是若包含細菌培養、蛋白質消化、數據分析，所需要的時間則大約八小時，其中最花時間為細菌培養，大約 6 小時。至於蛋白質消化的部分，我們使用微波輔助十五分鐘以加快反應進行，雖然這個方法不像其他質譜相關方法一樣那麼快速，但是它很明顯的可以精確的鑑定細菌，並且可以利用於細菌的混合物。

八、結論

我們成功的將檢體直接培養後，使用選擇性毛細管電泳串聯質譜儀鑑定所含有的致病菌，並且經由資料庫的比對得到可信度很高的結果，在真實樣品中，除了兩件樣品培養失敗以外，與傳統的生化方法作比較高達 97% 重複性，證明這個方法是一個用於鑑定檢體中致病菌的好方法。在未來我們將利用這選擇性串聯質譜儀來區分不同菌品種間的差異。

參考文獻

1. M. Wilson, *Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease*; New York: Cambridge University Press (2005).
2. C. Fenselau, ed., *Mass Spectrometry for the Characterization of Microorganisms*, Washington, DC: American Chemical Society (1994).
3. S. Ammor, C. Rachman, S. Chaillou, H. Pervost, X. Dousset, M. Zagorec, E. Dufour, and I. Chevallier, *Food Microbiol.*, **22**, 373 (2005).
4. P. S. M. Yeung, C. L. Kitts, R. Cano, P. S. Tong, and M. E. Sanders, *J. Appl Microbiol.*, **97**, 1095 (2004).
5. R. D. Wagner, D. D. Paine, and C. E. Cerniglia, *J. Appl Microbiol.*, **94**, 1098 (2003).

表 2. 利用選擇性串聯質譜法鑑定臨床樣品的結果。

編號	細菌	革蘭氏菌種	來源	標記肽分子量 (m/z)	交叉相關性分數	鑑定 ^b
1	糞腸球菌	陽性	膿汁	955.93	3.9255	+
2	大腸桿菌	陰性	膿汁	1833.97	2.7110	+
3	大腸桿菌	陰性	膿汁	1833.97	2.1852	+
4	大腸桿菌	陰性	尿液	1833.97	2.0233	+
5	大腸桿菌	陰性	尿液	1833.97	1.0822	-
6	綠膿桿菌	陰性	唾液	1638.79	3.0127	+
7	綠膿桿菌	陰性	唾液	1638.79	2.3362	+
8	綠膿桿菌	陰性	唾液	1638.79	2.4052	+
9	綠膿桿菌	陰性	唾液	1638.79	2.7347	+
10	綠膿桿菌	陰性	唾液	1638.79	2.9643	+
11	沙門氏桿菌 ^a	陰性	膿汁	1968.99	2.1326	+
12	金黃色葡萄球菌	陽性	唾液	1076.52	1.9927	+
13	金黃色葡萄球菌	陽性	唾液	1076.52	1.8878	+
14	金黃色葡萄球菌	陽性	唾液	1076.52	3.2274	+
15	金黃色葡萄球菌	陽性	唾液	1076.52	3.0217	+
16	金黃色葡萄球菌	陽性	唾液	1076.52	2.5541	+
17	金黃色葡萄球菌	陽性	唾液	1076.52	2.2627	+
18	金黃色葡萄球菌	陽性	唾液	1076.52	-	培養失敗
19	表皮葡萄球菌	陽性	創傷	1040.49	-	培養失敗
20	表皮葡萄球菌	陽性	創傷	1040.49	2.4334	+
21	表皮葡萄球菌	陽性	創傷	1040.49	2.5592	+
22	無乳鏈球菌	陽性	創傷	1308.67	2.5143	+
23	無乳鏈球菌	陽性	膿汁	1308.67	2.4174	+
24	無乳鏈球菌	陽性	尿液	1308.67	2.0023	+
25	肺炎鏈球菌	陽性	唾液	1451.74	3.6754	+
26	肺炎鏈球菌	陽性	唾液	1451.74	2.0167	+
27	肺炎鏈球菌	陽性	唾液	1451.74	3.0872	+
28	肺炎鏈球菌	陽性	唾液	1451.74	3.0996	+
29	肺炎鏈球菌	陽性	唾液	1451.74	3.0574	+
30	化膿性鏈球菌	陽性	膿汁	1087.56	2.4158	+
31	化膿性鏈球菌	陽性	膿汁	1087.56	1.8617	+
32	化膿性鏈球菌	陽性	膿汁	1087.56	2.0330	+
33	金黃色葡萄球菌 +綠膿桿菌	陽性 +陰性	膿汁	1076.52 & 1638.79	2.3385 & 3.0979	+
34	大腸桿菌 +綠膿桿菌	陰性 +陽性	尿液	1833.97 & 1638.79	2.5079 & 3.0397	+

