



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107667288 A

(43)申请公布日 2018.02.06

(21)申请号 201680026939.2

(22)申请日 2016.03.07

(30)优先权数据

1503879.7 2015.03.06 GB

1503876.3 2015.03.06 GB

1503864.9 2015.03.06 GB

1503877.1 2015.03.06 GB

1503867.2 2015.03.06 GB

1503863.1 2015.03.06 GB

1503878.9 2015.03.06 GB

1516003.9 2015.09.09 GB

1518369.2 2015.10.16 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.11.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2016/050610 2016.03.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/142681 EN 2016.09.15

(71)申请人 英国质谱公司

地址 英国威姆斯洛

(72)发明人 佐尔坦·塔卡茨

弗朗西丝·博尔特

塔马斯·卡兰斯 埃姆里斯·琼斯

基思·理查森

拉约什·高迪尔海兹

丹尼尔·绍洛伊 茱莉亚·巴洛格

史蒂文·德里克·普林格尔

丹尼尔·西蒙

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

务所(普通合伙) 11201

代理人 宋融冰

(51)Int.Cl.

G01N 27/62(2006.01)

A61B 10/02(2006.01)

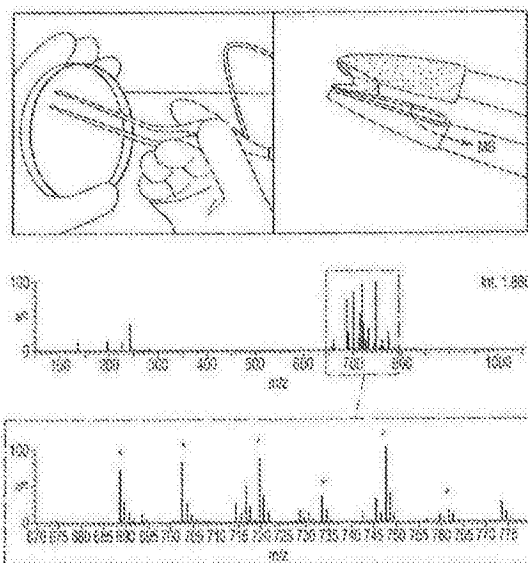
权利要求书16页 说明书124页 附图39页

(54)发明名称

微生物的谱分析

(57)摘要

本申请公开一种使用质谱法和/或离子迁移谱法进行分析的方法。所述方法包含：使用第一装置从包含微生物群体或由其组成的目标产生烟雾、气溶胶或蒸气；对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析，以获得谱数据；以及分析所述谱数据以分析所述微生物群体。



1. 一种使用质谱法和/或离子迁移谱法进行分析的方法,所述方法包含:
 - (a) 使用第一装置从包含微生物群体或由其组成的目标产生烟雾、气溶胶或蒸气;
 - (b) 对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析,以获得谱数据;以及
 - (c) 分析所述谱数据以分析所述微生物群体。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法包含分析所述谱数据以:
 - (i) 分析所述微生物群体或其中存在的一种或多种微生物类型对一种或多种抗微生物剂的敏感性或抗性;
 - (ii) 分析所述微生物群体或其中存在的一种或多种微生物类型的身份;
 - (iii) 确认所述目标中或所述目标上微生物的存在;
 - (iv) 分析所述微生物群体的均质性和/或异质性;
 - (v) 分析所述微生物群体或其中存在的一种或多种微生物类型的基因型和/或表型;
 - (vi) 分析所述微生物群体或其中存在的一种或多种微生物类型的状态;
 - (vii) 分析涉及所述微生物群体或其中存在的一种或多种细胞类型的过程;
 - (viii) 分析操纵所述微生物群体或其中存在的一种或多种细胞类型的基因型和/或表型的影响;
 - (ix) 分析操纵所述微生物群体的环境条件的影响;
 - (x) 分析物质对所述微生物群体或其中存在的一种或多种微生物类型的影响;
 - (xi) 区别所述微生物群体内的两种或更多种不同微生物类型;
 - (xii) 分析所述微生物群体的物质产生;
 - (xiii) 分析所述微生物群体是否被不同微生物污染;
 - (xiv) 检测所述目标中或所述目标上的微生物;
 - (xv) 表征所述微生物群体;
 - (xvi) 检测、鉴别和/或表征所述目标中或所述目标上存在的化合物;
 - (xvii) 分析物质的利用;
 - (xviii) 分析所述微生物群体的存活力和/或
 - (xix) 分析所述目标的微生物感染。
3. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述目标是微生物培养物、临床样本、环境样本、食品、饮料、植物、植物样本、动物样本、受试者和/或对象。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述目标是在液体培养基中或在固体培养基上生长的微生物培养物。
5. 根据权利要求3所述的方法,其中所述目标是伤口或从伤口获得的样本。
6. 根据权利要求3或5所述的方法,其中所述目标是任选地来自阴道、胃肠道、鼻、肺和/或呼吸道的组织或粘膜样本。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微生物群体包含细菌、真菌、古细菌、藻类、原虫和/或病毒或由其组成。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微生物群体包含至少两种不同类型的微生物。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微生物群体包含单细胞或多细胞微生物或由其组成。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微生物群体包含一种或多种不同微生物类型或由其组成。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微生物群体包含突变和/或转基因微生物或由其组成。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微生物群体包含(i) 对一种或多种抗微生物剂敏感和/或(ii) 对一种或多种抗微生物剂具抗性的微生物或由其组成。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微生物群体包含对多种抗微生物

物剂具抗性的微生物或由其组成。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中 (i) 所述微生物群体的身份已知; (ii) 所述微生物群体的身份未知; (iii) 所述微生物群体的身份受到怀疑; (iv) 所述微生物群体内的一种或多种微生物的身份未知或受到怀疑; (v) 所述微生物群体的真实性未得到确认; 或 (vi) 所述微生物群体的真实性得到确认。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包含将所述微生物群体在球粒、固体、凝胶或液体中或呈球粒、固体、凝胶或液体形式提供。

16. 一种使用质谱法和/或离子迁移谱法检测微生物的方法, 所述方法包含: (a) 使用第一装置从包含微生物群体或由其组成的目标产生烟雾、气溶胶或蒸气; (b) 对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析, 以获得谱数据; 以及 (c) 分析所述谱数据以检测微生物。

17. 一种使用质谱法和/或离子迁移谱法分析微生物感染的方法, 所述方法包含: (a) 使用第一装置从包含微生物群体或由其组成的目标产生烟雾、气溶胶或蒸气; (b) 对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析, 以获得谱数据; 以及 (c) 分析所述谱数据以分析所述目标的微生物感染。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以: (i) 检测所述目标的微生物感染; (ii) 鉴别出引起所述目标感染的微生物; (iii) 对引起所述目标感染的微生物进行表征; 和/或 (iv) 分析所述目标的微生物感染的空间分布。

19. 根据权利要求17或18所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以确定所述微生物感染是否是对一种或多种抗微生物剂具抗性的微生物的感染。

20. 根据权利要求17到19中任一项所述的方法, 其中所述方法用于追踪感染的扩散。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中 (i) 已知所述目标包含微生物群体或由其组成; (ii) 所述目标疑似包含微生物群体或由其组成; (iii) 所述目标包含单一微生物群体或由其组成; (iv) 所述目标包含混合微生物群体或由其组成; 和/或 (v) 所述目标疑似不包含微生物群体或由其组成。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以: (i) 检测所述微生物群体的存在; (ii) 检测所述微生物群体中特定微生物类型的存在; (iii) 检测所述微生物群体中两种或更多种不同微生物类型的存在; 和/或分析所述目标上或所述目标中一种或多种微生物的空间分布。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以鉴别或鉴定所述微生物群体, 和/或确认所述微生物群体的身份或真实性。

24. 一种使用质谱法和/或离子迁移谱法鉴别或鉴定微生物群体的方法, 所述方法包含:

(a) 使用第一装置从包含微生物群体或由其组成的目标产生烟雾、气溶胶或蒸气;

(b) 对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析, 以获得谱数据; 以及

(c) 分析所述谱数据以鉴别或鉴定所述微生物群体, 和/或确认所述微生物群体的身份或真实性。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法在身份未知的微生物群体

上执行并且所述方法包含分析所述谱数据以鉴别所述微生物群体。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法在疑似具有特定身份的微生物群体上执行并且所述方法包含分析所述谱数据以确认或反驳所述微生物群体的身份。

27. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中基于所述谱数据,鉴别、确认或鉴定所述微生物群体包含病原性微生物或非病原性微生物或由其组成。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中基于所述谱数据,鉴别、确认或鉴定所述微生物群体包含一种或多种不同微生物类型或由其组成。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中基于所述谱数据,鉴别、确认或鉴定所述微生物群体包含突变和/或转基因微生物或由其组成。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在界、门、科、纲、属、种和/或菌株层级下鉴别、确认或鉴定所述微生物群体。

31. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法在需要鉴定的微生物群体上执行,并且所述方法包含分析所述谱数据以 (i) 确认所述微生物群体的真实性; (ii) 检测所述微生物群体中的突变; 和/或 (iii) 检测所述微生物群体中的非所需变异。

32. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法包含分析所述谱数据以: (i) 确定所述微生物群体是否受到污染; (ii) 确定所述微生物群体是否无污染; (iii) 确定所述微生物群体是否已消除污染; (iv) 确定微生物群体污染的进展或阶段; 和/或 (v) 确定针对微生物群体污染的处理的进展或阶段。

33. 一种使用质谱法和/或离子迁移谱法分析微生物群体的污染的方法,所述方法包含:

(a) 使用第一装置从包含微生物群体或由其组成的目标产生烟雾、气溶胶或蒸气;

(b) 对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析,以获得谱数据; 以及

(c) 分析所述谱数据以: (i) 确定所述微生物群体是否受到污染; (ii) 确定所述微生物群体是否无污染; (iii) 确定所述微生物群体是否已消除污染; (iv) 确定微生物群体污染的进展或阶段; 和/或 (v) 确定针对微生物群体污染的处理的进展或阶段。

34. 根据权利要求32或33所述的方法,其中所述污染是或包含细菌污染。

35. 根据权利要求32或33所述的方法,其中所述污染是或包含病毒感染,例如噬菌体感染。

36. 根据权利要求32到35中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包含如果存在所述污染,则处理所述污染的步骤。

37. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法包含分析所述谱数据以区别所述微生物群体内的第一与第二不同微生物类型。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述第一微生物类型是细菌并且所述第二微生物类型是真菌。

39. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含基于所述谱数据,检测、鉴别和/或表征所述微生物群体包含念珠菌属 (*Candida*) 物种或由其组成,所述念珠菌属物种任选地选自白色念珠菌 (*C. albicans*)、光滑念珠菌 (*C. glabrata*)、克柔念珠菌 (*C. krusei*)、季也蒙念珠菌 (*C. guilliermondii*)、葡萄牙念珠菌 (*C. lusitaniae*)、近平滑念珠菌

(*C.parapsilosis*) 和/或热带念珠菌 (*C.tropicalis*)。

40. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含基于所述谱数据,检测、鉴别和/或表征所述微生物群体包含埃希氏杆菌属 (*Escherichia*) 物种、任选地大肠杆菌 (*E.coli*) 或由其组成。

41. 根据权利要求40所述的方法,所述方法包含基于所述谱数据,确定所述埃希氏杆菌属物种的菌株。

42. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含基于所述谱数据,检测、鉴别和/或表征所述微生物群体包含链球菌属 (*Streptococcus*) 物种、任选地肺炎链球菌 (*S.pneumonia*) 或由其组成。

43. 根据权利要求42所述的方法,所述方法包含基于所述谱数据,确定所述链球菌属物种的血清型。

44. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含基于所述谱数据,检测、鉴别和/或表征所述微生物群体包含棒状杆菌属 (*Corynebacterium*) 物种、任选地纹带棒状杆菌 (*C.striatum*)、微细棒状杆菌 (*C.minutissimum*)、模拟棒状杆菌 (*C.imitans*)、白喉棒状杆菌 (*C.diphtheria*) 和/或无枝菌酸棒状杆菌 (*C.amycolatum*) 或由其组成。

45. 根据权利要求44所述的方法,所述方法包含基于所述谱数据,确定所述棒状杆菌属物种的种和/或菌株。

46. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含基于所述谱数据,检测、鉴别和/或表征所述微生物群体包含梭菌属 (*Clostridium*) 物种、任选地艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 或由其组成。

47. 根据权利要求46所述的方法,所述方法包含基于所述谱数据,确定所述梭菌属物种的核糖体基因型。

48. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含基于所述谱数据,检测、鉴别和/或表征所述微生物群体包含假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 物种、任选地绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 或由其组成。

49. 根据权利要求48所述的方法,所述方法包含基于所述谱数据,确定所述假单胞菌属物种的菌株。

50. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含基于所述谱数据,检测、鉴别和/或表征所述微生物群体包含葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 物种、任选地金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 或由其组成。

51. 根据权利要求50所述的方法,所述方法包含基于所述谱数据,确定所述葡萄球菌属物种是否是抗生素抗性或抗生素敏感性菌株。

52. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含基于所述谱数据,检测、鉴别和/或表征所述微生物群体包含克雷伯氏菌 (*Klebsiella*) 物种、任选地肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumonia*) 或由其组成。

53. 根据权利要求52所述的方法,所述方法包含基于所述谱数据,确定所述克雷伯氏菌物种是否是抗生素抗性或抗生素敏感性菌株。

54. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法包含分析所述谱数据以分析所述微生物群体的表型和/或基因型。

55. 一种使用质谱法和/或离子迁移谱法分析微生物群体的表型和/或基因型的方法, 所述方法包含:

- (a) 使用第一装置从包含微生物群体或由其组成的目标产生烟雾、气溶胶或蒸气;
- (b) 分析所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子, 以获得谱数据; 以及
- (c) 分析所述谱数据以分析所述微生物群体的表型和/或基因型。

56. 根据权利要求54或55所述的方法, 其中所述基因型和/或表型是对一种或多种抗微生物剂的敏感性或抗性。

57. 根据权利要求56所述的方法, 其中所述抗微生物剂是甲氧西林 (methicillin)。

58. 根据权利要求56所述的方法, 其中所述基因型和/或表型是 β -内酰胺酶产生、任选地碳青霉烯酶产生。

59. 根据权利要求50或55所述的方法, 其中所述基因型和/或表型是群体感应分子和/或毒性因子的产生。

60. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以分析基因型和/或表型操纵对所述微生物群体的影响。

61. 一种分析基因型和/或表型操纵对微生物群体的影响的方法, 其中所述方法包含在权利要求1或权利要求55的步骤(a)之前操纵所述微生物群体的所述基因型和/或表型。

62. 根据权利要求50到61中任一项所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以分析基因型和/或表型操纵对所述微生物群体的所述基因型和/或表型的影响。

63. 根据权利要求50到62中任一项所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以分析基因型和/或表型操纵对微生物过程、疾病、微生物群体的药物生产和/或微生物群体对物质和/或环境条件的反应的影响。

64. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以分析诱变对所述微生物群体的影响。

65. 根据权利要求56到64中任一项所述的方法, 其中所述基因型和/或表型操纵或诱变是随机或定向诱变。

66. 根据权利要求65所述的方法, 其中所述定向诱变是基因沉默。

67. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以分析所述微生物群体的均质性和/或异质性程度。

68. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以分析所述微生物群体的一种或多种特性。

69. 根据权利要求68所述的方法, 其中所述特性选自营养缺陷、产生物质的能力、分泌所产生的物质的能力、快速复制的能力、对暴露于物质和/或环境条件起反应的能力和/或利用养分的能力。

70. 根据权利要求68或69所述的方法, 其中所述特性是产生毒性因子和/或群体感应分子的能力。

71. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以分析由所述微生物群体产生的化合物。

72. 根据权利要求71所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以: (i) 检测所述化合物的存在; (ii) 鉴别所述化合物; (iii) 表征所述化合物; 和/或 (iv) 分析所述化合物的

空间分布。

73. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以分析所述微生物群体的一或多个细胞过程。

74. 根据权利要求73所述的方法, 其中所述细胞过程选自物质的产生、对暴露于物质和/或环境条件的反应和/或养分的利用。

75. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以分析物质对所述微生物群体的影响。

76. 根据权利要求75所述的方法, 其中所述方法包含在权利要求1的步骤(a)之前使所述目标微生物群体暴露于第一物质。

77. 一种使用质谱法和/或或离子迁移谱法分析物质对微生物群体的影响的方法, 所述方法包含: 使包含微生物群体或由其组成的目标暴露于第一物质; 使用第一装置从所述目标产生烟雾、气溶胶或蒸气; 对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析, 以获得谱数据; 以及分析所述谱数据以分析所述物质对所述微生物群体的影响。

78. 根据权利要求75到77中任一项所述的方法, 其中所述方法是筛选多种物质的筛选方法。

79. 根据权利要求78所述的方法, 其中所述方法是高通量筛选方法。

80. 根据权利要求75到79中任一项所述的方法, 其中所述方法用于药物发现和/或药物分析。

81. 根据权利要求80所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以分析所述物质的功效。

82. 根据权利要求80或81所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以分析所述物质的作用机制。

83. 根据权利要求75到82中任一项所述的方法, 其中所述物质是潜在或已知的治疗剂。

84. 根据权利要求75到83中任一项所述的方法, 其中所述物质是抗微生物剂。

85. 根据权利要求75到84中任一项所述的方法, 其中所述物质是细胞抑制、细胞毒性和/或消炎剂。

86. 根据权利要求75到85中任一项所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以确定所述物质是否影响所述微生物群体内一种或多种微生物的基因型和/或表型。

87. 根据权利要求75到86中任一项所述的方法, 其中所述方法包含基于所述谱数据, 确定所述微生物群体对所述物质的敏感性。

88. 根据权利要求87所述的方法, 其中所述方法包含基于所述谱数据, 确定所述物质的EC₅₀。

89. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包含分析所述谱数据以分析所界定的环境条件或环境条件的变化对所述微生物群体的影响。

90. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 所述方法包含在权利要求1的步骤(a)之前使所述微生物群体经受所界定的环境条件或环境条件的变化。

91. 一种使用质谱法和/或或离子迁移谱法分析所界定的环境条件或环境条件的变化对微生物群体的影响的方法, 所述方法包含: 使包含微生物群体或由其组成的目标暴露于

所界定的环境条件或环境条件的变化;使用第一装置从所述目标产生烟雾、气溶胶或蒸气;对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析,以获得谱数据;以及分析所述谱数据以分析所述所界定的环境条件或环境条件的变化对所述微生物群体的影响。

92. 根据权利要求89到91中任一项所述的方法,其中所述环境条件选自培养基组分的性质和/或浓度;细胞-细胞接触的性质和程度;温度;pH值;流体平衡;压力;流动体积;和/或氧气压力。

93. 根据权利要求92所述的方法,其中所述环境条件是多种养分和/或矿物质中的一种的浓度。

94. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法包含分析所述谱数据以分析(i)所述微生物群体是否需要外源性脂质;和/或(ii)微生物群体需要外源性脂质的程度。

95. 根据权利要求94所述的方法,所述方法包含在权利要求1的步骤(a)之前在具有低浓度的一种或多种脂质和/或总体上低脂质浓度的培养基中培养所述微生物群体。

96. 根据权利要求94或95所述的方法,其中所述方法包含基于所述谱数据,确定所述微生物群体是否生成脂肪。

97. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含在权利要求1的步骤(a)之前使所述微生物群体暴露于一种或多种重同位素。

98. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含在权利要求1的步骤(a)之前使所述微生物群体暴露于包含一种或多种重同位素或由其组成的物质。

99. 根据权利要求98所述的方法,其中所述物质在同位素上是明确规定的。

100. 根据权利要求97到99中任一项所述的方法,其中所述重同位素是 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 或 ^{34}S 。

101. 根据权利要求97到100中任一项所述的方法,其中所述方法包含分析所述谱数据以分析所述微生物群体是否和/或如何使用所述重同位素或包含一种或多种重同位素或由其组成的物质或所述物质。

102. 根据权利要求97到101中任一项所述的方法,其中所述方法包含分析所述谱数据以分析所述微生物群体的脂质代谢。

103. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含分析所述谱数据以分析微生物群体的状态,其中所述状态选自健康和生长;健康和生长;受胁迫和生长;受胁迫和不生长;濒死;以及死亡。

104. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含分析所述谱数据以评估物质、任选地治疗剂或测试物质的效力。

105. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法进一步包含确定受试者是否应接受用物质或所述物质治疗的步骤。

106. 根据权利要求105所述的方法,所述方法进一步包含用所述物质治疗所述受试者。

107. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含分析所述谱数据以分析所述微生物群体的物质产生或分解。

108. 一种产生或分解物质的方法,所述方法包含:(a)提供包含微生物群体或由其组成

的目标；(b) 培养所述微生物群体，以便其在所述目标内产生或分解物质；(c) 使用第一装置从所述目标产生烟雾、气溶胶或蒸气；(d) 对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析，以获得谱数据；以及(e) 分析所述谱数据以分析所述微生物群体的所述物质产生或分解。

109. 一种鉴别能够产生或分解物质的微生物群体的方法，所述方法包含：(a) 使用第一装置从包含微生物群体或由其组成的目标产生烟雾、气溶胶或蒸气；(b) 对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析，以获得谱数据；以及(c) 分析所述谱数据以鉴别能够产生或分解所述物质的所述微生物群体。

110. 根据权利要求107到109中任一项所述的方法，所述方法包含分析所述谱数据以：(i) 确定所述微生物群体是否产生或分解所述物质；(ii) 测定所述微生物群体产生或分解所述物质的速率；(iii) 确定所述微生物群体是否产生任何副产物；和/或(v) 确定所述微生物群体产生或分解所述物质的机制。

111. 根据权利要求107到110中任一项所述的方法，所述方法包含分析两种或更多种微生物群体以确定哪个微生物群体以较高速率和/或以较高纯度产生或分解所述物质。

112. 根据权利要求107到111中任一项所述的方法，所述方法包含基于所述谱数据，分析多种微生物群体并将所述微生物群体分类或划分成两个或更多个亚群。

113. 根据权利要求112所述的方法，其中基于所述谱数据，将所述微生物群体分类或划分成基于以下各项的亚群：(i) 产生或分解所述物质的能力；(ii) 所述物质的产生或分解速率；(iii) 任何副产物的产生；和/或(iv) 产生或分解的机制。

114. 根据权利要求112或113所述的方法，所述方法包含基于所述谱数据，将所述微生物群体分类或划分成：(i) 能够产生或分解所述物质的第一亚群和不能产生或分解所述物质的第二亚群；(ii) 第一亚群和第二亚群，其中所述第一亚群以比所述第二亚群高的速率产生或分解物质；(iii) 第一亚群和第二亚群，其中所述第一亚群不产生副产物，或产生的副产物比所述第二亚群少；和/或(iv) 第一亚群和第二亚群，其中所述第一亚群通过与所述第二亚群不同的机制产生或分解所述物质。

115. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述方法进一步包含在权利要求1的步骤(a)到(c)之前和/或之后，使所述微生物群体或微生物群体亚群经受基于液相色谱的分析的步骤，其中所述基于液相色谱的分析选自液相色谱质谱(liquid chromatography mass spectrometry, “LCMS”)分析；液相色谱离子迁移谱(liquid chromatography ion mobility spectrometry, “LCIMS”)分析；液相色谱串联质谱(liquid chromatography tandem mass spectrometry, “LCMS/MS”)分析；先液相色谱后MS^E谱(liquid chromatography followed by MS^E spectrometry, “LCMS^E”)分析；先液相色谱后离子迁移分离并接着质谱(liquid chromatography followed by ion mobility separation and then mass spectrometry, “LC-IMS-MS”)分析；和/或先液相色谱后离子迁移分离并接着MS^E谱(liquid chromatography followed by ion mobility separation and then MS^E spectrometry, “LC-IMS-MS^E”)分析。

116. 根据权利要求115所述的方法，所述方法包含(i) 基于所述基于液相色谱的分析，将所述微生物群体分类或划分成亚群；(ii) 基于所述谱数据与所述基于液相色谱的分析的组合，将所述微生物群体分类或划分成亚群；或(iii) 基于所述基于液相色谱的分析，将所

述微生物群体亚群中的至少一个亚群分类或划分成进一步的亚群。

117. 根据权利要求107到116中任一项所述的方法, 所述方法进一步包含在适合于产生或分解所述物质的条件下培养所述微生物群体或微生物群体亚群。

118. 根据权利要求117所述的方法, 所述方法包含培养来自权利要求116的微生物群体的所述第一亚群之一的微生物群体。

119. 根据权利要求1到114、117或118中任一项所述的方法, 其中所述方法不包含使所述微生物群体或微生物群体亚群进行液相色谱质谱(“LCMS”)分析和/或液相色谱离子迁移谱(“LCIMS”)分析的步骤。

120. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 所述方法包含基于所述谱数据, 确定调整所述微生物群体的一或多个培养条件的需要。

