

基于MALDI-TOF-MS技术快速鉴定灵芝的可行性研究

张树振¹, 房霞¹, 王春雷¹, 李淑静¹, 刘晋¹, 李越峰²

¹聊城市检验检测中心, 山东 聊城

²安图实验仪器(郑州)有限公司, 河南 郑州

收稿日期: 2024年9月19日; 录用日期: 2024年10月25日; 发布日期: 2024年10月31日

摘要

目的: 探讨利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术快速鉴定灵芝的可行性。方法: 采集灵芝菌丝、子实体、孢子样本后, 用Autof ms800全自动微生物质谱检测系统检测, Autof Acquirer进行分析处理。结果: 经过检测, 得到了灵芝的蛋白指纹图谱。其蛋白指纹图谱可以分为四部分: 菌丝图谱、产孢子前子实体图谱、产孢子后子实体图谱、孢子图谱。以此初步建立数据库后, 可快速鉴定未知样本是否为本品种灵芝。结论: MALDI-TOF-MS技术快速鉴定灵芝具有可行性。

关键词

灵芝, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS), 鉴定

Feasibility Study of Rapid Identification of *Ganoderma lucidum* Based on MALDI-TOF-MS Technique

Shuzhen Zhang¹, Xia Fang¹, Chunlei Wang¹, Shujing Li¹, Jin Liu¹, Yuefeng Li²

¹Liaocheng Inspection and Examination Center, Liaocheng Shandong

²Autobio Labtech Instruments (Zhengzhou) Co., Ltd., Zhengzhou Henan

Received: Sep. 19th, 2024; accepted: Oct. 25th, 2024; published: Oct. 31st, 2024

Abstract

Objective: To explore the feasibility of rapid identification of *Ganoderma lucidum* by using MALDI-TOF-

文章引用: 张树振, 房霞, 王春雷, 李淑静, 刘晋, 李越峰. 基于 MALDI-TOF-MS 技术快速鉴定灵芝的可行性研究[J]. 食品与营养科学, 2024, 13(4): 384-390. DOI: 10.12677/hjfn.2024.134048

MS technique. Methods: The samples of *Ganoderma lucidum* mycelium, fruiting bodies, and spores were collected first and then detected by Autof ms800 automatic microbial mass spectrometry system and analyzed by Autof Acquirer finally. **Results:** After testing, the protein fingerprint of *Ganoderma lucidum* was obtained. Its protein fingerprint can be divided into four parts: hyphal profile, pre-sporulation fruiting body profile, post-sporulation fruiting body profile, and spore profile. After initially establishing a database with this, it is possible to quickly identify whether unknown samples are of this variety of *Ganoderma lucidum*. **Conclusion:** It is feasible for rapid identification of *Ganoderma lucidum* by MALDI-TOF-MS technique.

Keywords

Ganoderma lucidum, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS), Identification

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

灵芝的应用在我国有着悠久的历史，有神仙之草、祥瑞的化身等美誉，因其菌盖形似祥云、如意，象征国泰民安，造就了灵芝的文化源远流长。在《神农本草经》《新修本草》《本草纲目》等经典医药著作中都有记载，《神农本草经》中按颜色将灵芝分为六类，皆列为上品，认为这六类灵芝长期服用无毒、不伤人，还可以使人保持身体健康、延缓衰老、延长寿命。除此之外，灵芝添加到食物中不仅让食物味道鲜美，还具有保健功效[1]-[4]。在我国最近几年，灵芝产业发展迅速，2018年3月成立了中国中药协会灵芝专业委员会。2020年1月2日，灵芝中的赤芝和紫芝被纳入药食同源试点名单。2023年5月，灵芝学术界和产业界同仁共同倡议，决定将每年的7月6日设立为“灵芝日(Lingzhi Day)”。2023年11月9日，灵芝正式纳入药食同源目录，并在2024年7月6日迎来了首个灵芝日。而在人杰地灵有着江北水城之称的聊城市，其栽培灵芝有着30多年的历史，近年来聊城市的灵芝产业迅速发展，已成为当地的优势产业，现有灵芝大棚超过1万个，面积1万多亩，从业人员超过5万人，灵芝生产量逐年上升，现在是全国最大的灵芝产销集散地[5][6]。但随着规模的扩大，很多问题显现出来，尤其灵芝鉴定等质量控制方面，严重影响了灵芝产业的健康发展[7]。