a 利用選擇性串聯質譜法鑑定出來為沙門氏桿菌。

b + : 鑑定成功；- : 鑑定失敗。

6. B. L. M. van Baar, *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 193 (2000).
7. J. O. Lay, Jr., *Mass Spectrom. Rev.*, **20**, 172 (2001).
8. C. Fenselau and P. A. Demirev, *Mass Spectrom. Rev.*, **20**, 157 (2001).
9. C. L. Liu, S. A. Hofstadler, J. A. Bresson, H. R. Udseth, T. Tsukuda, R. D. Smith, and A. P. Snyder, *Anal. Chem.*, **70**, 1797 (1998).
10. R. D. C. E. Estrela, M. C. Salvadori, and G. Suarez-Kurtz, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 1147 (2004).
11. A. Pruvost, I. Ragueneau, A. Ferry, P. Jaillon, J. M. Grognet, and H. Benez, *J. Mass Spectrom.*, **35**, 625 (2000).
12. A. Zamfir, D. G. Seidler, E. Schonherr, H. Kresse, and J. Peter-Katalinic, *Electrophoresis*, **25**, 2010 (2004).
13. G. M. Janini, T. P. Conrads, K. L. Wilkens, H. J. Issaq, and T. D. Veenstra, *Anal. Chem.*, **75**, 1615 (2003).
14. P. A. Demirev, Y. P. Ho, V. Ryzhov, and C. Fenselau, *Anal. Chem.*, **71**, 2732 (1999).
15. B. Warscheid, K. Jackson, C. Sutton, and C. Fenselau, *Anal. Chem.*, **75**, 5608 (2003).
16. B. Warscheid and C. Fenselau, *Anal. Chem.*, **75**, 5618 (2003).
17. A. Hu, P. J. Tsai, and Y. P. Ho, *Anal. Chem.*, **77**, 1488 (2005).
18. R. Craig, J. P. Cortens, and R. C. Beavis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 1844 (2005).
19. B. Kuster, M. Schirle, P. Mallick, and R. Aebersold, *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.*, **6**, 577 (2005).
20. R. C. King, R. Gundersdorf, and C. L. Fernandez-Metzler, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 2413 (2003).
21. N. Barbarin, D. B. Mawhinney, R. Black, and J. Henion, *J. Chromatogr. B*, **783**, 73 (2003).
22. J. Zweigenbaum and J. Henion, *Anal. Chem.*, **72**, 2446 (2000).
23. J. M. Onorato, J. D. Henion, P. M. Lefebvre, and J. P. Kiplinger, *Anal. Chem.*, **73**, 119 (2001).
24. H. W. Zhang and J. Henion, *J. Chromatogr. B*, **757**, 151 (2001).
25. S. S. Lin, C. H. Wu, M. C. Sun, C. M. Sun, and Y. P. Ho, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 581 (2005).
26. P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover, ed. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed., Washington, D.C.: American Society for Microbiology (2003).

-
- 林呈穎先生為國立東華大學化學系碩士班學生。
 - 何彥鵬先生為美國凱斯西儲大學化學博士，現任國立東華大學化學系教授。
 - Cheng-Ying Lin is a M.S. student in the Department of Chemistry at National Dong Hwa University.
 - Yen-Peng Ho received his Ph.D. in chemistry from Case Western Reserve University, USA. He is currently a professor in the Department of Chemistry at National Dong Hwa University.