121. 根据权利要求120所述的方法, 所述方法包含基于所述需要, 调整所述培养条件, 任选地使物质或所述物质的产生或分解达到最佳。

122. 根据权利要求121所述的方法, 其中调整所述培养条件的所述步骤包含调整供应给所述微生物群体的养分的浓度以便维持养分水平在预定或所希望水平下。

123. 根据权利要求121或122所述的方法, 其中调整所述培养条件的所述步骤包含调整供应给所述微生物群体的矿物质的浓度以便维持矿物质含量水平在预定或所希望水平下。

124. 根据权利要求121到123中任一项所述的方法, 其中调整所述培养条件的所述步骤包含调整pH值以便维持pH值在预定或所希望水平下, 任选地在6.5与7.5之间。

125. 根据权利要求121到124中任一项所述的方法, 其中调整所述培养条件的所述步骤包含调整加热条件以便维持所述温度在预定或所希望水平下, 任选地约30℃。

126. 根据权利要求121到125中任一项所述的方法, 其中调整所述培养条件的所述步骤包含调整氧、二氧化碳或其它气体水平。

127. 根据权利要求121到126中任一项所述的方法, 其中调整所述培养条件的所述步骤包含添加污染控制物质、任选地一种或多种抗生素、抗病毒剂和/或抗真菌剂或调整其浓度。

128. 根据权利要求121到127中任一项所述的方法, 其中调整所述培养条件的所述步骤包含添加促使所述微生物群体产生或分解物质或所述物质的催化剂或诱导剂或调整其浓度。

129. 根据权利要求121到128中任一项所述的方法, 其中调整所述培养条件的所述步骤包含调整所述微生物群体所暴露的光的水平。

130. 根据权利要求108到129中任一项所述的方法, 所述方法进一步包含纯化所述物质。

131. 根据权利要求130所述的方法, 其中纯化所述物质的所述步骤包含以下各项中的一或多个: 溶解细胞; 离心; 过滤; 膜分离; 萃取; 沉淀; 和/或色谱法。

132. 根据权利要求108到130中任一项所述的方法, 其中所述物质在产生时期后产生, 其中所述产生时期选自以下各项组成的群组: (i) 1-24小时; (ii) 1-2天; (iii) 2-3天; (iv) 3-4天; (v) 4-5天; (vi) 5-6天; (vii) 6-7天; (viii) 1-2周; (ix) 2-3周; (x) 3-4周; (xi) 1-2个月; (xii) 2-3个月; (xiii) 3-4个月; (xiv) 4-5个月; (xv) 5-6个月; (xvi) 6-7个月; (xvii) 7-8个月; (xviii) 8-9个月; (xix) 9-10个月; (xx) 10-11个月; (xxi) 11-12个月; 和 (xxii) >12

个月。

133. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含分析所述谱数据以分析一种或多种化合物、一种或多种代谢物和/或一种或多种生物标记物、任选地一种或多种瞬时中间物。

134. 根据权利要求133所述的方法,所述方法包含从所述谱数据确定是否:(i)表达一种或多种生物标记物;(ii)以相对于预定水平更高的水平表达一种或多种生物标记物;或(iii)以相对于预定水平更低的水平表达一种或多种生物标记物。

135. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含使微生物表型和/或基因型与谱生物标记物相关联。

136. 根据权利要求133到135中任一项所述的方法,其中所述生物标记物是分枝菌酸、鞘脂、缩醛磷脂、脂肽和/或群体感应分子。

137. 根据权利要求133到136中任一项所述的方法,其中所述生物标记物选自表1-15中列出的任一生物标记物。

138. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中分析所述谱数据的所述步骤包含分析所述烟雾、气溶胶或蒸气的分布或由此衍生的离子的分布。

139. 根据权利要求138所述的方法,其中所述分布选自由以下各项组成的群组:(i)脂质谱学分布;(ii)脂肪酸分布;(iii)磷脂分布;(iv)磷脂酸(phosphatidic acid,PA)分布;(v)磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine,PE)分布;(vi)磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol,PG)分布;(vii)磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,PS)分布;或(viii)磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol,PI)分布。

140. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在权利要求1的步骤(a)之前所述微生物群体内的一种或多种微生物上或内的分子用标记进行标记。

141. 一种使用质谱法和/或离子迁移谱法进行分析的方法,所述方法包含:

(a) 使用第一装置从包含微生物群体或由其组成的目标产生烟雾、气溶胶或蒸气,所述微生物群体包含一种或多种微生物,所述一种或多种微生物在所述一种或多种微生物上或内的分子上具有标记;

(b) 对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析,以获得谱数据;以及

(c) 分析所述谱数据以鉴别和/或表征所述微生物群体或所述微生物群体中存在的一种或多种微生物和/或化合物。

142. 根据权利要求140或141所述的方法,其中所述方法包含分析所述谱数据以分析微生物细胞过程。

143. 根据权利要求143所述的方法,其中所述细胞过程涉及所述标记分子的生物转化。

144. 根据权利要求140到143中任一项所述的方法,其中所述标记是荧光标记。

145. 根据权利要求140到144中任一项所述的方法,所述方法进一步包含在执行权利要求1或权利要求141的步骤(a)到(c)之前或之后,将标记微生物与未经标记的微生物分离,分成第一与第二亚群、任选地标记和未经标记的亚群。

146. 根据权利要求145所述的方法,其中所述分离使用荧光辅助的细胞分选(fluorescence-assisted cell sorting,FACS)进行,并且任选地,其中将标记细胞与未经

标记的细胞分离的所述步骤在执行权利要求1或权利要求141的步骤(a)到(c)之前进行,并且任选地,(i)其中所述亚群中的至少一个亚群直接经由根据前述权利要求中任一项所述的方法分析;(ii)其中至少一个亚群直接引入质谱仪和/或离子迁移谱仪;和/或(iii)其中FACS装置连接到质谱仪和/或离子迁移谱仪。

147.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述目标是第一样品,所述微生物群体是第一微生物群体并且所述谱数据是第一谱数据;并且其中所述方法进一步包含从包含微生物群体的第二不同样品产生气溶胶、烟雾或蒸气;对从所述第二样品产生的所述气溶胶、烟雾或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析,以便获得指示与所述第二样品中的所述微生物群体相关的一种或多种特性的第二谱数据;以及比较所述第一谱数据与所述第二谱数据以确定所述第一目标样品与所述第二目标样品之间的差异。

148.根据权利要求147所述的方法,其中所述第一样品和所述第二样品是来自第一和第二单独目标的样品,并且其中所述第二样品由第二微生物群体、例如单独微生物群体组成或包含其。

149.根据权利要求148所述的方法,其中所述第一微生物群体暴露于第一物质并且所述第二微生物群体不暴露于所述第一物质,并且所述方法包含分析所述第一谱数据和所述第二谱数据以分析所述物质对所述第一微生物群体的影响。

150.根据权利要求148或权利要求149所述的方法,其中所述第二微生物群体暴露于第二物质并且所述第一微生物群体不暴露于所述第二物质,并且所述方法包含分析所述第一谱数据和所述第二谱数据以分析所述第二物质对所述第二微生物群体的影响。

151.根据权利要求148到150中任一项所述的方法,其中所述第一微生物群体暴露于第一环境条件并且所述第二微生物群体不暴露于所述环境条件,并且所述方法包含分析所述第一谱数据和所述第二谱数据以分析所述环境条件对所述第一微生物群体的影响。

152.根据权利要求148到151中任一项所述的方法,其中所述第二微生物群体暴露于第二环境条件并且所述第一微生物群体不暴露于所述第二环境条件,并且所述方法包含分析所述第一谱数据和所述第二谱数据以分析所述第二环境条件对所述第二微生物群体的影响。

153.根据权利要求148到152中任一项所述的方法,其中所述第一微生物群体包含第一基因修饰并且所述第二微生物群体不包含所述第一基因修饰,并且所述方法包含分析所述第一谱数据和所述第二谱数据以分析所述第一基因修饰的影响。

154.根据权利要求148到153中任一项所述的方法,其中所述第一微生物群体包含第一基因修饰并且所述第二微生物群体包含第二基因修饰,并且所述方法包含分析所述第一谱数据和所述第二谱数据以分析所述第二基因修饰的影响。

155.根据权利要求153到154中任一项所述的方法,其中所述第一微生物群体和所述第二微生物群体除所述第一基因修饰和/或所述第二基因修饰外是同基因的。

156.根据权利要求147所述的方法,其中所述第一样品和所述第二样品是分别在第一时间和后续第二时间从所述目标获取的不同样品。

157.根据权利要求156所述的方法,其中在获得所述第一样品后但在获得所述第二样品前使所述目标暴露于第一物质,并且所述方法包含分析所述第一谱数据和所述第二谱数据以分析所述第一物质对所述微生物群体的影响。

158. 根据权利要求156或权利要求157所述的方法,其中在获得所述第一样品后但在获得所述第二样品前使所述目标暴露于第一环境条件,并且方法包含分析所述第一谱数据和所述第二谱数据以分析所述第一环境条件对所述微生物群体的影响。

159. 根据权利要求147到158中任一项所述的方法,所述方法进一步包含从一种或多种其它样品产生气溶胶、烟雾或蒸气;对从所述其它样品产生的所述气溶胶、烟雾或蒸气进行质量分析和/或离子迁移率分析,以便获得其它谱数据;以及比较所述第一谱数据和/或所述第二谱数据与所述其它谱数据以确定所述其它样品与所述第一样品和/或所述第二样品之间的差异。

160. 根据权利要求159所述的方法,其中所述其它样品是来自一种或多种其它单独目标,例如微生物群体的样品。

161. 根据权利要求159所述的方法,其中所述其它目标样品是在一或多个后续时间从与所述第一样品和/或所述第二样品相同的目标获取的样品。

162. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含分析所述谱数据,其中分析所述谱数据包含分析一或多个样品谱以便对所述气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类。

163. 根据权利要求162所述的方法,其中分析所述一或多个样品谱以便对所述气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类包含所述一或多个样品谱的无监督分析(例如用于减少维数)和/或所述一或多个样品谱的监督分析(例如用于分类);任选地,其中分析所述一或多个样品谱包含无监督分析(例如用于减少维数),接着监督分析(例如用于分类)。

164. 根据权利要求162或163所述的方法,其中分析所述一或多个样品谱以便对所述气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类包含使用以下各项中的一或多个:(i) 单变量分析;(ii) 多变量分析;(iii) 主成分分析(principal component analysis,PCA);(iv) 线性判别分析(linear discriminant analysis,LDA);(v) 最大边缘准则(maximum margin criteria,MMC);(vi) 基于库的分析;(vii) 软独立建模分类类比(soft independent modelling of class analogy,SLMCA);(viii) 因子分析(factor analysis,FA);(ix) 递归划分(决策树);(x) 随机森林;(xi) 独立成分分析(independent component analysis,lCA);(xii) 偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis,PLS-DA);(xiii) 隐结构正交(偏最小二乘法)投影(orthogonal(partial least squares)projections to latent structure,OPLS);(xiv) OPLS判别分析(OPLS discriminant analysis,OPLS-DA);(xv) 支持向量机(support vector machine,SVM);(xvi) (人工)神经网络;(xvii) 多层感知器;(xviii) 径向基函数(radial basis function,RBF)网络;(xix) 贝叶斯分析(Bayesian analysis);(xx) 聚类分析;(xxi) 核化方法;和(xxii) 子空间判别分析;(xxiii) k最近邻(k-nearest neighbour,KNN);(xxiv) 二次判别分析(quadratic discriminant analysis,QDA);(xxv) 概率主成分分析(probabilistic principal component Analysis,PPCA);(xxvi) 非负矩阵因子分解;(xxvii) k均值因子分解;(xxviii) 模糊c均值因子分解;以及(xxix) 判别分析(discriminant analysis,DA)。

165. 根据权利要求162到164中任一项所述的方法,其中分析所述一或多个样品谱以便对所述气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类包含使用一或多个参考样品谱开发分类模型或库。

166. 根据权利要求162到165中任一项所述的方法,其中分析所述一或多个样品谱以便

对所述气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类包含在执行主成分分析 (PCA) (例如用于减少维数) 之后执行线性判别分析 (LDA) (例如用于分类)。

167. 根据权利要求162到166中任一项所述的方法, 其中分析所述一或多个样品谱以便对所述气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类包含在执行主成分分析 (PCA) (例如用于减少维数) 之后进行最大边缘准则 (MMC) 法 (例如用于分类)。

168. 根据权利要求162到167中任一项所述的方法, 其中分析所述一或多个样品谱以便对所述气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类包含在分类模型或库内定义一或多个类别。

169. 根据权利要求162到168中任一项所述的方法, 其中分析所述一或多个样品谱以便对所述气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类包含根据一或多个类别或聚类准则在分类模型或库内手动或自动定义一或多个类别。

170. 根据权利要求169所述的方法, 其中针对每种类别的所述一或多个类别或聚类准则基于以下各项中的一或多个: 模型空间内参考样品谱的一对或多对参考点之间的距离; 模型空间内参考样品谱的各组参考点之间的方差值; 以及模型空间内参考样品谱的一组参考点内的方差值。

171. 根据权利要求168、169或170所述的方法, 其中所述一或多个类别各由一或多个类别定义来定义。

172. 根据权利要求171所述的方法, 其中所述一或多个类别定义包含以下各项中的一或多个: 模型空间内参考样品谱的一或多个参考点、数值、边界、线、平面、超平面、方差、体积、沃罗诺伊单元 (Voronoi cell) 和/或位置的集合; 以及类别层次结构内的一或多个位置。

173. 根据权利要求162到172中任一项所述的方法, 其中分析所述一或多个样品谱以便对所述气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类包含使用分类模型或库对一或多个未知的样品谱进行分类。

174. 根据权利要求162到173中任一项所述的方法, 其中分析所述一或多个样品谱以便对所述气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类包含根据一或多个分类准则手动或自动对一或多个样品谱进行分类。

175. 根据权利要求174所述的方法, 其中所述一或多个分类准则包含以下各项中的一或多个: 模型空间内一或多个样品谱的一或多个投影样品点与所述模型空间内一或多个参考样品谱的一或多个参考点、数值、边界、线、平面、超平面、体积、沃罗诺伊单元或位置的集合之间的距离低于距离阈值或是最低的此类距离; 模型空间内一或多个样品谱的一或多个投影样品点的位置处于所述模型空间内一或多个参考样品谱的一或多个参考点、数值、边界、线、平面、超平面或位置的一侧或另一侧; 模型空间内一或多个样品谱的一或多个投影样品点的位置在所述模型空间内的一或多个体积或沃罗诺伊单元内; 以及概率或分类分数超过概率或分类分数阈值或是最高的此类概率或分类分数。

176. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述第一装置包含敞开式离子源或电离源或形成其一部分; 或其中所述第一装置从所述目标产生所述气溶胶、烟雾或蒸气并含有离子和/或随后通过敞开式离子源或电离源或者其它电离源电离。

177. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述第一装置包含装置或离子源或形成其一部分, 所述装置或离子源选自由以下各项组成的群组: (i) 快速蒸发电离质谱

(rapid evaporative ionisation mass spectrometry, “REIMS”) 离子源; (ii) 解吸电喷雾电离(desorption electrospray ionisation, “DESI”) 离子源; (iii) 激光解吸电离(laser desorption ionisation, “LDI”) 离子源; (iv) 热解吸离子源; (v) 激光二极管热解吸(laser diode thermal desorption, “LDTD”) 离子源; (vi) 解吸电流动聚焦(desorption electro-flow focusing, “DEFFI”) 离子源; (vii) 电介质阻挡放电(dielectric barrier discharge, “DBD”) 等离子体离子源; (viii) 大气压固体分析探针(Atmospheric Solids Analysis Probe, “ASAP”) 离子源; (ix) 超声波辅助喷雾电离离子源; (x) 敞开式简易声波-喷雾电离(easy ambient sonic-spray ionisation, “EASI”) 离子源; (xi) 解吸大气压光致电离(desorption atmospheric pressure photoionisation, “DAPPI”) 离子源; (xii) 纸喷雾(paperspray, “PS”) 离子源; (xiii) 喷射式解吸电离(jet desorption ionisation, “JeDI”) 离子源; (xiv) 触碰式喷雾(touch spray, “TS”) 离子源; (xv) 纳米DESI离子源; (xvi) 激光烧蚀电喷雾(laser ablation electrospray, “LAESI”) 离子源; (xvii) 实时直接分析(direct analysis in real time, “DART”) 离子源; (xviii) 探针电喷雾电离(probe electrospray ionisation, “PESI”) 离子源; (xix) 固体探针辅助电喷雾电离(solid-probe assisted electrospray ionisation, “SPA-ESI”) 离子源; (xx) 卡维顿超声波外科抽吸器(cavitron ultrasonic surgical aspirator, “CUSA”) 装置; (xxi) 混合式CUSA-透热装置; (xxii) 聚焦或未聚焦超声波烧蚀装置; (xxiii) 混合式聚焦或未聚焦超声波烧蚀和透热装置; (xxiv) 微波谐振装置; (xxv) 脉冲等离子体RF解剖装置; (xxvi) 氩等离子体凝固装置; (xxvii) 混合式脉冲等离子体RF解剖和氩等离子体凝固装置; (xxviii) 外科水/生理盐水射流装置; (xxix) 混合式电外科和氩等离子体凝固装置; 以及 (xxx) 混合式氩等离子体凝固和水/生理盐水射流装置。

178. 根据权利要求176或177所述的方法, 其中使用所述第一装置产生气溶胶、烟雾或蒸气的所述步骤包含使所述目标与一或多个电极接触。

179. 根据权利要求178所述的方法, 其中所述一或多个电极包含以下任一项: (i) 单极装置, 其中所述方法任选地进一步包含提供单独的返回电极; (ii) 双极装置; 或 (iii) 多相RF装置, 其中所述方法任选地进一步包含提供单独的返回电极或电极。

180. 根据权利要求178或179所述的方法, 其中所述一或多个电极包含快速蒸发电离质谱(“REIMS”) 装置或形成其一部分。

181. 根据权利要求176到180中任一项所述的方法, 所述方法进一步包含将AC或RF电压施加到所述一或多个电极以产生所述气溶胶、烟雾或蒸气。

182. 根据权利要求181所述的方法, 其中将所述AC或RF电压施加到所述一或多个电极的所述步骤进一步包含将所述AC或RF电压的一或多个脉冲施加到所述一或多个电极。

183. 根据权利要求181或182所述的方法, 其中将所述AC或RF电压施加到所述一或多个电极的所述步骤使得热量耗散到所述目标中。

184. 根据权利要求176到183中任一项所述的方法, 其中使用所述第一装置从所述目标的一或多个区域产生气溶胶、烟雾或蒸气的所述步骤进一步包含用激光照射所述目标。

185. 根据权利要求176到184中任一项所述的方法, 其中所述第一装置通过利用焦耳加热或透热从所述目标直接蒸发或汽化目标材料而从所述目标的一或多个区域产生气溶胶。

186. 根据权利要求176到185中任一项所述的方法, 其中使用所述第一装置从所述目标

的一或多个区域产生气溶胶、烟雾或蒸气的所述步骤进一步包含将超声波能量导入所述目标中。

187. 根据权利要求176到186中任一项所述的方法, 其中所述气溶胶包含不带电的水性液滴, 任选地包含细胞物质。

188. 根据权利要求176到187中任一项所述的方法, 所述方法包含使至少一些所述气溶胶、烟雾或蒸气或者其中的分析物电离以便产生分析物离子; 其中分析所述分析物离子以获得所述谱数据。

189. 根据权利要求176到188中任一项所述的方法, 所述方法包含将至少一些所述气溶胶、烟雾或蒸气导入或抽吸到质谱仪和/或离子迁移谱仪的真空室中; 和/或在所述谱仪的真空室或所述真空室内使至少一些所述气溶胶、烟雾或蒸气或者其中的分析物电离, 以便产生多个分析物离子。

190. 根据权利要求188或189所述的方法, 所述方法包含使所述气溶胶、烟雾或蒸气或者其中的分析物撞击任选地位于所述谱仪的真空室或所述真空室内的碰撞表面, 以便产生所述多个分析物离子。

191. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 所述方法包含将基质加入所述气溶胶、烟雾或蒸气; 任选地其中所述基质选自由以下各物组成的群组: (i) 所述气溶胶、烟雾或蒸气或者其中的分析物的溶剂; (ii) 有机溶剂; (iii) 挥发性化合物; (iv) 极性分子; (v) 水; (vi) 一种或多种醇; (vii) 甲醇; (viii) 乙醇; (ix) 异丙醇; (x) 丙酮; (xi) 乙腈; (xii) 1-丁醇; (xiii) 四氢呋喃; (xiv) 乙酸乙酯; (xv) 乙二醇; (xvi) 二甲亚砜; 醛; (xviii) 酮; (xiv) 非极性分子; (xx) 己烷; (xxi) 氯仿; (xxii) 丁醇; 以及 (xxiii) 丙醇。

192. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述目标是天然或未改性的。

193. 根据权利要求192所述的方法, 其中所述天然或未改性的目标未通过加入基质或试剂改性。

194. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述第一装置用于在不事先制备所述目标的情况下从所述目标的所述一或多个区域产生所述气溶胶、烟雾或蒸气。

195. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述目标在权利要求1的步骤a) 和b) 之前冷冻、化学固定、化学染色或切片。

196. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述目标除在权利要求1的步骤a) 和b) 之前冷冻、化学固定、化学染色或切片外未改性。

197. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述步骤(a) 包括自动取样。

198. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述步骤(a) 包括使用一次性取样尖端。

199. 一种诊断方法, 所述方法包含根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述目标包含来自受试者、受试者的区域或来源于受试者的微生物培养物的临床样本, 并基于所述谱数据进行诊断。

200. 根据权利要求199所述的方法, 所述方法包含基于所述微生物群体的检测、鉴别和/或表征诊断感染。

201. 根据权利要求200所述的方法, 其中所述感染是阴道、皮肤、肺、胃肠道和/或呼吸道的感染, 和/或在损害和/或伤口中。

202. 根据权利要求198、199或200所述的方法,其中所述方法包含基于所述谱数据,确定所述感染是细菌和/或病毒感染,以及任选地是否所述细菌和/或病毒是病原性的。

203. 根据权利要求199到202中任一项所述的方法,其中所述方法包含基于所述谱数据,确定所述微生物是否对一种或多种抗微生物剂敏感或具抗性。

204. 根据权利要求199到203中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包含分析所述谱数据以确定(i)所述受试者是否应接受治疗;和/或(ii)所述受试者应接受何种治疗。

205. 一种治疗方法,所述方法包含根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述目标包含来自受试者、受试者的区域或来源于受试者的微生物培养物的临床样本;其中有待提供的所述治疗的确定是基于所述谱数据;并且其中向所述受试者给予适当治疗。

206. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包含使用所述第一装置从所述目标上的多个不同区域产生气溶胶、烟雾或蒸气。

207. 根据权利要求206所述的方法,其中所述气溶胶、烟雾或蒸气是从所述目标中的多个离散区域产生。

208. 根据权利要求206或207所述的方法,所述方法包含针对在所述不同区域中的每个区域产生的气溶胶、烟雾、蒸气,对所述气溶胶、烟雾、蒸气或由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析,以便获得所述不同区域的所述谱数据,并且使所述谱数据与所述目标上的其对应区域相关联以便提供所述目标的离子成像或地图数据。

209. 根据权利要求208所述的方法,所述方法包含将每个区域的所述谱数据转化成代表所述目标中的所述区域的微生物的数目和/或类型的数据;以及任选地将所述代表性数据展现为展示组分或微生物的数目和/或类型作为在所述目标中的位置的函数的离子图像或地图。

210. 根据权利要求209所述的方法,所述方法包含鉴别和/或展现所述目标中的不同类型微生物群体之间的界限。

211. 根据权利要求208、209或210所述的方法,所述方法包含鉴别和/或展现一种或多种关注微生物类型的位置和/或界限。

212. 根据权利要求208到211中任一项所述的方法,所述方法包含鉴别和/或展现所述目标中至少一种关注生物标记物或化合物的位置和/或界限和/或水平。

213. 根据权利要求212所述的方法,其中所述化合物是群体感应分子。

214. 一种设备,所述设备包含:(a) 第一装置,用于从包含微生物群体或由其组成的目标产生烟雾、气溶胶或蒸气;(b) 质谱仪和/或离子迁移谱仪,用于分析所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子,以获得谱数据;以及(c) 处理器,被调适用于分析所述谱数据以鉴别和/或表征所述目标中存在的所述微生物群体或一种或多种微生物和/或化合物。

215. 根据权利要求214所述的设备,其中所述设备被布置和调适用于执行根据权利要求1到213中任一项所述的方法。

微生物的谱分析

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年3月6日提交的英国专利申请第1503876.3号、2015年3月6日申请的英国专利申请第1503864.9号、2015年10月16日申请的英国专利申请第1518369.2号、2015年3月6日申请的英国专利申请第1503877.1号、2015年3月6日申请的英国专利申请第1503867.2号、2015年3月6日申请的英国专利申请第1503863.1号、2015年3月6日申请的英国专利申请第1503878.9号、2015年3月6日申请的英国专利申请第1503879.7号和2015年9月9日申请的英国专利申请第1516003.9号的优先权和权益。这些申请的全部内容以引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明涉及质谱法和/或离子迁移谱法,并尤其涉及检测、鉴别和/或表征微生物和/或由微生物产生的化合物的方法。