当前，灵芝的鉴定方法多是依靠薄层色谱、形状特征、显微特征、ITS测序等进行鉴别[7]-[9]。现应用快速方法基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术鉴定真菌的研究越来越多[10]，未见有用该技术鉴定检测灵芝的文献报道。本文通过对前期由聊城市国兴圣芝堂生物科技有限公司提供的紫芝品种“国兴二号”灵芝样本进行检测，探索基于MALDI-TOF-MS技术快速鉴定灵芝的可行性。

2. 材料与方

2.1. 材料与试剂

灵芝样本包含6个灵芝菌丝斜面、24个产孢子前灵芝子实体、69个产孢子后灵芝子实体、35个孢子，共134个样本。所有样本均是由聊城市国兴圣芝堂生物科技有限公司正常生产的菌包中随机挑选出100个，放置在灵芝养殖大棚内一个单独的区域，按时间顺序采集完成，其中6个菌丝样品是同品种新鲜生长的PDA斜面。

质谱样品处理基质溶液：郑州安图实验仪器有限公司；甲酸：色谱纯，上海阿拉丁公司；乙腈：色谱纯，西格玛公司；实验用水为双蒸馏水。

2.2. 仪器与设备

MALDI-TOF-MS 仪器(型号：Autof ms800)：郑州安图实验仪器有限公司；台式小型离心机：西格玛公司；手持电动研磨器：比克曼生物科技有限公司；移液器：赛默飞世尔公司。

2.3. 方法

2.3.1. 样品采集及处理

灵芝子实体样品取样后用 75%酒精清洗后，45℃彻底烘干，无菌袋密封后放置-20℃保存，菌丝为新鲜生长的 PDA 斜面，孢子收集后直接放置无菌袋密封后-20℃保存。取样器具用 75%酒精擦拭消毒。

2.3.2. 质谱前处理

取灵芝菌丝、子实体、孢子各 15 mg 分别加入到各自的 1.5 mL 离心管中；分别用移液器加入 50 μ L 的 60%甲酸溶液后，使用手持电动研磨器研磨 1 min，加入 50 μ L 的乙腈，12,000 rpm/min 离心 30 s，取上清液上机检测。

2.3.3. 质谱上机及图谱分析

取 1 μ L 前处理之后的上清液涂到不锈钢靶板上，放入烘干箱，40℃烘干，覆盖 1 μ L 基质溶液后，再次 40℃烘干，放入 Autof ms800 全自动微生物质谱检测系统上机检测，上机前用标准品对进行仪器校准。Autof ms800 参数设定：激光强度 45%，激光频率 60 Hz，采集卡延时 230 ns，推斥极电压 20 kV，质量范围 2000~15,000。检测图谱使用 Autof Acquirer 进行分析处理。

3. 结果与分析

本处理方法提取了灵芝样本的管家蛋白，经过上机检测得到了其指纹图谱，并用软件进行了图谱处理，统计图谱信息，发现其蛋白图谱可以分为四部分：灵芝菌丝图谱、灵芝产孢子前子实体图谱、灵芝产孢子后子实体图谱、灵芝孢子图谱，并以此初步建立数据库。分析 MALDI-TOF-MS 技术应用在快速鉴定灵芝上的可行性。