背景技术

[0004] 传统的检测或鉴别微生物的方法依赖于基于培养物的检测,接着是使用显微分析、革兰氏染色(Gram staining)、培养物和/或生物化学分析法检测某些生物标记物对微生物进行表型鉴别。据估计所有微生物中仅仅约1%能够进行培养,因此基于培养物的方法具有相当大的缺点。

[0005] 虽然不是分类学分类,但细菌的革兰氏菌株是细菌广泛使用的分类系统,尤其是在临床微生物学实践中。使用革兰氏染色,细菌一般能够再分成两组-革兰氏阳性和革兰氏阴性染色细菌。革兰氏染色行为是通过细菌细胞壁的肽聚糖层保留结晶紫染料的能力来确定。革兰氏阴性细菌被内部细胞膜、包含肽聚糖的细胞壁和外部细胞膜包覆,而革兰氏阳性细菌缺乏外部细胞膜。革兰氏染色在临床微生物学环境中相当重要,因为革兰氏阳性菌一般由于缺乏外部细胞膜而对抗生素更敏感。

[0006] 更为新近的方法通常涉及分子生物学分析技术,例如使用限制酶、杂交、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增和/或定序的核酸分析。这些方法一般需要大规模和谨慎的样品制备,相对比较昂贵并且还需要至少若干小时进行鉴别。归因于这些原因,在常规临床环境中很少应用定序法。

[0007] 细菌物种通常由其16S rRNA序列界定,因此16S rRNA编码基因的定序充当细菌鉴别和分类的最高标准。部分或完整16S rRNA定序具有不依赖于培养物的优点,因此对于需要复杂营养的微生物来说尤其有价值。然而,直接样品应用的敏感性和特异性显著变化。此外,在一些情况下,细菌物种无法通过其16S rRNA序列来确定性地鉴别,因此需要应用额外的技术,例如其它基因目标的定序。

[0008] 细菌依赖于其胞外被膜来保护。细菌胞外被膜是包含至少一个磷脂双层的复杂结构。细菌的存活尤其取决于膜脂质的稳态和调整脂质组合物以使细菌细胞适应于不同环境的能力。大部分膜磷脂是含有两个脂肪酸链的甘油酯。这些磷脂酰基链决定膜的粘度,膜的

粘度又影响许多至关重要的膜相关功能,例如疏水性分子的被动渗透性、主动溶质输送和蛋白质-蛋白质相互作用。

[0009] 最常遇到的磷脂酰甘油脂质是磷脂酸(phosphatidic acid,PA)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine,PE)、磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol,PG)、磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine,PC)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol,PI)和磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,PS)。其享有共同的磷脂酰甘油磷酸主链,但在其对应的头基的化学性质方面有所不同。两个脂肪酸在sn1和sn2位置附接到甘油主链并通常以14与20个碳之间的各种链长度存在。许多这些脂肪酸含有反式双键、单个顺式双键或异或反异甲基分支。通过顺式双键的甲基化来形成环丙烷环是细菌中通常进行的另一改性。细菌已经发展了多种不同的机制来控制脂肪酸的重新形成以及改变现有脂肪酸的结构以视需要调整膜的粘度。

[0010] 另一种可用的技术是使用气相色谱法联合火焰电离检测器(gas-chromatography coupled to a flame ionisation detector,GC-FID)对例如细菌等微生物进行脂肪酸分布分析。

[0011] 基于质谱法的微生物鉴别已经显示适用于一些微生物。举例来说,基质辅助激光解吸电离-飞行时间-质谱法(matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry,MALDI-TOF-MS)能够提供微生物鉴别。

[0012] 有关引起疾病的病原体的身份的知识有助于进行恰当的药物治理,并且例如在临床环境中,关于微生物的某些特征的信息尤其有用。举例来说,关于微生物对抗生素或其它药物的敏感性或抗性的知识能够帮助引导治疗决定。快速决定最合适的抗生素治疗能够显著缩短感染持续时间,并且在例如脑膜炎或败血症等一些情况下,可能挽救生命。

[0013] 使用MALDI-TOF-MS进行大规模研究来解决此缺点和亚种分型中的其它缺点,并针对这些问题中的一些,例如检测 β -内酰胺酶活性以确定对 β -内酰胺抗生素的敏感性,研发出解决方案。然而,这些解决方案需要额外的样品制备和培养步骤,这些步骤耗费时间。此外,仅仅微生物内存在的一小亚群蛋白质就能够用MALDI-MS测量法检测到。此表明通过MALDI从全细胞检测到的蛋白质共享高丰度、强碱性和中等疏水性的特性。在大肠杆菌的情况下,所有检测到的蛋白质都来源于细胞内部,其中约一半的蛋白质来自核糖体。

[0014] 涉及细菌蛋白质分布分析的常规MALDI-TOF-MS方案的一个主要缺点是其不能直接应用于人类样品,因为人类蛋白质背景和低细菌计数使细菌检测复杂化。其也尤其不适合于分析微生物混合物,因为通常无法可靠地鉴别微生物混合物的组分。

[0015] 因此,对如下微生物鉴别方法的需要仍然未得到满足,所述微生物鉴别方法将产生分类信息,例如物种层级信息,同时理想地提供关于微生物表型的信息,例如将允许选择恰当的抗微生物治疗的信息。

[0016] 需要提供一种分析,例如检测、鉴别和/或表征微生物和/或由微生物产生的化合物的方法。

发明内容

[0017] 本发明大体上涉及质谱法和/或离子迁移谱分析的应用,用于分析可能包含微生物和/或由微生物产生的化合物的样品。

[0018] 本发明提供一种使用质谱法和/或离子迁移谱法进行分析的方法,所述方法包含:

[0019] (a) 使用第一装置从包含微生物群体或由其组成的目标产生烟雾、气雾或蒸气；

[0020] (b) 对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析,以获得谱数据;以及

[0021] (c) 分析所述谱数据以分析所述微生物群体。

[0022] 涵盖各个实施例,其中例如通过敞开式电离离子源从目标、烟雾、气溶胶或蒸气产生分析物离子。分析物离子或由此衍生的离子可进行:(i) 通过例如四极杆质量分析器或飞行时间质量分析器等质量分析器的质量分析;(ii) 离子迁移率分析(ion mobility analysis,IMS)和/或差分离子迁移率分析(differential ion mobility analysis,DMA)和/或场不对称离子迁移谱(Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry,FAIMS)分析;和/或(iii) 首先离子迁移率分析(IMS)和/或差分离子迁移率分析(DMA)和/或场不对称离子迁移谱(FAIMS)分析,接着其次通过例如四极杆质量分析器或飞行时间质量分析器等质量分析器的质量分析的组合(或反之亦然)。各个实施例还涉及离子迁移谱仪和/或质量分析器和离子迁移谱分析的方法和/或质量分析的方法。

[0023] 在具体实施方式中论述本文提供的方法的实施例。

[0024] 下文论述所述方法的任选的特征。因此,除非另有说明,否则对“一种方法”或“所述方法”的任何提及意图是对本文中所列的任一所提供方法的提及。明确希望这些特征中的任一个能够以任何组合存在于这些方法中的任一方法中。

[0025] 还提供了一种使离子成像的方法,所述方法包含:使用快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置对已经培养到培养基上的细菌和/或真菌样品的多个不同位置自动取样;获得对应于每个所述位置的谱数据;以及使用所述已获得的谱数据来鉴别每个所述位置上的一种或多种细菌菌株和/或一种或多种真菌菌株。

[0026] 任选地,所述培养基包含基于琼脂的培养基、碳水化合物基质或另一固体生长培养基。

[0027] 任选地,所述方法进一步包含确定源自己已经在所述培养基上培养的一种或多种细菌菌落和/或真菌菌落的一种或多种分泌物质的空间分布。

[0028] 任选地,所述一种或多种分泌物选自由以下各项组成的群组:(i) 一种或多种代谢物;(ii) 一种或多种初级代谢物;(iii) 一种或多种次级代谢物;(iv) 一种或多种脂肽;(v) 表面活性素;(vi) 一种或多种群体感应分子;(vii) 2-庚基-3-羟基-4(1H)-喹诺酮或2-庚基-3,4-二羟基喹啉(2-Heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone或2-heptyl-3,4-dihydroxyquinoline,“PQS”或假单胞菌属喹诺酮信号);(viii) 4-羟基-2-庚基喹啉(4-hydroxy-2-heptylquinoline,“HHQ”);(ix) 一种或多种抗生素;(x) 一种或多种生物碱;(xi) 一种或多种萜类化合物;(xii) 一种或多种糖苷;(xiii) 一种或多种天然酚类;(xiv) 一种或多种吩嗪;(xv) 一种或多种联苯和二苯并呋喃;(xvi) 一种或多种 β -内酰胺;(xvii) 一种或多种聚酮化合物;(xviii) 一种或多种脂肪酸合酶产物;(xix) 一种或多种非核糖体肽;以及(xx) 一种或多种核糖体肽。

[0029] 任选地,对细菌和/或真菌样品的多个不同位置自动取样的步骤包含使用一次性尖端取样。

[0030] 还提供了一种离子成像器,所述离子成像器包含:

[0031] 快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置,其被布置用于对已经培养到培养基上的细菌

和/或真菌样品的多个不同位置自动取样;以及

[0032] 质量和/或离子迁移率分析器,其被布置和调适用于:(i)获得对应于每个所述位置的谱数据;以及(ii)使用所述已获得的谱数据鉴别每个所述位置上的一种或多种细菌菌株和/或一种或多种真菌菌株。

[0033] 任选地,所述培养基包含基于琼脂的培养基、碳水化合物基质或另一固体生长培养基。

[0034] 任选地,所述离子成像器被布置和调适用于确定源自己已经在所述培养基上培养的一种或多种细菌菌落和/或真菌菌落的一种或多种分泌物质的空间分布。

[0035] 任选地,所述一种或多种分泌物质选自由以下各项组成的群组:(i)一种或多种代谢物;(ii)一种或多种初级代谢物;(iii)一种或多种次级代谢物;(iv)一种或多种脂肽;(v)表面活性素;(vi)一种或多种群体感应分子;(vii)2-庚基-3-羟基-4(1H)-喹诺酮或2-庚基-3,4-二羟基喹啉(“PQS”或假单胞菌属喹诺酮信号);(viii)4-羟基-2-庚基喹啉(“HHQ”);(ix)一种或多种抗生素;(x)一种或多种生物碱;(xi)一种或多种萜类化合物;(xii)一种或多种糖苷;(xiii)一种或多种天然酚类;(xiv)一种或多种吩嗪;(xv)一种或多种联苯和二苯并呋喃;(xvi)一种或多种 β -内酰胺;(xvii)一种或多种聚酮化合物;(xviii)一种或多种脂肪酸合酶产物;(xix)一种或多种非核糖体肽;以及(xx)一种或多种核糖体肽。

[0036] 任选地,所述离子成像器被布置和调适用于使用一次性尖端对细菌和/或真菌样品的多个不同位置自动取样。

[0037] 还提供了一种快速蒸发电离质谱(“REIMS”)方法,所述方法包含:

[0038] 使用REIMS电离源针对生物液体中细菌的存在或不存在分析所述生物液体。

[0039] 任选地,所述生物液体选自由以下各项组成的群组:(i)血液;(ii)尿;(iii)唾液;(iv)痰液;或(v)血清。

[0040] 任选地,所述方法进一步包含使用一次性取样尖端对所述生物液体取样。

[0041] 任选地,所述方法进一步包含抽吸或传送所述生物液体穿过过滤介质。

[0042] 任选地,所述方法进一步包含分析所述过滤介质上在抽吸或传送所述生物液体穿过所述过滤介质后残留的残留物。

[0043] 获得谱数据可以包含记录衍生自烟雾、气溶胶或蒸气的离子的离子信号强度作为一种或多种物理化学特性的函数(或作为其相关特性的函数)。举例来说,可以记录离子信号强度作为质荷比和/或离子迁移率的函数。接着此记录的离子信号中峰的位置和/或尺寸和/或图案能够用于表征或鉴别烟雾、气溶胶或蒸气中存在的一种或多种分析物。

[0044] 串联质谱法可以用于将分析物/化合物分配到每个峰。举例来说,可以分离(例如使用质量过滤器)具有对应于峰的物理化学特性(例如质荷比)的母离子,并接着打碎或反应以便产生碎片或产物离子。接着可以分析(例如通过质量分析)这些碎片或产物离子并且其测定的特性用于鉴别产生离子信号中的峰的母离子。此类串联质谱法可以用于例如在谱数据中鉴别生物标记物。

[0045] 质谱仪和/或离子迁移谱仪可以只以负离子模式、只以正离子模式或以正离子和负离子两种模式获得数据。可以将正离子模式谱数据与负离子模式谱数据合并或串接。负离子模式能够提供特别适用于对气溶胶、烟雾或蒸气样品(例如来自包含脂质的目标的气

溶胶、烟雾或蒸气样品)进行分类的谱。

[0046] 离子迁移谱数据可以使用不同的离子迁移漂移气体获得,或掺杂剂可以加入漂移气体中以诱导一或多个物种的漂移时间的变化。然后可以合并或串接这份数据。

[0047] 还提供了一种设备,所述设备包含:

[0048] 快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置,其被布置和调适用于针对生物液体中细菌的存在或不存在分析所述生物液体。

[0049] 任选地,所述生物液体选自由以下各项组成的群组:(i)血液;(ii)尿;(iii)唾液;(iv)痰液;或(v)血清。

[0050] 任选地,所述设备进一步包含使用一次性取样尖端对所述生物液体取样。

[0051] 任选地,所述设备进一步包含被布置和调适用于抽吸或传送所述生物液体穿过过滤介质的装置。

[0052] 任选地,所述设备进一步包含被布置和调适用于分析所述过滤介质上在抽吸或传送所述生物液体穿过所述过滤介质后残留的残留物的分析器。

[0053] 还提供了一种方法,其包含:

[0054] 获得基质的光学图像并基于所述光学图像,确定一或多个关注区域是否存在于所述基质上;

[0055] 其中如果确定存在一或多个关注区域,那么所述方法进一步包含以下步骤:

[0056] (i)使用快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置对至少一个确定的关注区域内的至少一个位置自动取样并获得对应于所述至少一个位置的谱数据;以及

[0057] (ii)使用所述已获得的谱数据鉴别所述一或多个位置上的一种或多种细菌菌株和/或一种或多种真菌菌株。

[0058] 任选地,所述基质包含食品。

[0059] 还提供了一种设备,所述设备包含:

[0060] 快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置;

[0061] 被布置和调适用于获得基质的光学图像的装置;以及

[0062] 控制系统,其被布置和调适用于:

[0063] (i)基于所述光学图像确定一或多个关注区域是否存在于所述基质上,其中如果确定一或多个关注区域存在,那么所述控制系统被进一步布置和调适用于:

[0064] (ii)使用所述快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置对至少一个确定的关注区域内的至少一个位置自动取样并获得对应于所述至少一个位置的谱数据;以及

[0065] (iii)使用所述已获得的谱数据鉴别所述一或多个位置上的一种或多种细菌菌株和/或一种或多种真菌菌株。

[0066] 任选地,所述基质包含食品。

[0067] 还提供了一种使离子成像的方法,所述方法包含:

[0068] 将细菌和/或真菌样品分配到培养基上,其中一种或多种抗生素和/或抗真菌物质包埋在所述培养基内和/或所述培养基上;

[0069] 使用快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置对已经在培养基上培养的所述细菌和/或真菌样品的多个不同位置自动取样;获得对应于每个所述位置的谱数据;以及从所述谱数据确定关于所述样品对所述一种或多种抗生素和/或抗真菌物质的抗性或其它方面的信

息。

[0070] 还提供了一种离子成像器,所述离子成像器包含:快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置;以及控制系统,其被布置和调适用于:

[0071] (i) 使用快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置对已经在培养基上培养的细菌和/或真菌样品的多个不同位置自动取样,其中一种或多种抗生素和/或抗真菌物质包埋在所述培养基内和/或所述培养基上;

[0072] (ii) 获得对应于每个所述位置的谱数据;以及

[0073] (iii) 从所述谱数据确定关于所述样品对所述一种或多种抗生素和/或抗真菌物质的抗性或者其它方面的信息。

[0074] 涵盖大量不同应用并且下文现将更详细地描述这些应用。

附图说明

[0075] 现将仅通过举例并参考附图来描述各个实施例,在所述附图中:

[0076] 图1示出了其中REIMS成像平台位于样品,例如有待成像的组织样品上方的实施例;

[0077] 图2示出了用于在光学图像与DES1和REIMS数据之间共同记录组织学特征的组合DES1和REIMS成像平台分析的工作流程;

[0078] 图3示出了用于沃特斯(Waters) Xevo G2-S (RTM) 仪器上以提高对污染的敏感性和稳固性的加热线圈界面;

[0079] 图4示出了REIMS成像仪器的设置;

[0080] 图5示出了xyz-平台的REIMS成像取样探针和设置,其中取样探针安装到z-致动器上并连接到高压电源,并且其中蒸发的气溶胶被吸管捕获并输送到质谱仪和/或离子迁移谱仪;

[0081] 图6示出了针对不同质量范围具有最显著代谢物类别的绿脓杆菌(*P.aeruginosa*)细菌的实例质谱;

[0082] 图7示出了三个不同细菌物种的光学、质谱多变量和离子图像,其中多变量图像清晰地区别出所述物种,而离子图像示出了目前关注的代谢物,包括磷脂。分子呈[M-H]⁻电离,其中PA:磷脂酸,PG:磷脂酰基-甘油,PQS:2-庚基-3-羟基-4(1H)-喹诺酮;

[0083] 图8示出了三个不同细菌菌株连同琼脂培养基的主成分分析图,并且其中PC是主成分并且解释值百分比是方差;

[0084] 图9示出了每个脂质物质的平均质谱和平均磷脂类别强度水平,其中磷脂类别的平均强度在物种之间是稳定的,PA类别水平最高并且PG类别水平最低,并且其中PA:磷脂酸,PE:磷脂酰基-乙醇胺,PG:磷脂酰基-甘油,并且其中n(绿脓杆菌)=48,n(枯草芽孢杆菌)=45,n(金黄色葡萄球菌)=52;

[0085] 图10A-10C示出了可用于本文提供的本文提供的方法中的用于包含微生物群体或由其组成的目标的REIMS分析的实验装置;

[0086] 图11示出了使来自包含微生物群体或由其组成的目标的气溶胶电离的界面;

[0087] 图12A-12B示出了用于分析包含微生物群体或由其组成的目标的DES1方法;

[0088] 图13示出了从脆弱拟杆菌(*B.fragilis*)获得的m/z 590下氧化神经酰胺信号的碎

片化的碎片化谱和方案;

[0089] 图14示出了针对来自扭曲副拟杆菌 (*Parabacteroides distonasis*) 的被分配为 C15:0 取代的磷酸甘油二氢神经酰胺 (subPG-DHC) 的 m/z 932、946 和 960 下的峰所获得的碎片化谱;

[0090] 图15示出了一种分析方法,所述方法包含根据各个实施例构建分类模型;

[0091] 图16示出了一组从两类已知参考样品获得的参考样品谱;

[0092] 图17示出了具有由强度轴界定的三维的多变量空间,其中所述多变量空间包含多个参考点,每个参考点对应于从参考样品谱推导出的三个峰强度值;

[0093] 图18示出了PCA模型的累积方差与成分数目之间的一般关系;

[0094] 图19示出了具有由主成分轴界定的二维的PCA空间,其中PCA空间包括多个变换参考点或分数,每个变换参考点或分数对应于图17的参考点;

[0095] 图20示出了具有单个维度或轴的PCA-LDA空间,其中LDA是基于图19的PCA空间执行的,PCA-LDA空间包含多个其它变换参考点或类别分数,每个其它变换参考点或类别分数对应于图19的变换参考点或分数;

[0096] 图21示出了一种分析方法,所述方法包含使用根据各个实施例的分类模型;

[0097] 图22示出了从未知样品获得的样品谱;

[0098] 图23示出了图20的PCA-LDA空间,其中所述PCA-LDA空间进一步包含PCA-LDA投影样品点,所述投影样品点是根据图22的样品谱的峰强度值推导出的。

[0099] 图24示出了一种分析方法,所述方法包含根据各个实施例构建分类库;

[0100] 图25示出了一种分析方法,所述方法包含使用根据各个实施例的分类库;

[0101] 图26A示出了使用本文提供的利用REIMS技术的方法对7种念珠菌属物种进行的PCA分析;并且图26B示出了使用本文提供的利用REIMS技术的方法对7种念珠菌属物种进行的LDA分析;

[0102] 图27A示出了纯大肠杆菌分离株的谱分布图;图27B示出了纯白色念珠菌分离株的谱分布图;以及图27C示出了含有相同比率的两个分离株的联合样品的谱分布图,其中突出显示分离株特异性峰;

[0103] 图28示出了使用本文提供的利用REIMS的方法的一实施例在艰难梭菌核糖核酸型分离株下获得的谱数据的LDA分析;

[0104] 图29示出了MRSA和MSSA分离株的LDA和交叉验证分析;

[0105] 图30示出了使用本文提供的利用REIMS的方法的一实施例针对在哥伦比亚血琼脂上培养的金黄色葡萄球菌(顶部)、绿脓杆菌(中间)和大肠杆菌(底部)每一种菌的五个不同临床分离株获得的谱数据;

[0106] 图31A-31D示出了在有氧(A和C)和厌氧(C和D)条件下生长的金黄色葡萄球菌的质谱的缩放区。 $A+B$ m/z 650-800, $C+D$ m/z 1250-1750;

[0107] 图32示出了使用本文提供的利用REIMS的方法针对五种不同棒状杆菌属物种获得的缩放谱数据,这些数据揭露不同分枝菌酸图案;谱相对于基础峰标准化;

[0108] 图33示出了用于发现分类单元特异性标记物的通用工作流程;

[0109] 图34示出了使用本文提供的利用REIMS的方法的一实施例针对呈菌苔(顶部)和单个菌落(底部)生长的绿脓杆菌的临床分离株获得的谱数据,其中突出显示群体感应分子和

鼠李糖脂的谱数据；

[0110] 图35示出了在绿脓杆菌中检测到的鼠李糖脂物质的碎片化谱,使用赛默(Thermo) LTQ XL离子阱仪器使用碰撞诱导解离在25的碰撞能量设定下记录；

[0111] 图36示出了在Plasmocin (RTM) 处理的持续时间期间支原体感染和无支原体的细胞系中的 $m/z=747.52$ 的峰强度,其中第1天对应于初始(支原体阳性或阴性)样品,第2天对应添加Plasmocin (RTM),第3天对应Plasmocin (RTM) 仍然存在,第4天对应去除Plasmocin (RTM) 并且其中第5天对应所有样品都是无支原体的；

[0112] 图37A示出了在HEK和海拉细胞系(HeLa cell) 中支原体感染对比无支原体的样品中多个显著更高的 m/z 信号。对于图37B,支原体感染(+) 和无支原体的(-) HEK(矩形) 和海拉(三角形) 细胞经过处理(t) 或未经处理(u)。样品展示为在18个重叠 m/z 信号的空间中PCA变换样品的PC1和PC2的函数；

[0113] 图38A和38B示出了海拉(图38A) 和HEK细胞系(图38B) 中无支原体、支原体感染和经PlasmocinTM处理的样品中 $m/z=819.52$ (对应于PG(40:7)) 下经T1C标准化和对数变换的信号强度；

[0114] 图39A-39B示出了来源于在右半结肠切除术期间解剖的肿瘤的中央的癌组织样本的组织类型分布。图39A是呈现结肠直肠组织样本中组织类型分布的DESI-MS图像；原始图像用绿色示出肿瘤组织并用红色示出基质组织。在黑色和白色附图上,肿瘤组织是淡灰色并且基质组织是较暗灰色。图39B是DESI后经H&E染色和组织病理学标注的切片；

[0115] 图40示出了图39中示出的相同组织切片的结肠直肠腺癌、肿瘤周围基质和坏死组织的全扫描质谱。星号指示主要分类标记物；

[0116] 图41示出了展示作为分类标记物的特异性的已知和确认的同源鞘脂物质的单离子图像和代表性强度分布图；对应于 $m/z=705.5562$ 的信号指示神经酰胺磷酸乙醇胺的存在,神经酰胺磷酸乙醇胺又指示拟杆菌纲的成员,如右侧所示；对应于 $m/z=618.5233$ 的信号指示羟基化神经酰胺的存在,羟基化神经酰胺又指示拟杆菌纲的成员,如右侧所示；对应于 $m/z=946.7472$ 的信号指示异-C15:0-取代的磷酸甘油二氢神经酰胺的存在,异-C15:0-取代的磷酸甘油二氢神经酰胺又指示紫单孢菌科(Porphyromonadaceae) 的成员,如右侧所示；

[0117] 图42展示其它分类标记物的单离子图像和强度选择分布图,对应于 $m/z=653.5113$ 的信号指示拟杆菌门的成员,如右侧所示；对应于 $m/z=566.4794$ 的信号指示黄杆菌纲的成员,如右侧所示；对应于 $m/z=731.5253$ 的信号指示梭菌科的成员；以及对应于 $m/z=646.4833$ 的信号指示梭杆菌门的成员,如右侧所示；

[0118] 图43A示出了根据各个实施例对拭子上的微生物样品进行的解吸电喷雾电离(“DESI”) 质谱分析并且说明能够用DESI检测微生物样品,并且图43B示出了与直接来自琼脂板的微生物样品的快速蒸发电离质谱(“REIMS”) 分析结合飞行时间质量分析的比较；

[0119] 图44A示出了所分析的各种微生物物种以及妊娠阴道粘膜的平均解吸电喷雾电离(“DESI”) 质谱,这些物种包括白色念珠菌(*Candida albicans*)、蒙氏假单胞菌(*Pseudomonas montelli*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermis*)、卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumonia*) 和乳杆菌属(*Lactobacillus* sp),并且图44B和44C示出了PCA图,展示前两种成分内阴道粘膜(妊娠组

和非妊娠组)与微生物物种之间的分离,以及不同细菌物种与真菌物种之间的分离;以及

[0120] 图45示出了在使用快速蒸发电离质谱(“REIMS”)分析对粪便样品进行分析时观察到的谱。

具体实施方式

[0121] 尽管已参考优选实施例描述本文提供的方法,但所属领域的技术人员应了解,可以在不脱离所附权利要求书中所阐述的本发明的范围的情况下对形式和细节作出各种改变。

[0122] 已知基于质谱分析(“MS”)的鉴别技术,例如敞开式电离质谱法。例如REIMS等直接敞开式电离质谱法作为允许目标实时分析的技术出现。

[0123] 本文提供的方法可以例如用于稳固的实时表征工具或与其一起使用,所述工具利用敞开式电离技术,例如REIMS。

[0124] 以下更详细地描述各个实施例,所述实施例一般涉及使用敞开式电离离子源从目标产生烟雾、气溶胶或蒸气(其细节提供于本文中的其它地方)。接着可以将气溶胶、烟雾或蒸气与基质混合并抽吸到质谱仪和/或离子迁移谱仪的真空室中。可以使混合物撞击碰撞表面,引起气溶胶、烟雾或蒸气通过碰撞电离来电离,从而产生分析物离子。接着可以对所得分析物离子(或衍生自分析物离子的碎片或产物离子)进行质量分析和/或离子迁移率分析,并且所得质谱和/或离子迁移谱数据可以进行多变量分析或其它数学处理以便实时判定目标的一种或多种特性。

[0125] 敞开式电离离子源

[0126] 在任一种本文提供的方法中,装置可以用于从目标的一或多个区域产生气溶胶、烟雾或蒸气(其细节提供于本文中的其它地方)。所述装置可以包含敞开式电离离子源,敞开式电离离子源的特征在于它能够从目标产生分析物气溶胶、烟雾或蒸气,任选地几乎不用制备目标用于分析。相比之下,其它类型的电离离子源,例如基质辅助激光解吸电离(“MALDI”)离子源要求在电离之前将基质或试剂加入样品中。

[0127] 显然,将基质或试剂直接加入样品中的要求会阻碍对组织进行活体内分析的能力,并且更一般来说,还会阻碍对目标材料进行快速简单分析的能力。

[0128] 敞开式电离技术尤其适用,因为其能够对目标材料进行快速简单分析。尽管执行敞开式电离技术不要求将基质或试剂加入样品,但是所述方法可以任选地包括在分析之前将基质或试剂加入目标(例如直接加入目标)的步骤。可以将基质或试剂加入目标,例如以溶解目标的细胞或在分析期间增强来自其的信号。

[0129] 已知多种不同的敞开式电离技术并意图其属于本发明的范围内。按照历史记录,解吸电喷雾电离(“DESI”)是研发的第一项敞开式电离技术并于2004年公开。自2004年以来,已经研发出多种其它敞开式电离技术。这些敞开式电离技术的不同之处在于其精确电离方法,但这些技术共享直接从样品产生气相离子的相同通用能力(例如不用制备样品用于分析)。意图属于本发明的范围内的各种敞开式电离技术可能不需要任何样品制备用于分析。因此,各种敞开式电离技术能够在没有与将基质或试剂加入目标材料相关的时间、费用和问题下分析目标。

[0130] 在下表中给出意图属于本发明的范围内的敞开式电离技术的名单。

[0131]

首字母缩写	电离技术
DESI	解吸电喷射电离
DeSSI	解吸声波喷雾电离
DAPPI	解吸大气压光致电离
EASI	敞开式简易声波-喷雾电离
JeDI	喷射式解吸电喷射电离
TM-DESI	传输模式解吸电喷射电离
LMJ-SSP	液体微接点表面取样探针
DICE	利用电荷交换的解吸电离
纳米-DESI	纳米喷雾解吸电喷射电离
EADESI	电极辅助解吸电喷射电离
APTDCl	大气压热解吸化学电离
V-EASI	文氏管敞开式简易声波-喷雾电离
AFAI	气流辅助电离
LESA	液体萃取表面分析
PTC-ESI	移液管尖端柱电喷射电离
AFADESI	气流辅助解吸电喷射电离
DEFFI	解吸电流动聚焦电离
ESTASI	静电喷雾电离

[0132]

PASIT	基于等离子体的敞开式取样电离传输
DAPCI	解吸大气压化学电离
DART	实时直接分析
ASAP	大气压固体分析探针
APTDI	大气压热解吸电离
PADI	等离子体辅助解吸电离
DBDI	电介质阻挡放电电离
FAPA	流动大气压余辉
HAPGDI	氦气大气压辉光放电电离
APGDDI	大气压辉光放电解吸电离
LTP	低温等离子体
LS-APGD	液体取样-大气压辉光放电
MIPDI	微波诱导等离子体解吸电离
MFGDP	显微制造辉光放电等离子体
RoPPI	机器人等离子体探针电离
PLASI	等离子体喷雾电离
MALDESI	基质辅助激光解吸电喷雾电离
ELDI	电喷雾激光解吸电离
LDTD	激光二极管热解吸
LAESI	激光烧蚀电喷雾电离
CALDI	电荷辅助激光解吸电离
LA-FAPA	激光烧蚀流动大气压余辉
LADESI	激光辅助解吸电喷射电离
LDESI	激光解吸电喷射电离
LEMS	激光电喷射质谱分析
LSI	激光喷雾电离
IR-LAMICI	红外激光烧蚀亚稳态诱导化学电离
LDSPI	激光解吸喷雾后电离
PAMLDI	等离子体辅助多波长激光解吸电离
HALDI	高压辅助激光解吸电离
PALDI	等离子体辅助激光解吸电离
ESSI	萃取电喷射电离
PESI	探针电喷射电离
ND-ESSI	中性解吸萃取电喷射电离
PS	纸喷雾
DIP-APCI	直接入口探针-大气压化学电离
TS	触控喷雾
牙签	牙签电喷雾
CBS-SPME	涂布刮刀喷雾固相微萃取
TSI	组织喷雾电离
RADIO	射频声解吸电离
LIAD-ESI	激光诱导声解吸电喷射电离
SAWN	表面声波雾化
UASI	超声辅助喷雾电离

[0133]	SPA-纳米 ESI	固体探针辅助纳米电喷雾电离
	PAUSI	纸辅助超声波喷雾电离
	DPESI	直接探针电喷射电离
	ESA-Py	电喷射辅助热解电离
	APPIS	周围压力热电离子源
	RASTIR	远程分析物取样输送和电离中继
	SACI	表面活化化学电离
	DEMI	解吸电喷射亚稳态诱导电离
	REIMS	快速蒸发电离质谱分析
	SPAM	单粒子气溶胶质谱分析
	TDAMS	基于热解吸的敞开式质谱分析
	MAII	基质辅助入口电离
	SAII	溶剂辅助入口电离
	SwiFERR	交换铁电等离子体电离器
	LPTD	莱顿弗罗斯特现象 (Leidenfrost phenomenon) 辅助热解吸

[0134] 根据一个实施例,敞开式电离离子源可以包含快速蒸发电离质谱(“REIMS”)离子源,其中将RF电压施加到一或多个电极以便通过焦耳加热来产生烟雾、气溶胶或蒸气。

[0135] 然而,应了解,还可以利用其它敞开式离子源,包括上文提及的那些离子源。举例来说,根据另一实施例,敞开式电离离子源可以包含激光电离离子源。根据一个实施例,激光电离离子源可以包含中IR激光烧蚀离子源。举例来说,存在若干种激光器,它们发射的辐射接近或达 $2.94\mu\text{m}$,与水的吸收光谱中的峰值相对应。根据各个实施例,敞开式电离离子源可以包含激光烧蚀离子源,基于水在 $2.94\mu\text{m}$ 下的高吸收系数,所述激光烧蚀离子源具有接近 $2.94\mu\text{m}$ 的波长。根据一个实施例,激光烧蚀离子源可以包含发出 $2.94\mu\text{m}$ 下的辐射的Er:YAG激光器。

[0136] 涵盖其它实施例,其中可以使用中红外光参量振荡器(“OPO”)来产生波长比 $2.94\mu\text{m}$ 长的激光烧蚀离子源。举例来说,可以使用Er:YAG泵浦的ZGP-OPO来产生具有例如 $6.1\mu\text{m}$ 、 $6.45\mu\text{m}$ 或 $6.73\mu\text{m}$ 波长的激光辐射。在一些情况下,因为只有表面层将被烧蚀并且引起的热损伤可能较小,所以使用波长比 $2.94\mu\text{m}$ 短或长的激光烧蚀离子源是有利的。根据一个实施例,Co:MgF₂激光可以用作激光烧蚀离子源,其中激光可以从 $1.75\mu\text{m}$ 调到 $2.5\mu\text{m}$ 。根据另一实施例,可以使用Nd:YAG激光泵浦的光参量振荡器(optical parametric oscillator, “OPO”)系统产生具有 2.9 到 $3.1\mu\text{m}$ 之间的波长的激光烧蚀离子源。根据另一实施例,可以使用具有 $10.6\mu\text{m}$ 波长的CO₂激光来产生气溶胶、烟雾或蒸气。

[0137] 根据其它实施例,敞开式电离离子源可以包含超声波烧蚀离子源或混合式电外科-超声烧蚀源来产生液体样品,然后以气溶胶形式抽吸所述液体样品。超声波烧蚀离子源可以包含聚焦或未聚焦超声波。

[0138] 根据一个实施例,用于从目标产生气溶胶、烟雾或蒸气的第一装置可以包含利用RF电压、例如连续RF波形的工具。根据其它实施例,可以使用射频系统,其被布置用于向工具供应脉冲等离子体RF能量。工具可以包含例如PlasmaBlade (RTM)。脉冲等离子体RF工具的操作温度低于常规的电外科工具(例如 40 到 170°C 相比于 200 到 350°C),因此减少热损伤深度。通过沿着绝缘薄电极的切割边缘感应电等离子体进行的切割和凝固操作模式都可以

使用脉冲波形和占空比。

[0139] 根据一个实施例,第一装置包含外科水/生理盐水射流装置(如切除装置)、此类装置与本文中的任一种其它装置的混合物、电外科氩等离子体凝固装置、混合式氩等离子体凝固和水/生理盐水射流装置。

[0140] 涵盖其它实施例,其中用于从目标产生气溶胶、烟雾或蒸气的第一装置可以包含氩等离子体凝固(argon plasma coagulation,“APC”)装置。氩等离子体凝固装置涉及使用通过探针导入的电离氩气(等离子体)射流。探针可以穿过内窥镜。因为探针是放置在距离目标一定距离处,所以氩等离子体凝固基本上是一个非接触的过程。氩气从探针放出,然后通过高电压放电(例如6kV)电离。然后通过气体喷流来传导高频电流,使得目标凝固在喷流的另一末端。凝固深度通常只有几毫米。

[0141] 在本文的任一方面或实施例中所公开的第一装置、外科或电外科工具、装置或探针或其它取样装置或探针可以包含非接触式外科装置,例如水疗外科装置(hydrosurgical device)、外科水射流装置、氩等离子体凝固装置、混合式氩等离子体凝固装置、水射流装置以及激光装置中的一或多个。

[0142] 非接触式外科装置可以定义为被布置和调适用于解剖、碎片化、液化、抽吸、电灼处理(fulgurate)或以其它方式破坏生物组织但不与组织发生实体接触的外科装置。实例包括激光装置、水疗外科装置、氩等离子体凝固装置和混合式氩等离子体凝固装置。

[0143] 由于非接触式装置不会与组织发生实体接触,所以手术可以视为相对安全并能够用于处理具有低胞内键的脆弱组织,例如皮肤或脂肪。

[0144] 根据本发明的各个实施例,第一装置包含敞开式离子源或电离源或形成其一部分;或所述第一装置从目标产生所述气溶胶、烟雾或蒸气并含有离子和/或随后通过敞开式离子源或电离源或其它电离源电离。

[0145] 任选地,第一装置包含装置或离子源或形成其一部分,所述装置或离子源选自由以下各项组成的群组:(i)快速蒸发电离质谱(rapid evaporative ionisation mass spectrometry,“REIMS”)离子源;(ii)解吸电喷雾电离(desorption electrospray ionisation,“DESI”)离子源;(iii)激光解吸电离(laser desorption ionisation,“LDI”)离子源;(iv)热解吸离子源;(v)激光二极管热解吸(laser diode thermal desorption,“LDTD”)离子源;(vi)解吸电流流动聚焦(desorption electro-flow focusing,“DEFFI”)离子源;(vii)电介质阻挡放电(dielectric barrier discharge,“DBD”)等离子体离子源;(viii)大气压固体分析探针(Atmospheric Solids Analysis Probe,“ASAP”)离子源;(ix)超声波辅助喷雾电离离子源;(x)敞开式简易声波-喷雾电离(easy ambient sonic-spray ionisation,“EASI”)离子源;(xi)解吸大气压光致电离(desorption atmospheric pressure photoionisation,“DAPPI”)离子源;(xii)纸喷雾(paperspray,“PS”)离子源;(xiii)射流解吸电离(jet desorption ionisation,“JEDI”)离子源;(xiv)触碰式喷雾(touch spray,“TS”)离子源;(xv)纳米DESI离子源;(xvi)激光烧蚀电喷雾(laser ablation electrospray,“LAESI”)离子源;(xvii)实时直接分析(direct analysis in real time,“DART”)离子源;(xviii)探针电喷雾电离(probe electrospray ionisation,“PESI”)离子源;(xix)固体探针辅助电喷雾电离(solid-probe assisted electrospray ionisation,“SPA-ESI”)离子源;(xx)卡维顿超声波外科抽吸器(cavitron ultrasonic

surgical aspirator, “CUSA”) 装置; (xxi) 混合式CUSA-透热装置; (xxii) 聚焦或未聚焦超声波烧蚀装置; (xxiii) 混合式聚焦或未聚焦超声波烧蚀和透热装置; (xxiv) 微波谐振装置; (xxv) 脉冲等离子体RF解剖装置; (xxvi) 氩等离子体凝固装置; (xxvi) 混合式脉冲等离子体RF解剖和氩等离子体凝固装置; (xxvii) 混合式脉冲等离子体RF解剖和JeD1装置; (xxviii) 外科水/生理盐水射流装置; (xxix) 混合式电外科和氩等离子体凝固装置; 以及 (xxx) 混合式氩等离子体凝固和水/生理盐水射流装置。

[0146] 任选地, 使用所述第一装置产生气溶胶、烟雾或蒸气的步骤包含使所述目标与一或多个电极接触。

[0147] 任选地, 所述一或多个电极包含: (i) 单极装置, 其中任选地提供单独的返回电极; (ii) 双极装置; 或 (iii) 多相RF装置, 其中任选地提供至少一个单独的返回电极。

[0148] 任选地, 所述一或多个电极包含快速蒸发电离质谱 (“REIMS”) 装置或形成其一部分。

[0149] 任选地, 所述方法进一步包含将AC或RF电压施加到所述一或多个电极以产生所述气溶胶、烟雾或蒸气。

[0150] 任选地, 将所述AC或RF电压施加到所述一或多个电极的步骤进一步包含将所述AC或RF电压的一或多个脉冲施加到所述一或多个电极。

[0151] 任选地, 将所述AC或RF电压施加到所述一或多个电极的所述步骤使得热量耗散到所述目标中。

[0152] 任选地, 使用所述第一装置从所述目标的一或多个区域产生气溶胶、烟雾或蒸气的所述步骤进一步包含用激光照射所述目标。

[0153] 任选地, 所述第一装置通过利用焦耳加热或透热从所述目标直接蒸发或汽化目标材料而从所述目标的一或多个区域产生气溶胶。

[0154] 任选地, 使用所述第一装置从所述目标的一或多个区域产生气溶胶、烟雾或蒸气的所述步骤进一步包含将超声波能量导入所述目标中。

[0155] 任选地, 所述气溶胶包含不带电的水性液滴。液滴可以包含细胞物质。

[0156] 任选地, 由所述第一装置产生并形成所述气溶胶的物料或物质的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%可以呈液滴形式。

[0157] 第一装置可以被布置和调适用于产生气溶胶, 其中所述气溶胶的索特平均直径 (Sauter mean diameter, “SMD”, d_{32}) 在以下范围内: (i) $< 5\mu\text{m}$; (ii) $5\text{--}10\mu\text{m}$; (iii) $10\text{--}15\mu\text{m}$; (iv) $15\text{--}20\mu\text{m}$; (v) $20\text{--}25\mu\text{m}$; 或 (vi) $> 25\mu\text{m}$ 。

[0158] 气溶胶可以按以下范围内的雷诺数 (Reynolds number, Re) 穿越流动区域: (i) < 2000 ; (ii) $2000\text{--}2500$; (iii) $2500\text{--}3000$; (iv) $3000\text{--}3500$; (v) $3500\text{--}4000$; 或 (vi) > 4000 。

[0159] 基本上在产生气溶胶时, 气溶胶可以包含具有选自以下各项组成的群组的韦伯数 (Weber number, We) 的液滴: (i) < 50 ; (ii) $50\text{--}100$; (iii) $100\text{--}150$; (iv) $150\text{--}200$; (v) $200\text{--}250$; (vi) $250\text{--}300$; (vii) $300\text{--}350$; (viii) $350\text{--}400$; (ix) $400\text{--}450$; (x) $450\text{--}500$; (xi) $500\text{--}550$; (xii) $550\text{--}600$; (xiii) $600\text{--}650$; (xiv) $650\text{--}700$; (xv) $700\text{--}750$; (xvi) $750\text{--}800$; (xvii) $800\text{--}850$; (xviii) $850\text{--}900$; (xix) $900\text{--}950$; (xx) $950\text{--}1000$; 以及 (xxi) > 1000 。

[0160] 基本上在产生气溶胶时, 气溶胶可以包含具有以下范围内的斯托克斯数 (Stokes number, Sk) 的液滴: (i) $1\text{--}5$; (ii) $5\text{--}10$; (iii) $10\text{--}15$; (iv) $15\text{--}20$; (v) $20\text{--}25$; (vi) $25\text{--}30$;

(vii) 30-35; (viii) 35-40; (ix) 40-45; (x) 45-50; 以及 (xi) >50。

[0161] 基本上在产生气溶胶时,气溶胶可以包含具有选自由以下各项组成的群组的平均轴向速度的液滴:(i) <20m/s; (ii) 20-30m/s; (iii) 30-40m/s; (iv) 40-50m/s; (v) 50-60m/s; (vi) 60-70m/s; (vii) 70-80m/s; (viii) 80-90m/s; (ix) 90-100m/s; (x) 100-110m/s; (xi) 110-120m/s; (xii) 120-130m/s; (xiii) 130-140m/s; (xiv) 140-150m/s; 以及 (xv) >150m/s。

[0162] 任选地,所述气溶胶包含不带电的水性液滴。液滴可以包含细胞物质。

[0163] 任选地,所述方法包含使至少一些所述气溶胶、烟雾或蒸气或者其中的分析物电离,以便产生分析物离子;其中对所述分析物离子进行分析以获得所述谱数据。

[0164] 任选地,所述方法包含将至少一些所述气溶胶、烟雾或蒸气导入或抽吸到质谱仪和/或离子迁移谱仪的真空室中;和/或在所述谱仪的真空室或所述真空室内使至少一些所述气溶胶、烟雾或蒸气或者其中的分析物电离,以便产生多个分析物离子。

[0165] 任选地,所述方法包含使所述气溶胶、烟雾或蒸气或者其中的分析物撞击任选地位于所述谱仪的真空室或所述真空室内的碰撞表面,以便产生所述多个分析物离子。

[0166] 任选地,碰撞表面可以加热。碰撞表面可以加热到选自由以下各项组成的群组的温度:(i) 约<100℃; (ii) 约100-200℃; (iii) 约200-300℃; (iv) 约300-400℃; (v) 约400-500℃; (vi) 约500-600℃; (vii) 约600-700℃; (viii) 约700-800℃; (ix) 约800-900℃; (x) 约900-1000℃; (xi) 约1000-1100℃; 以及 (xii) 约>1100℃。

[0167] 任选地,所述方法包含将基质加入所述气溶胶、烟雾或蒸气;

[0168] 任选地,其中所述基质选自由以下各物组成的群组:(i) 所述气溶胶、烟雾或蒸气或者其中的分析物的溶剂;(ii) 有机溶剂;(iii) 挥发性化合物;(iv) 极性分子;(v) 水;(vi) 一种或多种醇;(vii) 甲醇;(viii) 乙醇;(ix) 异丙醇;(x) 丙酮;(xi) 乙腈;(xii) 1-丁醇;(xiii) 四氢呋喃;(xiv) 乙酸乙酯;(xv) 乙二醇;(xvi) 二甲亚砜;醛;(xviii) 酮;(xiv) 非极性分子;(xx) 己烷;(xxi) 氯仿;(xxii) 丁醇;以及 (xxiii) 丙醇。

[0169] 任选地,所述方法可以使用负离子模式进行,因此任选地,所述方法包含分析使用负离子模式获得的谱数据。任选地,所述方法可以使用正离子模式进行,因此任选地,所述方法包含分析使用正离子模式获得的谱数据。任选地,所述方法包含分析使用负离子模式获得的谱数据和分析使用正离子模式获得的谱数据。

[0170] 基质和/或气溶胶、烟雾或蒸气可以掺杂有一种或多种添加剂以例如增强基质对分析物的溶剂化或稀释,或增强气溶胶、烟雾或蒸气内的分析物的电离。

[0171] 掺杂化合物可以是酸性或碱性添加剂,例如甲酸或二乙胺。

[0172] 基质和/或掺杂化合物会引起气溶胶、烟雾或蒸气中的分析物的衍生。举例来说,基质和/或掺杂化合物会引起分析物中的胆固醇或类固醇的衍生。这可能使分析物更容易电离。

[0173] 快速蒸发电离质谱分析(“REIMS”)

[0174] 尽管在本发明中各种不同的敞开式电离离子源可以用于分析多个目标,但现在将描述对微生物群体进行REIMS分析的方法以帮助理解实施例。

[0175] 图10A示出了可以用于分析例如微生物培养物等目标的设备。所述设备包含呈钳子102形式的一对手持式电极106、108(即第一装置);用于向电极106、108供应RF电压的RF电源103;质谱仪的入口105;和将钳子102的后端处的端口112连接到质谱仪的入口105的管

道104。钳子102和RF电源103可以被配置成使得钳子102是双极钳。如图10B所示,开放入口110被设置在钳子102的前部处的电极106中的一个电极的尖端中。此入口110向电极106内的导管111敞开。导管111延伸穿过电极106到达钳子102的后部中的出口112,如图10C所示。

[0176] 如图10A所示,有待被分析的样品/目标可以例如呈微生物球粒101形式提供。微生物球粒可以提供于例如埃彭道夫管(Eppendorf tube)等容器107中。可以将钳子102插入,与微生物球粒101接触,以便在电极106、108的尖端上从微生物球粒101获得生物质。随后可以例如通过将生物质夹捏在钳子102的尖端之间,使两个电极106、108彼此紧靠。RF电源103可以例如使用脚踏开关触发以便向电极106、108供给能量。这使得微生物生物质由于其非零阻抗而快速加热(例如通过焦耳或透热加热),并且从生物质放出烟雾、气溶胶或蒸气。烟雾、气溶胶或蒸气可以含有生物质中的分析物的带电分子物质。

[0177] 虽然图10a中示出了例如埃彭道夫管等容器107,但可替代地,目标可以是例如在皮氏培养皿上的例如微生物生物质,例如微生物菌落。

[0178] 接着可以捕捉或者抽吸烟雾、气溶胶或蒸气穿过入口110,并进入钳子102中的导管111。然后烟雾、气溶胶或蒸气通过导管111,从出口112出来,沿着管道104并进入质谱仪的入口105。质谱仪的固有真空系统可以用于将烟雾、气溶胶或蒸气从入口110抽取到谱仪105的入口。