3.1. 灵芝图谱信息统计

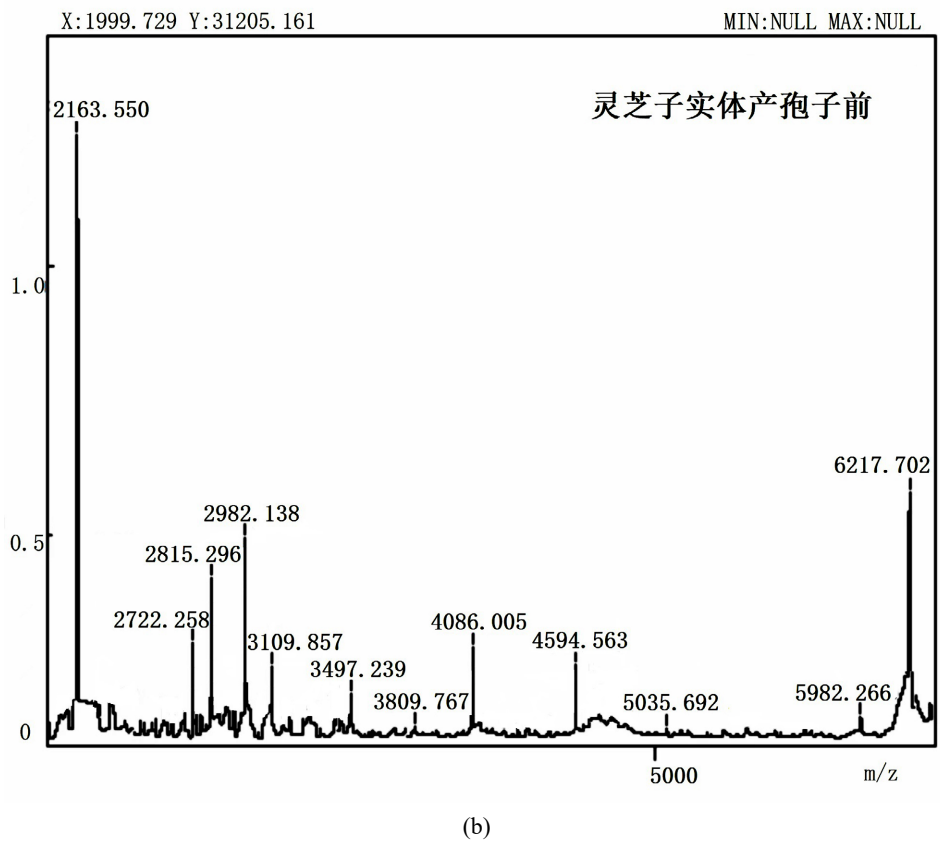
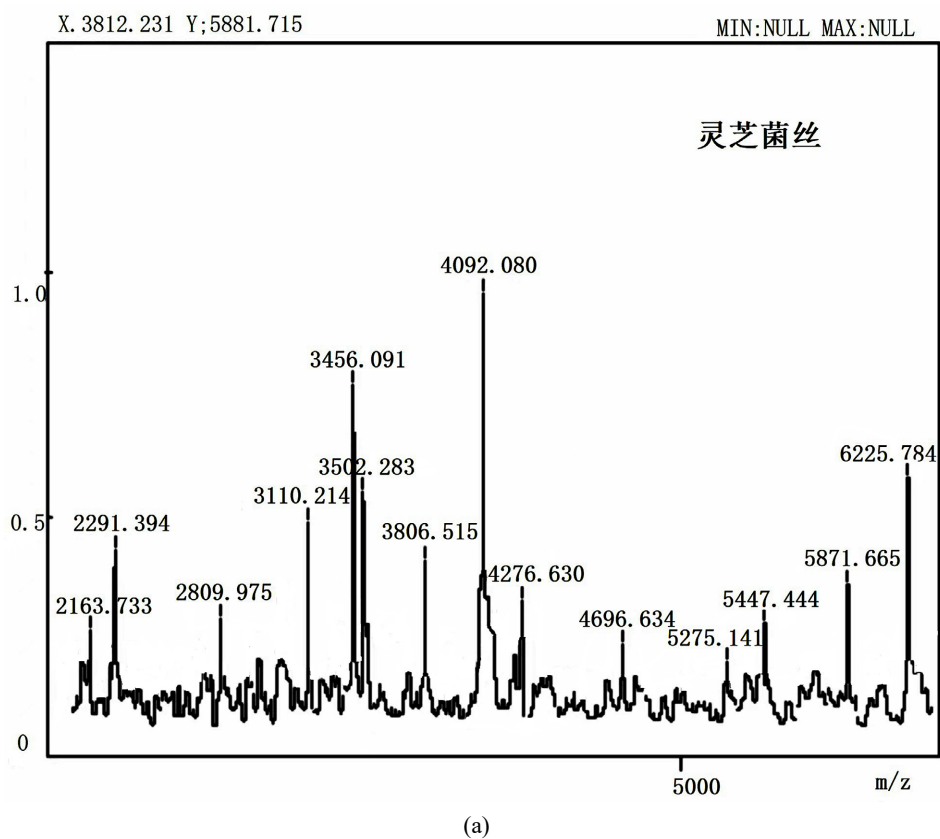
灵芝菌丝图谱中强度较大的峰平均数量 46 个，产孢子前子实体图谱中强度较大的峰平均数量 38 个，产孢子后子实体图谱中强度较大的峰平均数量 33 个，孢子图谱中强度较大的峰平均数量 34 个。