[0179] 图11示出了第一装置(例如钳子102)与质谱仪之间的界面的一实施例的示意图。仪器可以包含离子分析器207,所述离子分析器具有入口206(对应于图10A中的入口5)、真空区208、布置在真空区208内的碰撞表面209和离子光学件212(例如Stepwave(RTM)离子导向器)。仪器还包含样品转移管202(对应于图10中的管道4)和基质引入导管203。样品转移管202具有用于从研究的样品/目标接收烟雾、气溶胶或蒸气样品201(对应于关于图10描述的样品)的入口和连接到离子分析器207的入口206的出口。基质引入导管203具有用于接收基质化合物的入口和与样品转移管202相交以允许基质204与样品转移管202中的气溶胶样品201互混的出口。T接头组件可以设置于管202、203和206之间的接头处。管202、203和206可以通过可拆卸方式插入到T接头中。

[0180] 现在将描述图11中示出的仪器的操作方法。例如微生物群体物质等样品/目标可以经受REIMS技术。举例来说,第一装置(例如钳子102)可以用于产生气溶胶,例如如上关于图10A-10C所述。接着将气溶胶粒子201引入样品转移管202的入口中。将基质化合物204引入基质引入导管203的入口中。通过由真空室208处于比管202、203的入口低的压力下所引起的压差,气溶胶粒子201和基质化合物204被吸向离子分析器207的入口206。气溶胶粒子201可能在样品转移管202与基质引入导管203相交的区域中和下游遇到基质化合物204的分子。气溶胶粒子201与基质204互混,从而形成含有基质分子的气溶胶粒子205,其中存在气溶胶样品201和基质化合物204的分子成分。基质分子204可能相比于气溶胶样品201的分子成分过量。

[0181] 粒子205可以离开样品转移管202并进入离子分析器207的入口206中。接着粒子205进入减压区208并由于从样品转移管202进入真空区208的气体的绝热膨胀以及由于相关自由射流形成而使得线速度大大增加。加速的粒子205可能撞击在碰撞表面209上,其中撞击事件使粒子205碎片化,导致最终形成气溶胶样品201的分子成分的气相离子210以及形成基质分子211。可以将碰撞表面209控制和维持在基本上高于环境温度的温度下。

[0182] 基质204包括分析物201的溶剂,使得分析物201被基质204溶解,进而消除了分析物分子201之间的分子间键结。因此,当溶解的分析物205接着与碰撞表面209碰撞时,溶解的分析物205将破碎成液滴并且任何产生的液滴所含的分析物分子可能比不存在基质的情况下所含的分析物分子少。这在蒸发每个液滴中的基质时又引起分析物离子210更高效地产生。基质可以包括所述气溶胶、烟雾或蒸气或其中的分析物的溶剂;有机溶剂;挥发性化合物;极性分子;水;一种或多种醇;甲醇;乙醇;异丙醇;丙酮;乙腈;1-丁醇;四氢呋喃;乙酸乙酯;乙二醇;二甲亚砜;醛;酮;非极性分子;己烷;氯仿;或丙醇。异丙醇备受关注。

[0183] 基质分子211可以自由扩散到真空中。相比之下,气溶胶样品201的分子成分的气相离子210可以通过离子光学件212转移到离子分析器207的分析区(未示出)。可以通过向离子光学件212施加电压将离子210引导到分析区。

[0184] 离子光学件212可以是StepWave (RTM) 离子导向器。碰撞表面可以沿着StepWave (RTM) 离子导向器的大开口的中心轴并与之相邻安置。正如所属领域的技术人员将了解,StepWave (RTM) 离子导向器包含两个联合的离子隧道离子导向器。每个离子导向器包含多个环或其它电极,其中离子通过由环或其它电极提供的中心孔口。离子连同可能存在的任何中性物进入离子导向器中的第一个,并经过第一离子导向器。接着离子正交地导入离子导向器中的第二个中并穿过其。向电极施加瞬态DC电压或电位以驱动离子穿过所述电极。StepWave (RTM) 离子导向器是基于叠层环离子导向器技术并且被设计成使从来源到质量和/或离子迁移率分析器的离子传输最大化。所述装置允许有效去除中性污染物,因为中性物不正交地导入第二离子导向器中,进而增强总体信噪比。此设计能够有效捕获进入第一下部平台的散开的离子云,然后离子云可以聚焦到上部离子导向器以便传输到离子分析器。接着利用离子分析器分析离子,所述离子分析器可以包含质谱仪和/或离子迁移谱仪,或两个谱仪的组合。作为分析的结果,可以获得关于样品201的化学信息。

[0185] 液体捕集器或分离器可以设置在第一装置(例如钳子2)与分析器之间,其捕获或丢弃由探针抽吸的非所需液体,同时可以允许烟雾、气溶胶或蒸气自身相对不受抑制地传到质谱仪。这阻止了非所需液体到达分析器,同时不影响烟雾、气溶胶或蒸气的测量。液体捕集器或分离器可以被布置用于捕获所述液体以随后丢弃。

[0186] 如上文所述,尽管已经描述REIMS用于产生烟雾、气溶胶或蒸气以供分析的实施例,但可以使用其它敞开式电离技术,例如解吸附电喷雾电离(“DESI”)。

[0187] 解吸电喷雾电离(“DESI”)

[0188] 还发现解吸电喷雾电离(“DESI”)是一种对微生物和/或化合物进行实时快速和直接分析尤其有用并且适宜的方法。DESI技术允许直接并快速分析表面而不需要事先制备样品。现在将参看图12A-12B详细地描述此技术。

[0189] 如图12A-12B中所示,DESI技术是一种包括将(一次)带电液滴301的喷雾引导到目标304上的敞开式电离方法。电喷雾通过喷雾器300气动地引向目标304,在所述喷雾器中,后续飞溅的(二次)液滴305携带解吸电离的分析物(例如解吸的脂质离子)。喷雾器300可以供应有溶剂306、气体307(例如氮气)和来自高电压源308的电压。电离后,离子穿过空气,例如经由传输毛细管310进入质谱仪和/或离子迁移谱仪和/或质量和/或离子迁移率分析器(未显示)的大气压界面309中。离子可以通过关于图11所描述的方法或通过其它方法来分析。举例来说,图12A的传输毛细管310可以对应于图11中的样品转移管202。传输毛细管310

可以加热到例如高达500℃的温度。

[0190] DESI技术允许例如直接分析目标,例如微生物群体,例如不需要提前制备任何样品用于分析。

[0191] 通用方法

[0192] 提供了一种使用质谱法和/或离子迁移谱法进行分析的方法,所述方法包含:

[0193] (a) 使用第一装置从包含微生物群体或由其组成的目标产生烟雾、气雾或蒸气;

[0194] (b) 对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析,以获得谱数据;以及

[0195] (c) 分析所述谱数据以分析所述微生物群体。

[0196] 本文中的其它地方定义合适目标。

[0197] 所述方法可以任选地是一种分析微生物和/或化合物的方法。因此,任选地,所述方法可以包含基于所述谱数据分析所述目标中存在的微生物和/或化合物的步骤。

[0198] 应了解,本文中对“分析”目标的任何提及打算意指基于谱数据对目标进行分析。因此,举例来说,例如“分析微生物”等表述意指基于谱数据检测、鉴别和/或表征微生物。例如“鉴别微生物”或“分析谱数据以鉴别微生物”等表述意指基于谱数据确定微生物的身份。

[0199] 将在下文更详细地描述多种任选的特征。

[0200] 方法可以任选地是一种检测微生物感染,例如阴道感染的方法;一种鉴别微生物,例如病原性微生物的方法,所述方法可以任选地包括鉴别微生物,例如病原性微生物的步骤;一种确认样品中存在微生物的方法,所述方法可以任选地包括确认样品中微生物的存在步骤;一种自动鉴别微生物的方法,所述方法可以任选地包括自动鉴别微生物的步骤;一种鉴别样品中的细胞类型的方法,所述方法可以任选地包括鉴别样品中的细胞类型的步骤,其中细胞任选地是微生物细胞;一种检测、鉴别和/或表征例如体液等液体介质中的微生物的方法,所述方法可以任选地包括检测、鉴别和/或表征例如体液等液体介质中的微生物的步骤;一种检测、鉴别和/或表征食品中的微生物的方法,所述方法可以任选地包括检测、鉴别和/或表征食品中的微生物的步骤;一种检测、鉴别和/或表征病毒的方法,所述方法可以任选地包括检测、鉴别和/或表征病毒的步骤;一种表征微生物对抗微生物剂敏感或具抗性,例如细菌对抗生素敏感或具抗性的方法,所述方法可以任选地包括表征微生物对抗微生物剂敏感或具抗性,例如细菌对抗生素敏感或具抗性的步骤;一种鉴别感染是由对抗微生物剂具抗性或敏感的微生物,例如对抗生素敏感或具抗性的细菌引起的方法,所述方法可以任选地包括鉴别感染是由对抗微生物剂具抗性或敏感的微生物,例如对抗生素敏感或具抗性的细菌引起的步骤;一种追踪感染性疾病的扩散的方法,所述方法可以任选地包括追踪感染性疾病的扩散的步骤;一种检测、鉴别或表征临床样本中的微生物的方法,所述方法可以任选地包括检测、鉴别或表征临床样本中的微生物的步骤;一种检测、鉴别或表征微生物混合物,例如复杂微生物混合物中的微生物的方法,所述方法可以任选地包括检测、鉴别或表征微生物混合物,例如复杂微生物混合物中的微生物的步骤;一种检测、鉴别或表征微生物脂质的方法,所述方法可以任选地包括检测、鉴别或表征微生物脂质的步骤;一种用于鉴别受试者生物样品的代谢状态的代谢分布分析方法,所述方法可以任选地包括代谢分布分析和鉴别受试者生物样品的代谢状态的步骤;一种用于检测、鉴别和/或表征从例如细胞内细菌等微生物分泌的蛋白质和/或代谢物的方法,所述方法可以任选地包括检

测、鉴别和/或表征从例如细胞内细菌等微生物分泌的蛋白质和/或代谢物的步骤；和/或一种分析伤口的方法，任选地一种分析来自伤口的流体和/或组织的方法，其任选地包含使用一或多个蛋白质或其它鉴别数据库，所述方法可以任选地包括分析伤口、任选地分析来自伤口的流体和/或组织的步骤，其任选地包含使用一或多个蛋白质或其它鉴别数据库。

[0201] 所述方法中的分析受试者可以方便地称为“目标实体”。因此，任选地，目标实体可以是例如微生物和/或化合物。

[0202] 在一个方面，方法可以是一种分析微生物、微生物的相互作用、微生物的生物标记物和/或微生物组的方法。因此，所述方法可以任选地包含分析微生物、微生物的相互作用、微生物的生物标记物和/或微生物组的步骤。

[0203] 在一个方面，方法可以是一种分析微生物的基因型和/或表型的方法。因此，所述方法可以任选地包含分析微生物的基因型和/或表型的步骤。

[0204] 在一个方面，方法可以是一种分析粪便和/或体液样本以例如分析微生物和/或化合物的方法。因此，所述方法可以任选地包含分析粪便和/或体液样本以例如分析微生物和/或化合物的步骤。

[0205] 在一个方面，方法可以是一种分析化合物的方法。因此，所述方法可以任选地包含分析化合物和/或化合物的生物标记物的步骤。

[0206] 任选地，所述方法可以包括2个或更多个本文中所公开的方面，例如3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个。举例来说，所述方法可以任选地包含分析粪便和/或体液样本的步骤，其中分析微生物的生物标记物和/或化合物的生物标记物。

[0207] 下文论述任一这些方法的任选的特征。因此，除非另有说明，否则对“一种方法”或“所述方法”的任何提及意图是对本文中所提供的任一方法的提及。明确期望这些特征中的任一个能够以任何组合存在于任一这些方法中。

[0208] 方法可以任选地是一种筛选方法，例如出于药物开发的目的。因此，任选地，所述方法可以包含分析微生物群体对测试药剂或条件的反应的步骤。

[0209] 任选地，可以分析微生物的身份。任选地，可以分析目标的感染。任选地，可以分析微生物群体的均质性和/或异质性。任选地，可以分析微生物群体或其中存在的一种或多种微生物类型的基因型和/或表型。任选地，可以分析微生物群体或其中存在的一种或多种微生物类型的状态。任选地，可以分析涉及微生物群体或其中存在的一种或多种微生物类型的过程。任选地，可以分析操纵微生物群体或其中存在的一种或多种微生物类型的基因型和/或表型的影响。任选地，可以分析操纵微生物群体的环境条件的影响。任选地，所述方法可以用于区别微生物群体内的2个或更多个不同微生物类型。任选地，可以分析物质对微生物群体的影响。任选地，可以分析微生物群体对物质的利用、产生和/或分解。任选地，可以分析多个微生物群体以分析其利用、产生和/或分解物质的能力。因此，任选地，可以筛选多个微生物群体以分析其在物质的产生、分解和/或利用方面的产率或效率。任选地，可以分析微生物群体的存活力。

[0210] 方法可以是一种根据微生物群体的长期存活力、稳固性和/或效率预测微生物群体的存活力，或获得与其相关的信息的方法。

[0211] 在一个方面，方法可以是一种分析疾病和/或疾病的生物标记物的方法。因此，所述方法可以任选地包含分析疾病和/或疾病的生物标记物的步骤。

[0212] 方法可以是一种关于以下,或获得与以下相关的信息的方法:

[0213] (i) 诊断疾病;(ii) 监测疾病的进展或发展;

[0214] (iii) 疾病预后;(iv) 预测疾病对治疗起反应的可能性;(v) 监测疾病对治疗的反应;和/或(vi) 将受试者分层。

[0215] 因此,所述方法可以任选地包含分析谱数据和基于谱数据进行以下各项的步骤:

(i) 诊断疾病;(ii) 监测疾病的进展或发展;(iii) 疾病预后;(iv) 预测疾病对治疗起反应的可能性;(v) 监测疾病对治疗的反应;和/或(vi) 将受试者分层。

[0216] 适合疾病的细节提供于本文中的其它地方。

[0217] 在一个方面,方法可以是一种分析微生物、微生物的相互作用和/或微生物的生物标记物的方法。因此,所述方法可以任选地包含分析微生物、微生物的相互作用和/或微生物的生物标记物的步骤。

[0218] 在一个方面,方法可以是一种分析细胞的基因型和/或表型的方法。因此,所述方法可以任选地包含分析细胞的基因型和/或表型的步骤。

[0219] 在一个方面,方法可以是一种治疗方法。因此,方法可以任选地包含向有需要的受试者给予治疗有效量的治疗剂的步骤。

[0220] 在一个方面,方法可以是一种分析化合物的方法。因此,所述方法可以任选地包含分析化合物和/或化合物的生物标记物的步骤。

[0221] 下文论述任一这些方法的任选的特征。因此,除非另有说明,否则对“一种方法”或“所述方法”的任何提及意图是对本文中所提供的任一方法的提及。明确希望这些特征中的任一个能够以任何组合存在于任一这些方法中。

[0222] 技术人员应了解,本文所提供的任一方法都可以任选地与本文所提供的其它方法中的一种或多种和/或一种或多种其它方法组合。

[0223] 举例来说,提供一种方法,它是本文公开的方法中的两种或更多种方法,例如三种或更多种方法、四种或更多种方法或五种或更多种方法的组合。

[0224] 目标和其分析

[0225] 方法可以在可以包含微生物群体或由其组成的“目标”上进行。

[0226] 术语“目标实体”在本文中用于指目标内需要分析的实体。因此,对“目标”的任何提及应理解为意指包含一或多个不同目标实体的目标。因此,目标实体可以是微生物和/或化合物。举例来说,目标可以是组织并且目标实体可以是细菌。

[0227] 术语“分析(analysis/)”、“分析(analysing)”和这些术语的派生词在本文中用于涵盖以下中的任一个:检测目标实体;鉴别目标实体;表征目标实体;确定目标实体的位置;确定状态,例如疾病状态;和/或确定目标实体的空间分布。

[0228] 假定单个微生物低于方法的侦测极限,应理解对分析“微生物”的任何提及意指分析微生物群体。然而,从上下文很明显,术语“微生物”有时用于指示可以分析总微生物群体内的具体微生物类型。因此,术语“微生物”可以是微生物亚群的简写。

[0229] 分析可以是定性的和/或定量的。因此,任选地,任何类型的分析都可以涉及测定目标实体的浓度、百分比、相对丰度等。举例来说,可以分析目标中微生物的相对丰度和/或化合物的浓度。任选地,可以分析目标实体的增加或减少。

[0230] 术语“检测(detection)”、“检测(detecting)”和这些术语的派生词在本文中可互

换地用于意指测定目标实体或其生物标记物的存在或不存在。

[0231] “鉴别”化合物意指获得至少一些关于化合物的结构和/或功能的信息,例如信息可以任选地将化合物鉴别为包含选自本文所公开的任何类型的化合物或由所述化合物组成,和/或将其鉴别为其特征在于本文所公开的官能团中的一或多个。

[0232] 目标可以任选地由微生物群体组成,例如是微生物培养物。在此背景下,应了解可能存在培养基、产生和/或分泌的化合物等等,并且术语“由微生物群体组成”用于指示不存在非微生物细胞物质。因此,任选地,目标不包含任何完整的非微生物细胞和/或不包含溶解的非微生物细胞。任选地,本文中对由微生物群体“组成”的目标的任何提及与对“由微生物群体和一种或多种细胞外化合物组成”的目标的提及可互换使用。

[0233] 或者,目标可以包含微生物群体和非微生物细胞物质。举例来说,其可以包含组织、完整细胞和/或溶解细胞,例如其可以是组织或组织样本、粪便样本和/或体液样本。

[0234] 目标可以例如是上面或其中可以存在微生物群体的任何东西。因此,目标可以是例如来源于受试者的样本、临床样本、环境样本、食物、饮料、植物、植物样本、动物样本、受试者和/或包含微生物的物体。

[0235] 微生物群体可以包含一种或多种不同微生物类型或由其组成。微生物的细节提供于本文中的其它地方。任选地,微生物群体可以包含具有本文中的其它地方列出的任一微生物的身份的微生物或由其组成。

[0236] 除非另外说明,否则在单细胞微生物的情况下本文中对“细胞”的任何提及应理解为是对微生物细胞或对微生物的提及。

[0237] 任选地,微生物群体可以是突变和/或转基因的。

[0238] 任选地,微生物群体可以具有或被/已经被基因操纵成具有选自营养缺陷型、产生所需化合物和/或分泌所需化合物的一种或多种特性。任选地,微生物群体可以被或已经被基因操纵,例如转基因和/或具有基因敲除的基因型和/或表型。

[0239] 基因操纵和微生物特性的细节提供于本文中的其它地方。

[0240] 任选地,方法可以包含分析一或多个同基因的微生物群体。

[0241] 本文中对“微生物群体”的分析的任何提及应理解为意指可以分析整个微生物群体或其样品。

[0242] 方法可以任选地在整个微生物群体上或在其样品上或在目标的区域上进行,尤其是目标是受试者或例如组织等样本的情况下。

[0243] “受试者”可以是人或非人动物。受试者可以是活的或死的。如果所述方法在活受试者上进行,那么它可以称为体内方法。如果所述方法在样本上进行,那么它可以称为体外或离体方法。因此,样本可以来自人或非人动物。

[0244] 任选地,动物可以是哺乳动物,任选地选自例如任何牲畜、家畜或实验室动物,如小鼠、豚鼠、仓鼠、大鼠、山羊、猪、猫、狗、绵羊、兔、牛、马和/或猴。任选地,它可以是昆虫、鸟或鱼,例如苍蝇或蠕虫。因此,涵盖兽医学应用。

[0245] 方法可以任选地在体内目标上,即在活受试者上进行。举例来说,可以通过使用热烧蚀方法进行所述方法。

[0246] 可替代地或另外,它可以任选地在死受试者上进行,例如作为尸检或尸体处理(necroscopy)的一部分。

[0247] 可替代地或另外,它可以任选地在离体或体外目标上,例如在可以是临床样本的样本上进行。样本可以任选地是所提供的样本,即事先从受试者获得或取出的样本。任选地,所述方法可以包括从受试者获得样本的步骤。

[0248] 因此,它可以任选地在样本上进行,样本可以任选地选自例如组织样本、体液样本和/或粪便样本。举例来说,样本可以是手术切除样本、活检样本、拭子和/或刮片。

[0249] 组织样本可以包含人组织、非人动物组织和/或植物组织或由其组成。

[0250] 切除是手术去除组织的一部分或全部。

[0251] 活检样本可以任选地例如通过使用针抽取包含细胞的组织和/或流体、通过使用内窥镜和/或在手术期间来获得。活检可以任选地是切取的、切除的或是从手术切除取回的。活检样本包含细胞并且可以任选地是组织样本,例如包含病变组织和/或非病变组织或由其组成。

[0252] “拭子”意图理解为包含“标准医用拭子”,即被设计用于对例如粘膜等生物样品取样的拭子。举例来说,术语“标准医用拭子”应理解为涵盖“棉签”(英国)或“棉拭子”(美国),即围绕管一端或两端缠绕一小团棉花。管可以由塑料、卷纸或木材制成。

[0253] 拭子可以任选地例如包含组织或其它细胞物质,例如粘膜样品。

[0254] 刮片可以例如任选地是已经刮涂到固体载体上,例如两个载玻片之间的样本。

[0255] 体液可以例如任选地选自血液、血浆、血清、痰液、灌洗液、脓液、尿液、唾液、粘液、呕吐物、粪便、羊水、脑脊髓液、胸膜液、精液、阴道分泌物、间隙液和/或淋巴。任选地,它可以干燥、用拭子收集和/或分配到例如滤纸或纸等吸附载体上。任选地,它可以是球粒。球粒可以例如如下所述制备。

[0256] 目标组织、粪便和/或体液样本的分析可以提供关于微生物、微生物相关疾病和/或微生物组,任选地是粘膜微生物组和/或GI腔的微生物组的信息。因此,任选地,方法可以涉及粪便和/或体液样本的分析。举例来说,可以分析粪便和/或体液标本中化合物和/或微生物的存在。

[0257] 方法可以任选地允许分析各种微生物群体之间的代谢差异。通过鉴别分类特异性生物标志物,方法可以任选地允许分析,例如诊断微生物感染和/或混合微生物群落。

[0258] 任选地,可以分析粪便和/或体液样本中微生物的存在,以分析微生物群体,分析化合物和/或分析微生物组。

[0259] “微生物培养物”意指进行培养以维持和/或繁殖微生物的微生物群体。微生物培养物可以例如是液体、半固体或固体培养物。微生物培养物可以例如是来自培养物保藏中心的培养物、来源于环境样品的培养物、来源于临床样本的培养物、来源于受试者或物品的培养物等等。培养物可以通过例如经由拭子获取样品,将所述样品接种在合适培养基中或合适培养基上并在合适的条件下培育培养基合适的时间长度以允许其中存在的任何微生物生长而“来源”于受试者、样本等等。熟知可以是固体、软质或液体的合适培养基和培养条件的细节并且也提供在本文中的其它地方。

[0260] 微生物培养物可以例如呈悬浮培养物、菌落、细菌或真菌菌苔、病毒斑或生物膜的形式。任选地,它可以干燥、用拭子收集和/或分配到例如滤纸或纸等吸附载体上。任选地,它可以是球粒。球粒可以例如如下所述制备。

[0261] 包含微生物群体的物品可以是任选地已知或疑似包含微生物,例如被微生物

感染、污染或定殖的任何物品。物品可以例如是家用物品、工具、手术工具或仪器、一件家具、操作面、一件衣服、织物等等。

[0262] 食物可以例如是肉、鱼、蔬菜、水果和/或坚果。它可以任选地是加工食物，例如香肠或糊，或未加工食物，例如肉排。

[0263] 方法可以任选地涉及分析一或多个不同目标。任选地，可以分析2个或更多个来自不同受试者或物品和/或来自受试者或物品内不同位置的目标。任选地，目标可以处于或来自2个或更多个不同位置，例如样本可以处于或来自受试者或物品中/的2个或更多个位置。

[0264] 任选地，目标可以处于或来自已知或疑似健康、未被感染或无菌的一或多个位置；以及已知或疑似患病、被感染或非无菌的一或多个位置。

[0265] 任选地，方法可以包括分析目标的2个或更多个位置。任选地，可以分析目标的相异位置，例如可以对一系列点取样，任选地具有或不具有用于达成成像目的的空间编码信息。

[0266] 分析可以任选地在手术中进行，即在进行外科手术的同时。因此，分析可以任选地用于提供目标的实时分析。分析可以任选地用于鉴别疾病边缘。疾病边缘可以任选地例如通过分析目标区域中具体微生物类型的浓度来分析。分析可以任选地在体内，例如在外科手术期间进行。此可以任选地包括使用例如热烧蚀手术方法，例如REIMS技术，例如iKnife技术。举例来说，可以在体内分析上面执行手术的组织，例如感染组织并且分析结果可以用于告知、影响或决定进一步的手术步骤。