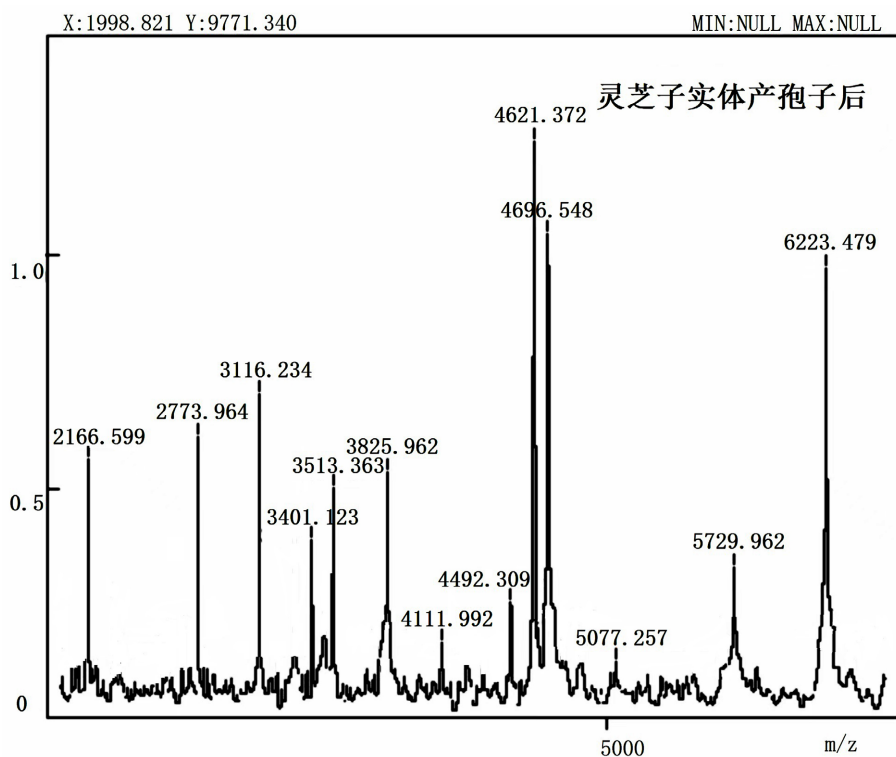
3.2. 灵芝不同时期的图谱

灵芝菌丝、子实体产孢子前、子实体产孢子后以及孢子四个时期的图谱相互之间差异较大(见图 1)，建立灵芝图谱数据库时应该包含这几个阶段的图谱。

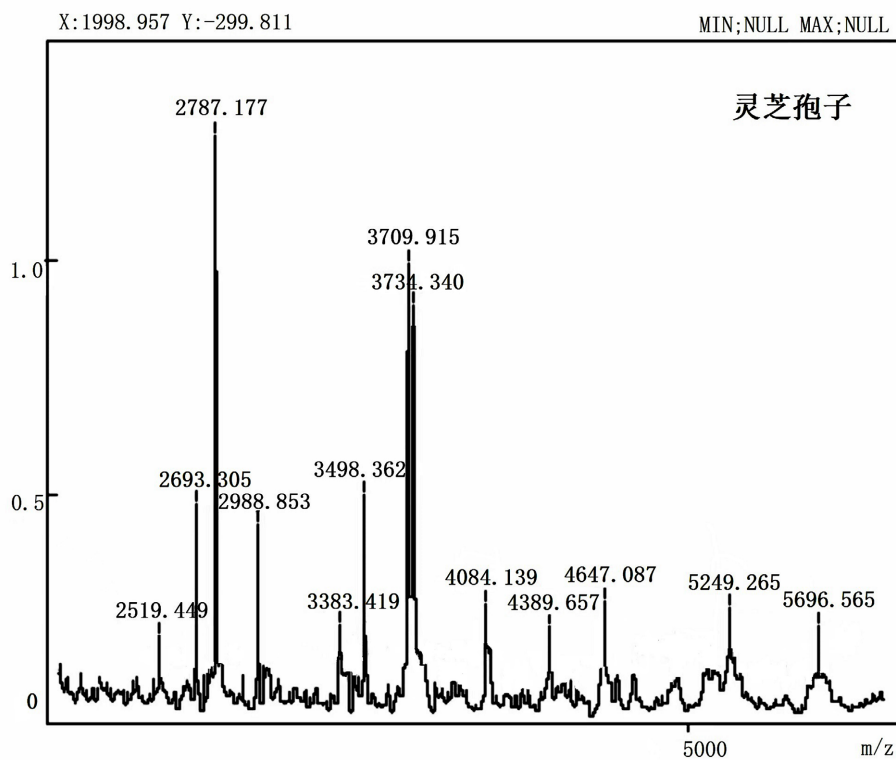
3.3. 结论与分析

MALDI-TOF-MS 技术利用激光使样品电离成不同质荷比(m/z)的带电离子，其经过加速电场后由飞行时间质谱分析器进行质量分析，离子质荷比与飞行时间平方成正比，计算机处理后可以绘制成质量图谱，通过相关软件分析后可以生成其指纹图谱。利用已知样品建立标准数据库后，通过对未知样本检测





(c)



(d)

Figure 1. Partial diagrams of four stages of *Ganoderma lucidum*
图 1. 灵芝四个时期的部分图谱

得到的图谱并与标准数据库中的图谱比对可以得到鉴定结果[11]。本实验灵芝样本经过前处理后上机检测,得到了本品种灵芝的管家蛋白指纹图谱。经过分析之后可以归纳为四个时期的图谱,即灵芝菌丝图谱、灵芝产孢子前子实体图谱、灵芝产孢子后子实体图谱、灵芝孢子图谱,并且图谱强度较大的峰数量较多,这为建立数据库提供了丰富的数据支持,使建立灵芝图谱标准数据库成为可能。出现四个时期图谱的原因可能是灵芝在不同生长阶段虽然基因是一样的,但是在不同时期其表达生命所需蛋白的数量和种类各不相同。通过观察可知,不同时期的灵芝外观形态差异非常大,在斜面培养基上灵芝菌丝像一层细腻的白色绒毛,交织在一起呈网状;灵芝子实体为半圆形,呈伞状且木质化,宽约 12~20 cm,厚约 2 cm;灵芝孢子为褐色细腻粉末;所以建立灵芝图谱标准数据库时应该包含菌丝、产孢子前子实体、产孢子后子实体、孢子等灵芝的这几个生长时期的蛋白质谱图。以得到的灵芝蛋白指纹图谱初步建立了本品种灵芝数据库,对本品种灵芝样本进行检测,准确率很高。这说明应用 MALDI-TOF-MS 技术快速鉴定灵芝有一定的可行性。