[0267] 手术可以任选地是关于本文中提及的任一疾病的手术，例如癌症手术等等。手术可以任选地是腹腔镜手术和/或内窥镜手术。

[0268] 分析可以任选地在体外或离体进行。此可以任选地例如与外科手术同时进行。举例来说，可以在外科手术期间获得样本，例如活检。接着可以离体分析所提供的此类样本，并且分析结果可以用于告知、影响或决定进一步的手术步骤。

[0269] 方法可以任选地在天然的目标上进行。“天然”意指目标在进行本文提供的方法之前尚未经改性。具体地说，目标可以是天然的，因为在进行本文提供的方法之前微生物未经受溶解或萃取步骤，例如脂质萃取。因此，目标可以是天然的原因在于微生物群体中的所有或基本上所有的微生物是完整的。因此，目标可以是天然的原因在于它尚未经化学或物理改性，因此在化学和物理上是天然的。任选地，目标可以在化学上是天然，即它可以未经化学改性，意指它尚未与化学剂接触以改变其化学性质。目标与基质接触是化学改性的一个实例。

[0270] 任选地，目标可以在物理上是天然，即它可以在物理上未经改性，意指它尚未经物理改性。冷冻、解冻和/或切片是物理改性的实例。技术人员应了解，尽管如冷冻等物理动作会影响样本的化学性质，但出于本文提供的方法的目的，此类动作不被认为是化学改性。

[0271] 因此，任选地，目标可以是化学上天然的，但不是物理上天然的，例如因为它已经冷冻和/或切片。

[0272] 任选地，目标可以冷冻、事先冷冻并接着解冻、固定、切片和/或以其它方式制备，如关于样本制备所论述。任选地，方法可以在尚未经受制备步骤的目标上进行，尤其是出于质谱分析和/或离子迁移率分析的目的。

[0273] 目标可以任选地在从目标产生烟雾、气溶胶或蒸气之前未/尚未与溶剂或除水以外的溶剂接触。

[0274] 另外或可替代地,目标可以任选地在从目标产生烟雾、气溶胶或蒸气之前未/尚未与基质接触。举例来说,目标可以未/尚未与MALDI基质或其它用于帮助目标中的材料电离的基质接触。MALDI基质可以例如包含小有机酸,例如 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA) 和/或2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB) 或由其组成

[0275] 方法可以任选地在已经针对具体质谱分析和/或离子迁移率分析制备的目标上进行;和/或在已经针对本文中的其它地方提及的任一分析方法制备的目标上进行。

[0276] 样本制备(针对本文所提供的任一方法和/或本文中所公开的任一分析方法)可以任选地涉及以下中的一或多个。

[0277] 样本或其部分可以任选地沉积于如玻璃或塑料载玻片等固体表面上。

[0278] 样本可以任选地化学固定,或经由冷冻切片程序固定,例如以保存组织和/或微生物避免降解,并维持细胞和例如细胞器(例如细胞核、内质网和/或线粒体)等亚细胞组分的结构。固定剂可以例如是10%中性缓冲福尔马林。样本可以任选地用例如环氧树脂或丙烯酸系树脂加工以允许或促进切片切割。样品可以任选地包埋于例如石蜡中。样本可以任选地切割成例如1 μ m到200nm的切片。举例来说,对于光学显微镜来说,样本可以任选地是约5 μ m厚,或对于电子显微镜检查来说,约80-100nm厚。任选地,样本可以切割成至少1、3、5、7、9、10、12、14、16、18、20、22、24或25 μ m并且至多100、90、80、70、60、50、40、35、30、28或26 μ m,例如5-25 μ m的切片。

[0279] 冷冻切片可以任选地例如通过冷冻和样本切片来制备。在冷冻前,样本可以任选地例如如上所述进行包埋。包埋培养基在冷冻期间帮助将热从样本导走,帮助保护组织避免在存储期间干燥,并在切片期间支撑组织。

[0280] 可以任选地进行冷冻,例如通过使样本与合适的冷却介质,如干冰、液氮或例如异戊烷(2-甲基丁烷)等已经在干冰或液氮中冷却的试剂接触。冷冻样本可以任选地存储在例如约-80 $^{\circ}$ C与-4 $^{\circ}$ C之间,例如-70 $^{\circ}$ C或-20 $^{\circ}$ C下,并且在执行本文所述的方法之前可以任选地解冻。

[0281] 样本或其切片可以例如用苏木精和曙红(H&E染色剂)染色。苏木精是一种碱性染料,由于它对细胞核中的核酸具有亲和力,所以将细胞核染成蓝色;曙红是一种酸性染料,它将细胞质染成粉红色。

[0282] 任选地,可以分析任选地组织的病变。病变是组织中作为例如损伤或疾病的结果的异常区域。病变可以例如选自伤口、溃疡、脓肿和/或肿瘤。损害可以是例如糖尿病性病变,如糖尿病肢体或四肢,或糖尿病性溃疡。

[0283] 任选地,可以分析组织,例如患有癌症或坏死或癌症或坏死附近的组织。

[0284] 组织可以任选地选自肾上腺组织、阑尾组织、膀胱组织、骨骼、肠组织、脑组织、乳房组织、支气管、耳组织、食管组织、眼组织、子宫内膜样组织、胆囊组织、生殖器组织、心脏组织、下丘脑组织、肾脏组织、大肠组织、肠道组织、喉组织、肝组织、肺组织、淋巴结、口腔组织、鼻组织、胰腺组织、甲状旁腺组织、垂体腺组织、前列腺组织、直肠组织、唾液腺组织、骨骼肌组织、皮肤组织、小肠组织、脊髓、脾组织、胃组织、胸腺组织、气管组织、甲状腺组织、输

尿管组织和/或尿道组织、软组织和结缔组织、腹膜组织、血管组织和/或脂肪组织；I级、II级、III级或IV级癌组织；转移性癌组织；混合级癌组织；亚级癌组织；健康或正常组织；或癌组织或异常组织。

[0285] 任选地，方法可以包括分析可以在体内的粘膜目标或包含粘膜或由其组成的样本。任选地，方法可以包括分析粘膜目标以分析粘膜微生物；分析微生物与粘膜的相互作用和/或分析粘膜微生物组。

[0286] 粘膜内衬于身体的若干通道和内腔，尤其是开口暴露于外部环境的通道和内腔，包括口-咽腔、胃肠(GI)道、呼吸道、泌尿生殖道以及外分泌腺。

[0287] 因此，粘膜可以任选地选自支气管粘膜、子宫内膜(子宫粘膜)、食道粘膜、胃粘膜、肠道粘膜(肠粘膜)、鼻粘膜、嗅粘膜、口腔粘膜、阴茎粘膜和/或阴道粘膜。

[0288] 取样

[0289] 术语“取样”在本文中用于指使用装置从目标产生烟雾、蒸气或气溶胶。

[0290] 任一方法都可以任选地包括自动取样，自动取样可以任选地使用例如REIMS装置进行。任一方法都可以任选地包含使用一次性取样尖端。

[0291] 任选地，目标可以包含在固体培养基上培养的微生物培养物或由其组成。微生物培养物可以任选地直接从所述培养基取样，或它可以任选地从上面已经转移培养基的载体取样。举例来说，在取样前，微生物培养物可以转移到例如由玻璃或塑料支撑的硬载体，例如显微镜载玻片上。

[0292] 任选地，目标可以包含液体或由液体组成，所述液体可以任选地是在液体培养基中培养的微生物培养物、体液或临床流体样本、环境样品、食物或饮料。

[0293] 液体可以任选地在取样前例如通过离心或过滤来加工。任选地，离心可以在适合于沉积任何微生物的力下进行，历时适合于沉积任何微生物的时间。微生物形成球粒并且可以去除上清液。

[0294] 力可以任选地选自至少 $1,000 \times g$ 、 $2,000 \times g$ 、 $3,000 \times g$ 、 $4,000 \times g$ 、 $5,000 \times g$ 、 $6,000 \times g$ 、 $7,000 \times g$ 、 $8,000 \times g$ 、 $9,000 \times g$ 、 $10,000 \times g$ 、 $11,000 \times g$ 或至少 $12,000 \times g$ 并且任选地少于 $15,000 \times g$ 、 $14,000 \times g$ 、 $13,000 \times g$ 、 $12,000 \times g$ 、 $11,000 \times g$ 、 $10,000 \times g$ 、 $9,000 \times g$ 、 $8,000 \times g$ 、 $7,000 \times g$ 、 $6,000 \times g$ 或 $5,000 \times g$ 。离心时间可以任选地是至少5、6、7、8、9、10、12、15、18、20、25、30、40或50分钟，并且任选地少于60、50、40、30或25分钟。对于许多微生物来说，通常可以使用约5000g的力，历时约10-20分钟。技术人员将能够基于离心管的尺寸，决定必须选择每分钟多少转(rpm)来实现所需重力g。

[0295] 球粒可以从离心管的底部直接取样，或者它可以从上面已经转移球粒的载体取样。举例来说，在取样之前，球粒可以任选地转移到如载玻片等玻璃或塑料载体上，或转移到如棉签等拭子上。

[0296] 举例来说，如果微生物球粒仅仅含有少量的生物质或过量液体，那么微生物生物质可以任选地转移到例如常见棉签等固体载体材料上。为了实现此，可以使用拭子从离心后的细胞球粒获得一些微生物生物质。随后，拭子的部分可以挤压在取样探针的电极之间同时使用电流取样。本发明人已确定此类转移步骤不会显著影响所得谱分布图。

[0297] 或者，液体可以通过过滤来加工以将任何微生物沉积在滤纸或筛网上，接着可以对滤纸或筛网取样。因此，方法可以进一步包含抽吸或传送液体穿过过滤介质。

[0298] 方法可以进一步包含分析过滤介质上在抽吸或传送液体穿过过滤介质后残留的残留物。

[0299] 因此,液体的分析可以任选地包括或前面是去除过量液体的加工步骤;因此提供不含过量液体的目标。从液体获得但已经去除过量液体的此类目标在本文中可以为“固体”目标。应了解术语“固体”在生物学中用于指在肉眼看来呈固体,例如形成团块的样品,即使其不具有固体的物理特性。因此,“固体”目标包括例如微生物菌落、微生物细胞球粒、微生物生物膜、其任一者的刮片或动物组织。

[0300] 目标的分析可以任选地包括使用基于钳子的REIMS技术,其中目标的样品可以在钳子之间获取并接着可以将探针靠在一起。

[0301] 微生物群体,例如球粒可以任选地经受一或多个洗涤步骤,例如以去除培养基。洗涤可以用合适的缓冲液进行。因此,方法可以任选地在经过洗涤的微生物群体上进行。

[0302] 生物标记物

[0303] 方法可以任选地包括一或多个不同生物标记物的分析。生物标记物可以是例如微生物、微生物类型、微生物特征、化合物和/或生物过程存在的可定量的客观特征。

[0304] 术语“生物标记物”有时在本文中明确地使用,但还应理解,本文中提及的分析中的任一个可以任选地是生物标记物的分析。因此,例如对分析“微生物”的任何提及应任选地理解为是“分析微生物的生物标记物”;对分析“化合物”的任何提及应任选地理解为是“分析所述化合物的生物标记物”等等。

[0305] 生物标记物可以任选地是谱生物标记物。术语“谱生物标记物”在本文中为“谱分析生物标记物”可互换使用并且在本文中用以指表征细胞类型、疾病状态、微生物、化合物和/或生物过程的谱数据,但为简单起见,谱生物标记物可以简称为“生物标记物”。

[0306] “表征微生物类型”意指生物标记物可以任选地用于分析,例如检测、鉴别和/或表征所述微生物类型。任选地,可以使用生物标记物区分不同分类单元的微生物,例如界、门、纲、属、种和/或菌株;区分基因型和/或表型不同的微生物;区分动物细胞与微生物细胞;区分正常微生物与异常微生物;和/或区分野生型微生物与突变微生物。

[0307] “表征微生物”意指生物标记物可以任选地用于分析,例如检测、鉴别和/或表征所述微生物。如本文的其它地方所讨论,鉴别可以是在任何层级上的,例如在分类层级上。允许将微生物鉴别为属于特定分类层级的生物标记物可以称为“分类标记物”或“分类生物标记物”。因此,分类标记物可以具体针对界、门、纲、目、科、属、种和/或菌株。

[0308] “表征化合物”意指生物标记物可以任选地用于分析,例如检测、鉴别和/或表征所述化合物。

[0309] “表征生物过程”意指生物标记物可以任选地用于分析生物过程。任选地,生物标记物可以用于分析生物过程的开始、进展、速度、效率、特异性和/或结束。

[0310] 不同微生物类型、化合物、生物进展等等可以通过可以充当生物标记物的一种或多种化合物的存在或不存在和/或相对丰度来表征。本文中对生物标记物是特定化合物或化合物类别的任何提及应任选地理解为是所述化合物或所述类别的化合物的谱数据。

[0311] 举例来说,对“C24:1硫苷脂(C48H91NO11S)”生物标记物的提及应理解为是对与C24:1硫苷脂(C48H91NO11S)对应的谱数据的提及,可以例如是约888.6的m/z下的信号;而对“糖基化神经酰胺”生物标记物的提及应理解为是对与糖基化神经酰胺对应的谱数据的提

及,可以例如是842、844或846的 m/z 下的信号。

[0312] 如上文所解释,生物标记物可以指示细胞类型、疾病状态、微生物、化合物和/或生物过程。指示绿脓杆菌的生物标记物可以称为“绿脓杆菌生物标记物”等等。

[0313] 任选地,谱生物标记物可以鉴别为特定化合物或特定类别的化合物的谱数据。因此,对应于特定质量、电荷状态、 m/z 和/或离子迁移率的信号可以任选地鉴别为指示特定化合物或特定类别的化合物的存在。

[0314] 任选地,谱信号可以充当生物标记物,即使尚未确定哪种特定化合物或特定类别的化合物产生了那个信号。任选地,一种图案的谱信号可以充当生物标志物,即使尚未确定哪些特定化合物或特定类别的化合物产生了那种图案的一或多个信号或那种图案的任一信号。

[0315] 本文中所公开的操作能够鉴别一系列生物标记物,以及允许鉴别其它生物标记物。任选地,生物标记物可以选自本文中,包括任一实例和/或表中所公开的任一生物标记物。任选地,生物标记物可以是本文中提及的任一生物标记物的经取代或未经取代形式的生物标记物;和或本文中提及的任一生物标记物的醚、酯、磷酸化和/或糖基化形式,或其它衍生物。

[0316] 任选地,生物标记物可以是以下生物标记物:脂质;蛋白质;碳水化合物;DNA分子;RNA分子;多肽,例如核糖体肽或非核糖体肽;寡肽;脂蛋白;脂肽;氨基酸;和/或化合物,任选地,有机化学分子或无机化学分子。

[0317] 生物标记物可以任选地是特定化合物的明确存在或不存在,此可以任选地体现在对应于特定质量、电荷状态、 m/z 和/或离子迁移率(例如碰撞截面)的谱信号的存在或不存在。

[0318] 生物标记物可以任选地是特定生物分子或化合物的相对丰度,此可以任选地体现在对应于特定质量、电荷状态、 m/z 和/或离子迁移率的谱信号的相对强度。

[0319] 生物标记物可以任选地是多或多种化合物的相对丰度,此可以任选地体现在对应于两个或更多个质量、电荷状态、 m/z 和/或离子迁移率的两个或更多个谱信号的相对强度。

[0320] 因此,生物标记物可以任选地是一种或多种化合物,例如代谢物、脂肽和/或脂质物质的水平增加或减少,此可以任选地体现在对应于两个或更多个质量、电荷状态、 m/z 和/或离子迁移率的两个或更多个谱信号的强度的增加和/或减少。

[0321] 多种化合物的存在、不存在和相对丰度可以被称为分子“指纹”或“分布”。细胞的脂质全体可以被称为脂质组学指纹/分布,而细胞产生的代谢物全体可以被称为代谢体学指纹/分布。

[0322] 因此,生物标记物可以是分子指纹,例如脂质指纹和/或代谢体学指纹,更确切地说,例如:(i) 脂质组学分布;(ii) 脂肪酸分布;(iii) 磷脂分布;(iv) 磷脂酸(PA)分布;(v) 磷脂酰乙醇胺(PE)分布;(vi) 磷脂酰甘油(PG)分布;(vii) 磷脂酰丝氨酸(PS)分布;或(viii) 磷脂酰环己六醇(PI)分布。

[0323] 举例来说,虽然可以在几乎所有的细菌类型中发现磷脂酰甘油,但它可能以不同的相对量存在于不同细菌中。磷脂酰甘油可能仅以1-2%的水平存在于大部分动物组织中。因此,它可以是动物样本中的细菌的生物标记物,和/或特定类型的细菌的生物标记物。

[0324] 生物标记物可以任选地是直接生物标记物或间接生物标记物。“直接”生物标记物

意指谱数据直接从生物标记物产生。举例来说,如果特定化合物具有特定谱信号或信号图案,那么从样品获得此信号或信号图案提供关于化合物的存在的直接信息。举例来说,对于细胞或微生物大量产生的代谢物,情况可能如此。任选地,在此实例中,来自化合物的谱数据可以替代地或另外充当产生此化合物的细胞或微生物的间接生物标记物。

[0325] “间接”生物标记物意指谱数据是由一种或多种指示微生物或细胞的特定化合物、生物过程和/或类型的生物标记物产生的。因此,间接生物标记物是提供关于不同分子的信息的由一种或多种分子产生的谱数据。举例来说,分子指纹,如脂质指纹可以指示特定蛋白质,例如受体,或特定细胞类型或微生物类型的表达。

[0326] 脂质生物标记物可以任选地选自例如脂肪酸、甘油酯、固醇酯、鞘脂、异戊烯醇酯、糖脂和/或磷脂。各种脂质的简要概述提供于下文,但必须理解的是任何特定脂质都可能属于超过一个本文中提及的群组。

[0327] 脂肪酸是脂肪族单羧酸。脂肪酸可以任选地具有包含精确或至少4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、36、38或40个碳的碳链。它可以任选地是单不饱和、多不饱和或饱和的。它可以任选地是类二十烷酸。它可以例如是油酸、棕榈酸、二十碳四烯酸、前列腺素、前列腺素、血栓素、白三烯或环氧二十碳三烯酸。

[0328] 甘油酯可以任选地选自例如单酰基甘油、二酰基甘油和/或三酰基甘油。

[0329] 固醇可以任选地选自游离固醇、酰化固醇(固醇酯)、烷基化固醇(固醇烷基醚)、硫酸化固醇(固醇硫酸酯)、连接到糖苷部分的固醇(固醇糖苷)和/或连接到糖苷部分的酰化固醇(酰化固醇糖苷)。

[0330] 固醇可以任选地具有精确或至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35或40个碳原子的脂肪族侧链。脂肪族侧链中的碳原子的数目可以通过字母C后跟数字表示,例如C27表示胆固醇。它可以例如选自胆固醇、胆固醇硫酸盐、麦角固醇、羊毛甾醇、甲藻固醇(4 α ,23,24-三甲基-5 α -胆甾-22E-烯-3 β -醇)、甾固醇和/或其任何衍生物。

[0331] 磷脂可以包含两个脂肪酸、一个甘油单元、一个磷酸基和一个极性分子。磷脂可以任选地包含甘油的酯、醚和/或其它O-衍生物。磷脂可以任选地选自例如磷脂酰甘油、双磷脂酰甘油(心磷脂)、酰基磷脂酰甘油(1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸基-(3'-酰基)-1'-sn-甘油)和/或缩醛磷脂。

[0332] 磷脂酰甘油脂质可以任选地选自磷脂酸(PA)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰肌醇(PI)和/或磷脂酰丝氨酸(PS)。

[0333] 鞘脂是含有鞘氨基醇的脂质。它可以任选地选自例如神经酰胺,即N-酰化鞘氨基醇;鞘磷脂,即神经酰胺-1-磷酸胆碱;磷酸乙醇胺二氢神经酰胺,和/或鞘糖脂,即含有鞘氨基醇和一种或多种糖的脂质。举例来说,它可以任选地是糖基化神经酰胺。

[0334] 生物标记物可以任选地是代谢物,如初级或次级代谢物;抗生素;群体感应分子;脂肪酸合成酶产物;信息素;和/或生物聚合物。

[0335] 生物标记物化合物可以任选地通过以下官能团中的一或多个表征:醇、酯、烷烃、烯烃、炔烃、醚、酮、醛、酸酐、胺、酰胺、腈、芳香族化合物、羧酸、烷基卤化物和/或羰基。任选地,它可以另外被鉴别为伯、仲或叔,例如伯醇、仲胺等。

[0336] 举例来说,它可以任选地是萜;异戊二烯基醚;固醇;类萜;生物碱;糖苷;表面活性

素;地衣素(Iichenysin),2-庚基-3-羟基-4(1H)-喹诺酮或2-庚基-3,4-二羟基喹啉(“PQS”或假单胞菌喹诺酮信号);4-羟基-2-庚基喹啉(“HHQ”);酚,如天然酚;吩嗪;联苯;二苯并呋喃; β -内酰胺;聚酮;鼠李糖脂;分枝菌酸;和/或聚羟基烷酸酯;

[0337] 生物标记物可以任选地选自例如甘油磷酸胆碱、鞘磷脂、甘油磷脂、半乳糖酰胺、甘油磷酸肌醇、甘油磷酸丝氨酸、甘油磷酸甘油、胆固醇硫酸盐、髓磷脂、甘露糖脂、柠檬酸、甘油磷酸乙醇胺、甘油磷酸乙醇胺、2-羟基戊二酸盐、谷氨酰胺、谷氨酸盐、丁二酸盐、反丁烯二酸盐、棕榈酰甘氨酸、泛醌、钆特醇和/或本文中,包括任一表中提及的任一其它生物标记物。

[0338] 本发明人已经尤其鉴别出任一表中列出的生物标记物以及以下生物标记物:

[0339] 属于棒状杆菌亚目(*Corynebacterineae*)的细菌的分枝菌酸,如分枝杆菌属(*Mycobacterium* spp.)、棒状杆菌属(*Corynebacterium* spp.)和红球菌属(*Rhodococcus* spp.)。确切地说,已经从对应属检测到以下分枝菌酸:

[0340] 分枝杆菌属:C77-C81(偶数和奇数编号,0-2不饱和度);棒状杆菌属:C28-C36(偶数编号,0-2不饱和度);

[0341] 诺卡氏菌属:C48-C56(偶数编号,0-3不饱和度);

[0342] 红球菌属:C28-C38(偶数和奇数编号,0-4不饱和度)。

[0343] 发现多种鞘脂物种是拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的成员所特有的。这些鞘脂包括氧化神经酰胺物质、磷酸乙醇胺二氢神经酰胺和C15:0取代的磷酸甘油二氢神经酰胺和二氢神经酰胺。在那些鞘脂物质中,发现一系列半乳糖化鞘脂是脆弱拟杆菌(脆弱拟杆菌 α -半乳糖神经酰胺)所特有的。

[0344] 在细菌中,缩醛磷脂是厌氧细菌,如梭菌属(*Clostridium* spp.)和梭杆菌属(*Fusobacterium* spp.)高度特有的。这是由于好氧细菌失去缩醛磷脂合成所需的生物化学通路的事实。虽然人类能够合成缩醛磷脂(尽管通过与厌氧菌不同的生物化学通路),但一般发现这些缩醛磷脂的链长度比细菌缩醛磷脂长。

[0345] 指示某一细菌群的其它生物标记物包括例如特定地由某些芽孢杆菌物种产生的脂肽,如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)产生的表面活性素和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)产生的地衣素。这两种分子的产生也使得能够简单明了地区别这些在其它方面极密切相关的细菌。另一实例包括针对绿脓杆菌所发现的PQS衍生的群体感应分子以及单鼠李糖脂和二鼠李糖脂物质。

[0346] 群体感应是依赖于如下原理的细胞间通讯的形式:当单一微生物向环境中释放群体感应分子时,此类分子的浓度过低而无法检测。但是,当存在足够细菌时,群体感应分子浓度达到允许微生物感应关键细胞块,并且作为回应,活化或抑制特定基因的阈值水平。因此,群体感应分子也可以称为自体诱导物。病原体可以使用群体感应分子作为毒性因子。

[0347] 群体感应分子的一些实例在上文列出。其它实例包括N-酰基高丝氨酸内酯(N-酰基HSL),如3-氧代基-C₈-HSL、3-氧代基-C₁₀-HSL或3-氧代基-C₁₂-HSL;二酮哌嗪;3-羟基棕榈酸甲酯;和基于肽的群体感应分子,如金黄色葡萄球菌的群体感应分子,它是由基因agrD编码的称为自诱导肽(AIP)的寡肽。活性AIP是具有5元硫内酯环的7-9个氨基酸。

[0348] 举例来说,鞘磷脂脂质可以任选地是生物标记物,例如用于癌症;麦角固醇可以任选地是生物标记物,例如用于真菌;甲藻固醇可以任选地是生物标记物,例如用于鞭毛藻;

胆固醇硫酸盐可以任选地是生物标记物,例如用于癌症;2-羟基戊二酸盐可以任选地是生物标记物,例如用于癌症;和/或一种或多种髓磷脂可以任选地是生物标记物,例如用于癌症,例如星形细胞瘤。任选地,硫苷脂可以选自 $C_{48}H_{91}NO_{11}S$ 、 $C_{48}H_{92}NO_{12}S$ 和/或 $C_{50}H_{94}NO_{11}S$ 。

[0349] 异 - C 15 : 0 取代的磷酸甘油二氢神经酰胺可能是紫单胞菌科 (Porphyromonadaceae) 所特有的。 $m/z=566.4790$ 可以是黄杆菌纲的成员的生物标记物。

[0350] 本文提供的方法可以任选地包括外源性化合物,即给予受试者、与受试者或样本接触或微生物所暴露的化合物的分析。因此,生物标记物可以是外源性化合物。

[0351] 谱数据的分析

[0352] 任一本文提供的方法可以任选地包括谱数据的分析;更确切地说,来自第一样品的谱数据的分析。具体地说,微生物和/或化合物的检测、鉴别和/或表征可以包括谱数据(来自第一样品)的分析。微生物和/或化合物的检测、鉴别和/或表征可以仅仅基于谱数据的分析,或可以任选地涉及一或多个其它分析工具,分析工具的细节在本文中的其它地方论述。

[0353] 在一些实施例中,谱数据提供关于目标的直接信息。举例来说,如果特定微生物具有特定谱图案,那么从样品获得此图案提供关于所述微生物存在的直接信息。再例如,如果特定化合物具有特定谱图案,那么从样品获得此图案提供关于所述化合物存在的直接信息。举例来说,对于微生物分泌的化合物,情况可能如此。

[0354] 然而,在其它实施例中,谱数据提供关于目标的间接信息。举例来说,对于微生物产生但非分泌的化合物,情况可能如此。此化合物的存在可以通过检测作为含有所述化合物的微生物特征的谱图案来间接检测。

[0355] 使用样品,例如第一样品获得的谱数据可以任选地与一种或多种其它谱数据比较,所述其它谱数据可以便利地在本文中称为“参考”、“对照”、或“比较”谱数据。

[0356] 术语“参考”谱数据在本文中用于意指来自已知微生物或化合物的谱数据。参考谱数据可以任选地是公开可用的,或技术人员可以产生参考谱数据的库。任一本文提供的方法可以任选地包括将谱数据与一或多个参考谱数据比较。如果从样品获得的谱数据匹配或充分对应于参考谱数据,那么任选地可以作出肯定的判定。如果从样品获得的谱数据不匹配或不充分对应于参考谱数据,那么任选地可以作出否定的判定。任选地,如果相比于任何其它库条目,谱数据更密切对应于一个库条目,那么可以作出肯定的判定。

[0357] 术语“比较”谱数据在本文中用于意指从第二样品获得的谱数据。第一和第二样品可以从不同样品获得,或从相同样品的相同不同位置获得。任一本文提供的方法可以任选地包括将谱数据与一或多个比较谱数据比较。如果从样品获得的谱数据匹配或充分对应于比较谱数据,那么任选地可以作出肯定的判定。如果从样品获得的谱数据不匹配或不充分对应于比较谱数据,那么任选地可以作出否定的判定。

[0358] 术语“对照”谱数据在本文中用于意指在更早时间点从第一目标获得的谱数据。对照谱数据可以例如在监测微生物培养物时使用。任一本文提供的方法可以任选地包括将谱数据与一或多个对照谱数据比较。如果从样品获得的谱数据匹配或充分对应于对照谱数据,那么任选地可以作出肯定的判定。如果从样品获得的谱数据不匹配或不充分对应于对照谱数据,那么任选地可以作出否定的判定。

[0359] “肯定的判定”意指判定特定微生物和/或化合物的存在、身份和/或特征。举例来

说,肯定的判定可以包括判定特定分类等级的微生物存在;特定微生物具有某一特征,例如对特定药物的抗性;和/或产生特定化合物。

[0360] 因此,举例来说,如果第一样品的谱数据匹配或充分对应于参考谱数据,那么可以确认第一样品中存在对应于获得参考谱数据的微生物的微生物。如果第一样品的谱数据匹配或充分对应于参考谱数据,那么第一样品中存在的微生物可以被鉴别为对应于参考谱数据所获自的微生物的身份。如果第一样品的谱数据匹配或充分对应于参考谱数据,那么第一样品中存在的微生物可以被表征为具有对应于参考谱数据所获自的微生物的特征的特征。如果第一样品的谱数据匹配或充分对应于参考谱数据,那么可以确定第一样品中存在的微生物产生由参考谱数据所获自的微生物产生的化合物。

[0361] 作为另一实例,如果第一样品的谱数据匹配或充分对应于比较谱数据,那么可以确认第一样品中存在对应于获得比较谱数据的微生物的微生物。如果第一样品的谱数据匹配或充分对应于比较谱数据,那么第一样品中存在的微生物可以被鉴别为对应于比较谱数据所获自的微生物的身份。如果第一样品的谱数据匹配或充分对应于比较谱数据,那么第一样品中存在的微生物可以被表征为具有对应于比较谱数据所获自的微生物的特征的特征。如果第一样品的谱数据匹配或充分对应于比较谱数据,那么可以确定第一样品中存在的微生物产生由参考谱数据所获自的微生物产生的化合物。

[0362] 换句话说,分别与参考或比较谱数据的匹配或充分对应可以用于确认第一微生物分别与参考或比较微生物具有相同身份,而缺乏分别与参考或比较谱数据的匹配或充分对应可以用于确认第一微生物分别与参考或比较微生物不具有相同身份。

[0363] “否定的判定”意指判定特定微生物和/或化合物的不存在;和/或判定微生物不具有特定身份和/或特征。举例来说,否定的判定可以包括判定特定分类等级的微生物不存在;特定微生物不具有某一特征,例如对特定药物的抗性;和/或不产生特定化合物。

[0364] 因此,举例来说,如果第一样品的谱数据不匹配或充分对应于参考谱数据,那么可以确认第一样品中不存在或不充分存在对应于参考谱数据所获自的微生物的微生物。如果第一样品的谱数据不匹配或充分对应于参考谱数据,那么第一样品中存在的微生物可以被鉴别为不对应于参考谱数据所获自的微生物的身份。如果第一样品的谱数据不匹配或充分对应于参考谱数据,那么第一样品中存在的微生物可以被表征为不具有对应于参考谱数据所获自的微生物的特征的特征。如果第一样品的谱数据不匹配或充分对应于参考谱数据,那么可以确定第一样品中存在的微生物不产生或不充分产生由参考谱数据所获自的微生物产生的化合物。

[0365] 如以下所解释,判定或确认微生物的“身份”意指获得至少一些关于身份的信息,所述信息可以例如是在任何分类层级下的。因此,举例来说,如果参考谱数据来自白色念珠菌,那么在一个实施例中,匹配或充分对应可以用于将第一微生物鉴别为属于属念珠菌属,而在另一实施例中,匹配或充分对应可以用于将第一微生物鉴别为属于种白色念珠菌。

[0366] 作为另一实例,如果第一样品的谱数据匹配或充分对应于对照谱数据,那么可以确定未发生变化或未发生显著变化,而如果第一样本的谱数据不匹配或充分对应于对照谱数据,那么可以确定已发生变化,任选地发生显著变化。变化的实例可以例如是污染微生物和/或化合物的存在;或微生物行为或其环境的变化,例如以下各项的变化:微生物生长速率、呼吸速率;化合物、如分泌化合物的产生速率;环境温度、pH值、养分利用率等等。

[0367] 任选地,产生特定谱信号、例如特定 m/z 的分析物可以任选地例如使用MS/MS进一步表征。因此,质谱中的离子物质可以任选地基于精确质量测量(例如质量偏差 $<3\text{ppm}$)和/或MS/MS碎片化图案鉴别。具有不同头基的同量异位脂质可以任选地通过离子迁移率来区分。

[0368] 因此,任选地,方法可以包括针对一种或多种生物标记物,任选地选自本文中提及的任一生物标记物的生物标记物的谱信号的存在,对目标进行分析。

[0369] 谱数据可以包含一或多个样品谱。获得谱数据可以包含获得一或多个样品谱。分析谱数据可以包含分析一或多个谱。获得一或多个样品谱可以包含分仓方法以针对一或多个样品谱,推导出一组时间-强度对和/或一组样品强度值。分仓方法可以包含累积一组多个仓中的离子检测和/或强度值或对其作直方图。分仓方法中的每个仓可以对应于时间或基于时间的值,如质量、质荷比和/或离子迁移率的特定范围。分仓方法中的仓可以各自具有等于选自由以下各项组成的群组的范围内的以Da或Th (Da/e) 计的宽度:(i) $<$ 或 >0.01 ;(ii) $0.01-0.05$;(iii) $0.05-0.25$;(iv) $0.25-0.5$;(v) $0.5-1.0$;(vi) $1.0-2.5$;(vii) $2.5-5.0$;和(viii) $<$ 或 >5.0 。已鉴别出宽度等于 $0.01-1\text{Da}$ 或Th (Da/e) 范围内的宽度的仓能够提供尤其适用于对一些气溶胶、烟雾或蒸气样品,如从组织获得的样品进行分类的样品谱。仓可以或可以不全部具有相同宽度。分仓方法中的仓的宽度可以根据仓宽度函数变化。仓宽度函数可以随时间或基于时间的值,如质量、质荷比和/或离子迁移率而变化。仓宽度函数可以是非线性的(例如基于对数或基于幂的,如基于平方或平方根的)。仓宽度函数可以考虑离子的飞行时间可能不与其质量、质荷比和/或离子迁移率成正比的事实。举例来说,离子的飞行时间可能与其质量和/或质荷比的平方根成正比。

[0370] 谱库

[0371] 术语“谱库”和“谱数据库”在本文中可互换地使用。

[0372] 技术人员可以使用任何公开可用的谱数据作为参考谱数据。有用的数据库的实例是:LipidMaps、LipidBlast和LipidXplorer,其细节提供于以下出版物中:“LipidBlast-用于脂质鉴别的计算机模拟串联质谱数据库 (LipidBlast-in-silico tandem mass spectrometry database for lipid identification)”,Kind等人,《自然方法 (Nat Methods.)》2013年8月;10 (8):755-758;“LipidXplorer:用于同感跨平台脂质组学的软件 (LipidXplorer:A Software for Consensual Cross-Platform Lipidomics)”,Herzog等人《公共科学图书馆·综合 (PLoS ONE)》7 (1):e29851;和“脂质分类、结构和工具 (Lipid classification,structures and tools)”,Fahy等人《生物化学与生物物理学报 (BBA)-脂质分子与细胞生物学 (Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids)》,第1811卷,第11期,2011年11月,第637-647页,脂质组学和成像质谱法 (Lipidomics and Imaging Mass Spectrometry),又参见<http://www.lipidmaps.org/>。

[0373] 可替代地或另外,技术人员可以通过从一或多个样品获得谱数据来构筑谱库,样品可以任选地包括模式培养菌株和/或临床和/或环境微生物分离株;在化合物情况下,可以任选地购买或合成样品。

[0374] 模式培养菌株可以任选地从例如美国模式培养物保藏所 (American Type Culture Collection,ATCC) (美国弗吉尼亚州 (20110) 马纳萨斯的丹佛大学 (University Boulevard,Manassas,VA 20110USA) 10801) 培养物保藏所获得。

[0375] 本发明人使用超过1500种微生物菌株来产生谱库,所述菌株包括来自ATCC的临床分离株和模式培养菌株,涵盖约95个属和约260个种的细菌和真菌。为了加快谱库的产生,本发明人建立高通量培养、自动化菌落成像、菌落挑选和REIMS分析。

[0376] 本发明人也已使用组织和/或细胞系产生谱库,其细节提供于本文中的其它地方,包括实例中。

[0377] 从微生物、细胞系和/或组织产生谱库可以任选地与其它分析组合,例如系统分类和/或组织学,例如基于本文中的其它地方论述的任一其它分析工具。举例来说,工具可以是DNA分析。这可以涉及DNA定序,任选地前面是DNA分离和/或使用例如PCR的扩增。对于细菌,全部或部分16S rRNA基因的定序尤其合适,而对于真菌,全部或部分内部转录间隔(ITS)区的定序尤其合适。

[0378] 分析样品谱

[0379] 分析谱数据的步骤可以包含分析一或多个样品谱以便对气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类。

[0380] 分析一或多个样品谱以便对气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类可以包含一或多个样品谱的无监督分析(例如用于减少维数)和/或一或多个样品谱的监督分析(例如用于分类)。

[0381] 分析一或多个样品谱可以包含先无监督分析(例如用于减少维数),接着监督分析(例如用于分类)。

[0382] 分析一或多个样品谱可以如本文中的其它地方所论述地进行。

[0383] 在下表中给出意图属于本发明的范围内的分析技术的名单:

	分析技术
	单变量分析
	多变量分析
	主成分分析 (PCA)
	线性判别分析 (LDA)
	最大边缘准则 (MMC)
	基于库的分析
	软独立建模分类类比 (SIMCA)
	因子分析 (FA)
	递归划分 (决策树)
	随机森林
	独立成分分析 (ICA)
[0384]	偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA)
	隐结构正交 (偏最小二乘法) 投影 (OPLS)
	OPLS 判别分析 (OPLS-DA)
	支持向量机 (SVM)
	(人工) 神经网络
	多层感知器
	径向基函数 (RBF) 网络
	贝叶斯分析
	聚类分析
	核化方法;
	子空间判别分析
	K 最邻近 (KNN)
	二次判别分析 (QDA)
	概率主成分分析 (PPCA)
	非负矩阵因子分解
[0385]	K 均值因子分解
	模糊 c 均值因子分解
	判别分析 (DA)
[0386]	上述分析方法也可以组合使用,如PCA-LDA、PCA-MMC、PLS-LDA等。
[0387]	分析样品谱可以包含用于减少维数的无监督分析、随后用于分类的监督分析。
[0388]	现在将通过举例更详细地描述多种不同分析技术。
[0389]	<u>多变量分析-开发用于分类的模型</u>
[0390]	现将通过举例来描述使用多个参考样品谱的多变量分析构建分类模型的方法。
[0391]	图15示出了使用多变量分析构建分类模型的方法1500。在此实例中,所述方法包含获得参考样品谱的多组强度值的步骤1502。方法接着包含无监督主成分分析 (PCA) 的步骤1504,随后进行监督线性判别分析 (LDA) 的步骤1506。此方法在本文中可称为PCA-LDA。可以使用其它多变量分析方法,例如PCA-MMC。接着在步骤1508中将PCA-LDA模型输出到例如存储器。
[0392]	例如此多变量分析等多变量分析能够提供一种允许使用从气溶胶、烟雾或蒸气样

品获得的一或多个样品谱对气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类的分类模型。现在将参考简单实例更详细地描述所述多变量分析。

[0393] 图16示出了一组从两类已知参考样品获得的参考样品谱；所述类别可以是本文所述的目标类别中的任一种或多种。然而，为了简单起见，在此实例中，两种类别将被称作左侧类别和右侧类别。

[0394] 每个参考样品谱已作预处理，以便针对所述参考样品谱中的相应质荷比推导出一组三个参考峰强度值。虽然仅示出了三个参考峰强度值，但应了解可以针对每个参考样品谱中的相应数目的质荷比来推导出更多个参考峰强度值（例如约100个参考峰强度值）。在其它实施例中，参考峰强度值可以对应于：质量；质荷比；离子迁移率（漂移时间）；和/或操作参数。

[0395] 图17示出了一种多变量空间，它具有由强度轴界定的三维。维度或强度轴各自对应于特定质荷比下的峰强度。同样应了解，多变量空间中可能存在更多维度或强度轴（例如约100个维度或强度轴）。多变量空间包含多个参考点，其中每个参考点对应于一个参考样品谱，即，每个参考样品谱的峰强度值为多变量空间中的参考点提供坐标。

[0396] 这组参考样品谱可以用参考矩阵D表示，参考矩阵D具有与相应参考样品谱相关的行、与相应质荷比相关的列，并且矩阵元素是相应参考样品谱的相应质荷比的峰强度值。

[0397] 在许多情况下，多变量空间和矩阵D中的大量维度会使得难以将参考样品谱分组到类别中。因此可以对矩阵D进行PCA以计算PCA模型，PCA模型界定了根据主成分轴界定的一或多个维度的数目减少的PCA空间。可以选择所述主成分为包含或“解释”矩阵D中的最大方差并且累积地解释矩阵D的方差阈值量的那些主成分。

[0398] 图18示出了在PCA模型中，累积方差如何作为主成分的数目n的函数而增加。可以根据需要来选择方差阈值量。

[0399] 可以使用非线性迭代偏最小二乘法 (non-linear iterative partial least squares, NIPALS) 算法或奇异值分解法，根据矩阵D计算PCA模型，其细节已为技术人员所知，因此在本文中不再详述。可以使用PCA模型的其它计算方法。

[0400] 所得PCA模型可以由PCA分数矩阵S和PCA载荷矩阵L定义。PCA还会产生误差矩阵E，误差矩阵E含有无法用PCA模型解释的方差。D、S、L和E之间的关系可以是：

$$[0401] \quad D = SL^T + E$$

[0402] (1) 图19示出了图16和17的参考样品谱的所产生的PCA空间。在此实例中，PCA模型具有两个主成分PC₀和PC₁，因此PCA空间具有由两个主成分轴界定的二维。然而，根据需要，PCA模型中可以包括更小或更大数量的主成分。通常希望主成分的数目比多变量空间中的维度数目少至少一个。

[0403] PCA空间包含多个变换参考点或PCA分数，其中每个变换参考点或PCA分数对应于图16的参考样品谱并因此对应于图17的参考点。

[0404] 如图19中所示，PCA空间维度的减少使得更容易将参考样品谱分成两类。在此阶段，还可以从所述分类模型鉴别和去除任何离群值。

[0405] 然后可以在PCA空间中进行进一步监督多变量分析，如多类别LDA或最大边缘准则(MMC)，以便定义类别并任选地进一步减少维度。

[0406] 如技术人员将了解，多类别LDA试图使类别之间的方差与类别内的方差的比率最

大化(即,以便尽可能使最紧密的类别之间的可能距离最大)。LDA细节为技术人员所知,因此在本文中不再详述。

[0407] 所得PCA-LDA模型可以通过变换矩阵U来定义,变换矩阵U可以通过求解广义特征值问题从PCA得分矩阵S和针对其中所含的每个变换谱图的类别赋值来推导。

[0408] 然后可以通过以下得到分数S从原始PCA空间向新的LDA空间的变换:

[0409] $Z = SU$

[0410] (2) 其中矩阵Z含有变换成LDA空间的分数。

[0411] 图20示出了具有单个维度或轴的PCA-LDA空间,其中LDA是在图19的PCA空间中进行的。如图20中示出,LDA空间包含多个其它变换参考点或PCA-LDA分数,其中每个其它变换参考点对应于图19的变换参考点或PCA分数。

[0412] 在此实例中,PCA-LDA空间的维度进一步减少使得更容易将参考样品谱分成两类。所述PCA-LDA模型中的每个类别可以通过其在PCA-LDA空间中变换后的类别平均值和协方差矩阵或一或多个超平面(包括点、线、平面或更高阶超平面)或超表面或沃罗诺伊单元来定义。

[0413] 可以将PCA载荷矩阵L、LDA矩阵U和变换后的类别平均值和协方差矩阵或超平面或超曲面或沃罗诺伊单元输出到数据库中,供随后用于对气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类。

[0414] LDA空间中类别g的变换后的协方差矩阵 V'_g 可以通过下式给出:

[0415] $V'_g = U^T V_g U$

[0416] (3)

[0417] 其中 V_g 是PCA空间中的类别协方差矩阵。

[0418] 类别g的变换后的类别平均位置 z_g 可以如下给出:

[0419] $s_g U = z_g$

[0420] (4)

[0421] 其中 s_g 是PCA空间中的类别平均位置。

[0422] 多变量分析-使用用于分类的模型

[0423] 现将通过举例来描述使用分类模型对气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类的方法。

[0424] 图21示出了一种使用分类模型的方法2100。在此实例中,所述方法包含获得样品谱的一组强度值的步骤2102。方法接着包含将样品谱的这组强度值投影到PCA-LDA模型空间中的步骤2104。可以使用其它分类模型空间,如PCA-MMC。然后在步骤2106基于投影位置对样品谱进行分类,并接着在步骤2108中输出此分类。

[0425] 现将参考上述简单PCA-LDA模型更详细地描述气溶胶、烟雾或蒸气样品的分类。

[0426] 图22示出了从未知的气溶胶、烟雾或蒸气样品获得的样品谱。所述样品谱已作预处理,以便针对相应质荷比推导出一组三个样品峰强度值。如上文所提及,虽然仅示了三个样品峰强度值,但应了解,可以针对样品谱的更多的相应质荷比推导出更多的样品峰强度值(例如约100个样品峰强度值)。此外,如上文所提到的,在其它实施例中,样品峰强度值可以对应于:质量;质荷比;离子迁移率(漂移时间);和/或操作参数。

[0427] 样品谱可以由样品向量 d_x 表示,其中向量元素是相应质荷比的峰强度值。可以如下获得样品谱的变换后的PCA向量 s_x :

[0428] $d_x L = s_x$

[0429] (5)

[0430] 接着可以如下获得样品谱的变换后的PCA-LDA向量 z_x :

[0431] $s_x U = z_x$

[0432] (6)

[0433] 图23再次示出了图20的PCA-LDA空间。然而,图23的PCA-LDA空间进一步包含对应于变换后的PCA-LDA向量 z_x 的投影样品点,由图22的样品谱的峰强度值推导出。

[0434] 在此实例中,投影样品点处于类别之间涉及右侧类别的超平面的一侧,因此,气溶胶、烟雾或蒸气样品可以归类为属于右侧类别。

[0435] 或者,可以使用LDA空间中距离类别中心的马氏距离 (Mahalanobis distance),其中点 z_x 距离类别中心 g 的马氏距离可以通过下式的平方根得到:

[0436] $(z_x - z_g)^T (V'_g)^{-1} (z_x - z_g)$

[0437] (8)

[0438] 并且可以将数据向量 d_x 分配到此距离最小的类别。

[0439] 另外,通过将每个类别当成多变量高斯 (multivariate Gaussian),可以计算出数据向量属于每个类别的成员概率。

[0440] 基于库的分析-开发用于分类的库

[0441] 现将通过举例来描述一种使用多个输入参考样品谱来构建分类库的方法。

[0442] 图24示出了构建分类库的方法2400。在此实例中,所述方法包含获得多个输入参考样品谱的步骤2402和针对每个样品类别根据多个输入参考样品谱推导出元数据的步骤2404。接着方法包含将每个样品类别的元数据作为单独的库条目存储的步骤2406。然后在步骤2408中,将分类库输出到例如电子存储器。

[0443] 如这种分类库等分类库允许使用一或多个从气溶胶、烟雾或蒸气样品获得的样品谱对气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类。现将参考一个实例更详细地描述这种基于库的分析。

[0444] 在此实例中,根据代表一种类别的多个预处理过的参考样品谱来创建分类库中的每个条目。在此实例中,根据以下程序对一种类别的参考样品谱进行预处理:

[0445] 首先,执行再分仓过程。在此实施例中,将数据再取样到具有横坐标的对数网格上:

[0446]
$$x_i = \left\lfloor N_{chan} \log \frac{m}{M_{min}} / \log \frac{M_{max}}{M_{min}} \right\rfloor$$

[0447] 其中 N_{chan} 是选择的值,并且 $\lfloor x \rfloor$ 表示低于 x 的最近整数。在一个实例中, N_{chan} 是 2^{12} 或4096。

[0448] 接着执行背景减除过程。在此实施例中,然后构筑具有 k 个结点的三个样条,使得每对结点之间数据的 $p\%$ 位于曲线下方。接着从数据中减去此曲线。在一个实例中, k 是32。在一个实例中, p 是5。然后从每个强度减去对应于强度减除数据的 $q\%$ 分位数的常数值。保留正值和负值。在一个实例中, q 是45。

[0449] 然后执行标准化过程。在此实施例中,数据经过标准化,具有平均 $\bar{x}_i$ 。在一个实例中, $\bar{x}_i = 1$ 。

[0450] 接着库的条目由呈谱图中 N_{chan} 个点中每个点的中位谱值 μ_i 和偏差值 D_i 形式的元数

据构成。

[0451] 通过下式给出第i个通道的可能性：

$$[0452] \quad Pr(y_i|\mu_i, D_i) = \frac{1}{D_i} \frac{C^{C-1/2} \Gamma(C)}{\sqrt{\pi} \Gamma(C-1/2)} \frac{1}{\left(C + \frac{(y_i - \mu_i)^2}{D_i^2}\right)^C}$$

[0453] 其中 $1/2 \leq C < \infty$ 并且其中 $\Gamma(C)$ 是 γ 函数。

[0454] 上述等式是广义柯西分布 (generalised Cauchy distribution), 其降低到 $C=1$ 的标准柯西分布并且变成呈 $C \rightarrow \infty$ 的高斯 (正态) 分布。参数 D_i 控制分布的宽度 (在高斯中限制 $D_i = \sigma_i$ 仅仅是标准差), 而全程值 C 控制尾部的大小。