4. 讨论

灵芝是灵芝属的一种多孔真菌,在我国广泛分布,在热带、亚热带地区都可生长[12]。近年来,全国灵芝产量迅速增加,尤其山东聊城市已成为全国最大的产销地。有研究显示,灵芝市场存在不规范、品种多、正品与伪品混杂等现象[13]。因 100 千克灵芝子实体才能产出 1 千克孢子粉,所以孢子粉更为稀有,其价值也就远远大于灵芝子实体的价值[14]。灵芝子实体打碎磨成的超细粉为灵芝粉,市场上存在孢子粉里掺灵芝粉以假乱真,甚至用其他菌假冒灵芝的现象。迫切需要建立一种快速高效的灵芝鉴定方法,现在 MALDI-TOF-MS 技术以其自身具有的易操作、自动化高、准确快速、检测成本低等特点被广泛应用于临床微生物的鉴定,提高了微生物鉴定的效率。随着不断地对 MALDI-TOF-MS 技术进行研究, MALDI-TOF-MS 数据库图谱的数量和质量不断提高,前处理、设置参数等条件不断优化, MALDI-TOF-MS 技术鉴定微生物程序趋于标准化,而程序的标准化可以实现不同人员、不同实验室之间检验结果的一致性[11]。有研究显示, MALDI-TOF-MS 技术鉴定以酵母菌为主的真菌时,鉴定到种水平的准确率可以达到 97.3% [15]。也有文献记载, MALDI-TOF-MS 技术鉴定酵母样真菌的结果与分子生物学鉴定结果相同,鉴定到属水平的准确率为 100%,在种水平上的鉴定准确率可以达到 94% [16]。相对于临床微生物,灵芝有菌丝、子实体、孢子三种形态,且子实体木质化,用 MALDI-TOF-MS 技术是否可以来鉴定灵芝,还需要进行探索。本研究通过采集的图谱初步建立用户私有库后,对本次采集的灵芝样本在种属水平上的检测准确率很高,并且检测一个样品用时只有十几分钟,后期按照建立的标准数据库要求继续采集更多的灵芝样本,优化前处理方法,建立灵芝标准图谱数据库后,可以实现用 MALDI-TOF-MS 技术快速鉴定灵芝,为灵芝产业的有序发展提供有力保障。

本实验研究的局限性在于仅选取了一个人工栽培的灵芝品种进行研究,得到的该品种灵芝四个时期的蛋白图谱可能无法代表所有品种的灵芝,不同品种、产地以及人工栽培与野生的灵芝或许有不同的图谱,在未来的研究中考虑采集多个品种灵芝的样本,建立多个品种灵芝标准数据库以及 MALDI-TOF-MS 技术鉴定灵芝标准程序,提高灵芝鉴定的准确率和效率。

基金项目

聊城市重点研发计划政策引导类项目(2023YD10)。

参考文献

[1] 林志彬. 从史前到现代——我国灵芝医药学发展简史[J]. 菌物研究, 2024, 22(1): 1-8.

- [2] 周州, 余梦瑶, 江南, 等. 我国灵芝栽培研究近况及其未来发展趋势探讨[J]. 中国食用菌, 2017, 36(4): 5-7.
- [3] 韩德承. 千年“仙草”话灵芝[J]. 开卷有益(求医问药), 2016(7): 48-49.
- [4] 章一智. “药食两用”类天麻和灵芝水提物的抗炎活性研究[J]. 特种经济动植物, 2024, 27(8): 19-21.
- [5] 臧荣新, 侯云霞. 半亩丹田种金粟一朵灵芝香馥郁——冠县绿梦灵芝专业合作社发展灵芝特色产业纪实[J]. 中国农民合作社, 2024(3): 49-50.
- [6] 孙青然, 赵芬, 郭晓霞, 等. 聊城灵芝种植的气象条件适宜性分析[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(8): 4553-4554.
- [7] 陈英健, 赵岑, 赵翠敏, 等. 16个灵芝菌株基于 ITS 及 ISSR 标记的遗传多样性分析[J]. 中国食用菌, 2023, 42(1): 26-30.
- [8] 张颖, 蒋昆霞, 关梦瑶, 等. 福建灵芝高效薄层色谱鉴别及其在溯源中的应用[J]. 药学研究, 2023, 42(2): 98-104.
- [9] 朱田密, 陈树和, 陈科力. 8份灵芝习用品的生药学鉴别[J]. 华西药学杂志, 2021, 36(6): 714-716.
- [10] 陈丽萍, 闫占鹏, 赖梦书, 等. MALDI-TOF-MS 技术在块菌、美味牛肝菌物种快速甄别中的运用[J]. 中国食用菌, 2020, 39(5): 37-42.
- [11] 李锐, 刘建华. 质谱技术在临床微生物检测中的应用进展[J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(7): 1081-1084.
- [12] 闫晓慧, 姜思亮, 刘雪晴, 等. 灵芝多糖的构效关系、提取工艺及药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2024, 52(4): 117-122.
- [13] 陈思明, 黄诚, 罗宗玉, 等. 海南灵芝的研究进展[J]. 中国药物经济学, 2024, 19(2): 117-120.
- [14] 曹德宾. 灵芝孢子粉的分级及鉴别[J]. 农业知识, 2018(2): 39-40.
- [15] 罗燕萍. 质谱技术在临床微生物实验室中的应用前景[J]. 检验学, 2015, 30(2): 97-101.
- [16] 王欢, 曲芬. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在真菌快速鉴定中的应用[J]. 传染病信息, 2016, 29(3): 129-132.