[0455] 在一个实例中, C 是 $3/2$, 其处于柯西与高斯之间, 使得可能性变成:

$$[0456] \quad Pr(y_i|\mu_i, D_i) = \frac{3}{4} \frac{1}{D_i} \frac{1}{(3/2 + (y_i - \mu_i)^2/D_i^2)^{3/2}}$$

[0457] 对于每个库条目, 将参数 μ_i 设定成输入参考样品谱的第i个通道中的值列表的中位值, 而偏差 D_i 由这些值的四分位距除以 $\sqrt{2}$ 而得出。这种选择能够确保第i个通道的可能性与输入数据具有相同的四分位距, 其中分位数的使用在某种程度上防止了离群数据。

[0458] 基于库的分析-使用用于分类的库

[0459] 现将通过举例来描述使用分类库对气溶胶、烟雾或蒸气样品进行分类的方法。

[0460] 图25示出了一种使用分类库的方法2500。在此实例中, 所述方法包含获得一组多个样品谱的步骤2502。接着方法包含利用分类库中的类别条目的元数据针对每个样品类别计算这组多个样品谱的概率或分类分数的步骤2504。接着在步骤2506对样品谱进行分类, 并接着在步骤2508输出分类。

[0461] 现将参考上述分类库更详细地描述气溶胶、烟雾或蒸气样品的分类。

[0462] 在此实例中, 未知的样品谱 y 是一组多个样品谱的中位值谱。采用中位值谱 y 能够在通道基础上防止离群数据。

[0463] 然后如下得到在库条目 s 下输入数据的可能性 L_s :

$$[0464] \quad L_s = Pr(y|\mu, D) = \prod_{i=1}^{N_{chan}} Pr(y_i|\mu_i, D_i)$$

[0465] 其中 μ_i 和 D_i 分别是通道 i 的库中位值和偏差值。可能性 L_s 可以计算为数值安全性的对数可能性。

[0466] 接着在所有候选类别 ' s ' 上标准化可能性 L_s 以得到概率, 假设类别上有一致的先验概率。类别 $\hat{s}$ 的所得概率如下得出:

$$[0467] \quad Pr(\hat{s}|y) = \frac{L_{\hat{s}}^{(1/F)}}{\sum_s L_s^{(1/F)}}$$

[0468] 指数 $(1/F)$ 能够缓和概率, 否则概率可能过于明确。在一个实例中, $F=100$ 。这些概率可以用百分比表示, 例如在用户界面中。

[0469] 可替代地, 可以使用相同中位样品值和来自库的推导值来计算RMS分类分数 R_s :

$$[0470] \quad R_s(y, \mu, D) = \sqrt{\frac{1}{N_{chan}} \sum_{i=1}^{N_{chan}} \frac{(y_i - \mu_i)^2}{D_i^2}}$$

[0471] 另外,在所有候选类别's'上标准化分数 R_s 。

[0472] 然后气溶胶、烟雾或蒸气样品可以归类为属于具有最高概率和/或最高RMS分类分数的类别。

[0473] 微生物检测、鉴别和/或表征

[0474] 术语“检测(detect)”和“检测(detection)”和这些术语的派生词在本文中可互换地使用,意指确定目标实体存在或不存在。

[0475] 其中目标实体是微生物的任一方法可以任选地用于确定特定目标或其区域是无菌还是非无菌。因此,在一个实施例中,检测到微生物并任选地,基于此检测,确定目标或区域非无菌。在一个实施例中,未检测到微生物并且任选地,基于此检测,确定目标或区域无菌。

[0476] 目标实体是微生物的任一方法可以用于确定存在一或多个不同类型的微生物。检测到仅仅1个类型的微生物可以指示样品中不存在其它类型的微生物。因此,在一个实施例中,确定仅仅存在1个类型的微生物。在样品来自微生物培养物的情况下,任选地,确定微生物培养物不含污染微生物。在临床或食物样品的情况下,任选地,确定感染是或可能是仅仅由单个微生物病原体引起。

[0477] 在一个实施例中,确定存在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或50个不同类型的微生物。在一个实施例中,确定存在1个或更多个、2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、6个或更多个、7个或更多个、8个或更多个、9个或更多个、10个或更多个、15个或更多个、25个或更多个或30个或更多个不同类型的微生物。在样品来自微生物培养物的情况下,任选地,确定微生物培养物含有污染微生物。在临床或食物样品的情况下,任选地,确定感染是或可能是由多个微生物引起。

[0478] 一些微生物是病原性的,而其它微生物是非病原性的。病原性微生物可以被定义为能够在例如植物或动物等宿主中引起疾病的微生物。病原体可以是专性病原体或机会性病原体。

[0479] 微生物的致病能力取决于其内在毒性因子和宿主击败微生物的能力这两点。因此非病原体与机会性病原体之间的区别不是很明确,因为举例来说,无法感染具有健康免疫系统的宿主的微生物将容易感染免疫受损宿主。抗生素的使用也会产生其中微生物将如机会性病原体般活跃的环境。

[0480] 举例来说,淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)是一种专性病原体,绿脓杆菌和白色念珠菌通常称为机会性病原体,并且

[0481] 嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)和两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)通常被认为是非病原体的或“共生”细菌

[0482] 病原性微生物可以任选地通过一种或多种毒性因子,即能够实现或推动宿主感染的因子的表达来表征。毒性因子可以任选地选自介导以下特性的因子:细胞粘附、细胞生长、绕开或战胜宿主防御机制的能力和/或产生毒素。毒素可以选自外毒素和内毒素。

[0483] 因此,方法可以用于确定是否存在一种或多种病原性微生物。在一个实施例中,确

定存在1种或更多种、2种或更多种、3种或更多种、4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种、10种或更多种、15种或更多种、25种或更多种或30种或更多种不同病原性微生物。

[0484] 经常需要鉴别目标中或目标上存在的微生物群体。临床和/或环境样本中/上的微生物群体的身份经常是未知的,因此需要鉴别。关于微生物培养物,人为误差和/或其它情况会导致微生物群体的错误鉴别、错误标记、混淆等等。

[0485] 因此,特定微生物群体的身份可能未知、不确定和/或未确认。任选地,方法可以用于鉴别微生物群体,和/或确认微生物群体的身份。

[0486] 术语“确定身份”、“鉴别(identify)”和“鉴别(identification)”以及这些术语的派生词在本文中可互换地使用。

[0487] “鉴别”微生物群体意指获得至少一些关于微生物群体中存在的微生物的类型的信息。这可以任选地是确定微生物群体中的一种或多种微生物类型的身份和/或确认其身份。在微生物培养物的情况下,确认微生物群体的身份也可以例如称作确认微生物群体的真实性。然而,“鉴别”可以替代地包括允许鉴别微生物属于特定分类的信息。

[0488] 因此,任选地,方法可以在身份未知的微生物群体上执行,以确定微生物群体的身份。

[0489] 任选地,方法可以在疑似具有特定身份的微生物群体上执行,以确认或反驳微生物群体的身份。

[0490] 任选地,方法可以在需要鉴定的微生物群体上执行,以确认微生物群体的真实性。

[0491] 任选地,微生物群体可以被鉴别为包含本文中的其它地方所列的一种或多种微生物或由其组成,例如具有本文中的其它地方所列的任一微生物的身份。

[0492] 任选地,微生物群体可以被鉴别为包含病原性微生物或由其组成。任选地,微生物群体可以被鉴别为包含共生微生物,例如非病原性微生物或由其组成。

[0493] 任选地,微生物群体可以被鉴别为包含突变和/或转基因微生物或由其组成。

[0494] 任选地,微生物群体可以被鉴别为包含对一种或多种抗微生物剂敏感和/或具抗性的微生物或由其组成。

[0495] 任选地,可以分析微生物群体(i)以确认所述微生物群体的身份或真实性;(ii)以检测所述微生物群体中的突变;和/或(iii)以检测所述微生物群体中的非所需变异。

[0496] 任选地,方法可以用于分析感染的扩散。举例来说,方法可以用于分析两个或更多个不同受试者是否已经被相同类型的微生物或被两个不同类型的微生物感染。此可以任选地包括分析微生物的基因型和/或表型,尤其是每个感染由相同微生物物种引起时。因此,任选地,方法可以用于确定在第一受试者中引起感染的第一微生物群体的身份和/或基因型和/或表型,以及在第二或另一受试者中引起感染的第二或另一微生物群体的身份和/或基因型和/或表型。接着可以确定第一和第二或另一微生物群体是否相同,并且如果不相同,那么确定它们彼此不同的程度或显著性。如果确定第一和第二微生物群体相同或显著相似,那么任选地确定第一和第二受试者已经或可能已经获得相同感染,例如从相同来源获得感染。相反地,如果确定第一和第二微生物群体不相同或不显著相似,那么任选地,确定第一和第二受试者已经或可能已经获得不同感染,例如从不同来源获得感染。此可以例如帮助分析患者是否在进入医院前获得感染或患者是否具有医院获得性感染。

[0497] 微生物鉴别可以任选地在任何分类层级上,例如在界 (Kingdom)、门 (Phylum) 或门 (Division)、纲 (Class)、目 (Order)、科 (Family)、属 (Genus)、种 (Species) 和/或菌株 (Strain) 层级上。

[0498] “分类学 (Taxonomy)” 是生物体的分类,并且每个分类层级都可以称为“分类单元” (taxon; 复数 taxa)。生物体可以按种别性 (specificity) 递增次序分成以下分类单元:界、门、纲、目、科、属、种以及菌株。每个分类单元都可以进一步再分。必须了解,在广大的科学界内,分类学上的某些分类存在一些偏差。关于某些微生物的命名可能也没有达成共识,导致一种特定的微生物具有超过一个名称或两种不同微生物具有相同的名称。

[0499] 以下参考绿脓杆菌说明分类学分类,绿脓杆菌属于界:细菌;门:变形菌门;纲:γ 变形菌纲;目:假单胞菌目;科:假单胞菌科;属:假单胞菌属;以及种:绿脓杆菌。

[0500] 微生物 (microbe) 又称为微生物 (micro-organism),是一种非常小以致于肉眼看不到的生物体,即是微观的。微生物可以选自细菌、真菌、古细菌、藻类、原虫以及病毒。虽然术语细菌、真菌、古生菌、藻类、原虫以及病毒在理论上表示复数形式,但是用它们来表示单数形式也是一种常见的用法。因此,术语“细菌 (bacteria)”和“细菌 (bacterium)”在本文中可互换地使用;术语“真菌 (fungi)”和“真菌 (fungus)”在本文中可互换地使用;术语“古生菌 (archaea)”和“古生菌 (archaeum)”在本文中可互换地使用;术语“原虫 (protozoa)”和“原虫 (protozoum)”在本文中可互换地使用;以及术语“病毒 (viruses)”和“病毒 (virus)”在本文中可互换地使用。

[0501] 在一些实施例中,微生物可以选自细菌、真菌、古细菌、藻类以及原虫。在一些实施例中,它可以选自细菌和真菌。在一些实施例中,它可以选自细菌。

[0502] 微生物可以是单细胞或多细胞的。如果微生物是真菌,那么它可以任选地是丝状的或单细胞的,例如酵母。

[0503] 真菌可以任选地是酵母。它可以任选地选自曲霉属 (*Aspergillus*)、节囊酵母属 (*Arthroascus*)、酒香酵母属 (*Brettanomyces*)、念珠菌属 (*Candida*)、隐球酵母属 (*Cryptococcus*)、德巴利酵母属 (*Debaryomyces*)、地霉属 (*Geotrichum*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、红酵母属 (*Rhodotorula*)、酵母属 (*Saccharomyces*)、丝孢酵母属 (*Trichosporon*) 以及接合囊孢菌属 (*Zygorulasporea*)。

[0504] 它可以任选地选自以下物种:斯柯立节囊酵母 (*Arthroascus schoenii*)、布鲁塞尔酒香酵母 (*Brettanomyces bruxellensis*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、阿斯卡念珠菌 (*C. ascalaphidarum*)、安非念珠菌 (*C. amphixiae*)、南极念珠菌 (*C. antarctica*)、银灰色念珠菌 (*C. argentea*)、大西洋念珠菌 (*C. atlantica*)、大气念珠菌 (*C. atmosphaerica*)、蟑螂念珠菌 (*C. blattae*)、溴美念珠菌 (*C. bromeliacearum*)、果生念珠菌 (*C. carpophila*)、卡瓦念珠菌 (*C. carvajalis*)、塞拉念珠菌 (*C. cerambycidarum*)、朝利念珠菌 (*C. chauliodes*)、延胡索念珠菌 (*C. corydali*)、多西念珠菌 (*C. dosseyi*)、杜氏念珠菌 (*C. dubliniensis*)、艾加念珠菌 (*C. ergatensis*)、果实念珠菌 (*C. fructus*)、光滑念珠菌 (*C. glabrata*)、发酵念珠菌 (*C. fermentati*)、季也蒙念珠菌 (*C. guilliermondii*)、黑马朗念珠菌 (*C. haemulonii*)、英塞塔念珠菌 (*C. insectamens*)、英塞托念珠菌 (*C. insectorum*)、中型念珠菌 (*C. intermedia*)、杰夫念珠菌 (*C. jeffresii*)、乳酒念珠菌 (*C. kefir*)、克罗念珠菌 (*C. keroseneae*)、克鲁斯氏念珠菌 (*C. krusei*)、葡萄牙念珠菌 (*C. lusitaniae*)、利西念珠菌

(*C.lyxosophila*)、麦芽糖念珠菌(*C.maltosa*)、深海念珠菌(*C.marina*)、膜醭念珠菌(*C.membranifaciens*)、梅林念珠菌(*C.milleri*)、莫格念珠菌(*C.mogii*)、橄榄念珠菌(*C.oleophila*)、俄勒冈念珠菌(*C.oregonensis*)、近平滑念珠菌(*C.parapsilosis*)、桔念珠菌(*C.quercitrusa*)、皱褶念珠菌(*C.rugosa*)、清酒念珠菌(*C.sake*)、休哈塔念珠菌(*C.shehatea*)、特诺念珠菌(*C.temnochilae*)、纤维念珠菌(*C.tenuis*)、塞阿念珠菌(*C.theae*)、托轮念珠菌(*C.tolerans*)、热带念珠菌(*C.tropicalis*)、土屋念珠菌(*C.tsuchiyae*)、斯诺拉念珠菌(*C.sinolaborantium*)、大豆念珠菌(*C.sojae*)、萨哈念珠菌(*C.subhashii*)、维斯念珠菌(*C.viswanathii*)、产朊念珠菌(*C.utilis*)、优巴念珠菌(*C.ubatubensis*)、赞穆念珠菌(*C.zemplanina*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、指甲隐球菌(*Cryptococcus uniguttulatus*)、卡森德巴利酵母(*Debaryomyces carsonii*)、头状地霉菌(*Geotrichum capitatum*)、阿萨丝孢酵母(*Trichosporon asahii*)、粘性丝孢酵母(*Trichosporon mucoides*)、墨汁丝孢酵母(*Trichosporon inkin*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、阿卡毕赤酵母(*Pichia acaciae*)、异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)、荚膜毕赤酵母(*Pichia capsulata*)、粉状毕赤酵母(*Pichia farinosa*)、季也蒙毕赤酵母(*Pichia guilliermondii*)、斯巴达克毕赤酵母(*Pichia spartinae*)、欧美毕赤酵母(*Pichia ohmeri*)、粘红酵母(*Rhodotorula glutinous*)、胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)、布拉迪酵母(*Saccharomyces boulardii*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和/或福瑞接合囊孢菌(*Zygorhizidium florentinus*)。

[0505] 原虫可以选自变形虫、鞭毛虫、纤毛虫或孢子虫的群组。它可以选自棘阿米巴属(*Acanthamoeba*)、巴倍虫属(*Babesia*)、肠袋虫属(*Balantidium*)、隐孢子虫属(*Cryptosporidium*)、双核阿米巴属(*Dientamoeba*)、内阿米巴属(*Entamoeba*)、梨形鞭毛虫属(*Giardia*)、利什曼原虫(*Leishmania*)属、纳氏虫属(*Naegleria*)、疟原虫属(*Plasmodium*)、草履虫属(*Paramecium*)、毛滴虫属(*Trichomonas*)、锥体虫属(*Trypanosoma*)、锥虫属(*Typanosoma*)、弓形虫属(*Toxoplasma*)。

[0506] 原虫可以属于以下种：结肠小袋纤毛虫(*Balantidium coli*)、溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*) (又称为肠贾第鞭毛虫(*Giardia intestinalis*)或十二指肠贾第鞭毛虫(*Giardia duodenalis*))、杜氏利什曼虫(*Leishmania donovani*)、热带利什曼原虫(*L.tropica*)、巴西利什曼原虫(*L.brasiliensis*)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫(*P.vivax*)、卵形疟原虫(*P.ovale*)、三日疟原虫(*P.malariae*)、诺氏疟原虫(*P.knowlesi*)、瑞氏疟原虫(*P.reichenowi*)、加伯尼疟原虫(*P.gaboni*)、墨西哥疟原虫(*P.mexicanum*)、弗洛李登斯疟原虫(*P.floridense*)、布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)、伊氏锥虫(*Typanosoma evansi*)、罗得西亚锥虫(*Trypanosoma rhodesiense*)、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)。

[0507] 藻类可以任性地选自衣藻属(*Chlamydomonas*)。

[0508] 细菌可以任性地选自产水菌门(*Aquificae*)、热袍菌门(*Thermotogae*)、热脱硫杆菌门(*Thermodesulfobacteria*)、奇球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*)、金菌门(*Chrysiogenetes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、热微菌门(*Thermomicrobia*)、硝化螺旋菌门(*Nitrospira*)、脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、绿菌门

(Chlorobi)、变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、衣原体门(Chlamydiae)、螺旋体门(Spirochaetes)、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、酸杆菌门(Acidobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、网团菌门(Dictyoglomi)、芽单胞菌门(Gemmatomonadetes)和黏胶球形菌门(Lentisphaerae)。

[0509] 细菌可以任选地选自放线菌纲(Actinobacteria)、 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、芽孢杆菌纲(Bacilli)、 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)、梭菌纲(Clostridia)、 δ -变形菌纲(Deltaproteobacteria)、 ϵ -变形菌纲(Epsilonproteobacteria)、黄杆菌纲(Flavobacteriaceae)、梭杆菌纲(Fusobacteria)、 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、麦克菌纲(Mikeiasis)、柔膜菌纲(Mollicutes)或奈加菌纲(Negativicutes)。

[0510] 细菌可以任选地属于以下目：气单胞菌目(Aeromonadales)、放线菌目(Actinomycetales)、芽孢杆菌目(Bacillales)、拟杆菌目(Bacteroidales)、双歧杆菌目(Bifidobacteriales)、伯克氏菌目(Burkholderiales)、弯曲菌目(Campylobacteriales)、柄杆菌目(Caulobacteriales)、心杆菌目(Cardio bacteriales)、梭菌目(Clostridiales)、肠杆菌目(Enterobacteriales)、黄杆菌目(Flavobacteriales)、梭杆菌目(Fusobacteriales)、乳酸杆菌目(Lactobacillales)、微球菌目(Micrococcales)、奈瑟菌目(Neisseriales)、巴斯德菌目(Pasteurellales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)、根瘤菌目(Rhizobiales)、红螺菌目(Rhodospirillales)、月牙单胞菌目(Selenomonadales)、弧菌目(Vibrionales)、黄色单胞菌目(Xanthomonadales)。

[0511] 细菌可以任选地选自以下科：醋酸杆菌科(Acetobacteraceae)、产碱杆菌科(Alcaligenaceae)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)、拟杆菌科(Bacteroidaceae)、伯克氏菌科(Burkholderiaceae)、柄杆菌科(Caulobacteraceae)、丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、黄杆菌科(Flavobacteriaceae)、梭杆菌科(Fusobacteriaceae)、诺卡氏菌科(Nocardiaceae)、普雷沃氏菌科(Prevotellaceae)、紫单胞菌科(Porphyrimonadaceae)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)、理研菌科(Rikenellaceae)、根瘤菌科(Rhizobiaceae)、萨特菌科(Sutterellaceae)。

[0512] 细菌可以任选地是选自例如以下的属：营养缺陷菌属(Abiotrophia)、无色杆菌属(Achromobacter)、食酸菌属(Acidovorax)、不动杆菌属(Acinetobacter)、放线杆菌属(Actinobacillus)、马杜拉放线菌属(Actinomadura)、放线菌属(Actinomyces)、气球菌属(Aerococcus)、气单胞菌属(Aeromonas)、厌氧球菌属(Anaerococcus)、边虫属(Anaplasma)、芽孢杆菌属(Bacillus)、拟杆菌属(Bacteroides)、巴通氏菌属(Bartonella)、双歧杆菌属(Bifidobacterium)、博德特氏菌属(Bordetella)、疏螺旋体属(Borrelia)、短波单胞杆菌属(Brevundimonas)、布鲁氏菌属(Brucella)、伯克氏菌属(Burkholderia)、曲状杆菌属(Campylobacter)、二氧化碳嗜纤维菌属(Capnocytophaga)、衣原体属(Chlamydia)、柠檬酸杆菌属(Citrobacter)、嗜衣体属(Chlamydophila)、金黄杆菌属(Chryseobacterium)、梭菌属(Clostridium)、丛毛单胞菌属(Comamonas)、棒状杆菌属(Corynebacterium)、考克斯氏体属(Coxiella)、贪铜菌属(Cupriavidus)、代尔夫特菌属(Delftia)、皮杆菌属(Dermabacter)、艾利希体属(Ehrlichia)、艾肯菌属(Eikenella)、肠

杆菌属 (*Enterobacter*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、埃希氏杆菌属 (*Escherichia*)、丹毒丝菌属 (*Erysipelothrix*)、费克蓝姆菌属 (*Facklamia*)、芬戈尔德菌属 (*Finegoldia*)、弗朗西斯氏菌属 (*Francisella*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、兼性双球菌属 (*Gemella*)、戈登氏菌属 (*Gordonia*)、嗜血杆菌属 (*Haemophilus*)、螺旋杆菌属 (*Helicobacter*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、军团杆菌属 (*Legionella*)、钩端螺旋体属 (*Leptospira*)、李斯特氏菌属 (*Listeria*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、莫拉菌属 (*Moraxella*)、摩根氏菌属 (*Morganella*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、支原体属 (*Mycoplasma*)、奈瑟菌属 (*Neisseria*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、东方体属 (*Orientia*)、潘克氏菌属 (*Pandora*)、巴氏杆菌属 (*Pasteurella*)、嗜脲菌属 (*Peptoniphilus*)、消化链球菌属 (*Peptostreptococcus*)、邻单胞菌属 (*Plesiomonas*)、卟啉单胞菌属 (*Porphyromonas*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、普雷沃氏菌属 (*Prevotella*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、丙酸杆菌属 (*Propionibacterium*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、罗尔斯通氏菌属 (*Ralstonia*)、拉乌尔菌属 (*Raoultella*)、立克次体菌属 (*Rickettsia*)、罗思氏菌属 (*Rothia*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、志贺杆菌属 (*Shigella*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、坦纳菌属 (*Tannerella*)、密螺旋体属 (*Treponema*)、脲原体属 (*Ureaplasma*)、弧菌属 (*Vibrio*) 或耶尔森氏菌属 (*Yersinia*)。

[0513] 细菌可以任选地是选自例如以下的种：软弱营养缺陷菌 (*Abiotrophia defectiva*)、氧化木糖无色杆菌 (*Achromobacter xylosoxidans*)、燕麦食酸菌 (*Acidovorax avenae*)、西瓜食酸菌 (*Acidovorax citrulli*)、炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*)、蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*)、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、脆弱拟杆菌、汉氏巴通氏菌 (*Bartonella henselae*)、五日热巴通氏菌 (*Bartonella quintana*)、百日咳博德特菌 (*Bordetella pertussis*)、伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、伽氏疏螺旋体 (*Borrelia garinii*)、阿弗西尼疏螺旋体 (*Borrelia azelii*)、柔氏螺旋体菌 (*Borrelia recurrentis*)、牛布氏杆菌 (*Brucella abortus*)、犬布氏杆菌 (*Brucella canis*)、羊布氏杆菌 (*Brucella melitensis*)、猪布氏杆菌 (*Brucella suis*)、洋葱伯克氏菌 (*Burkholderia cepacia*)、伯克氏菌属亚门 (*Burkholderia genomovars*)、空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*)、肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、鸚鵡热嗜衣体 (*Chlamydophila psittaci*)、克氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter koseri*)、肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*)、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)、产气荚膜梭菌 (*C. perfringens*)、破伤风梭菌 (*C. tetani*)、白喉杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、纹带棒状杆菌 (*C. striatum*)、微细棒状杆菌 (*C. minutissimum*)、模拟棒状杆菌 (*C. imitans*)、无枝菌酸棒状杆菌 (*C. amycolatum*)、食酸代尔夫特 (*Delftia acidovorans*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、阴沟肠杆菌 (*E. cloacae*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、土拉弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*)、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)、肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumoniae*)、嗜肺性退伍军人杆菌 (*Legionella pneumophila*)、钩端螺旋体 (*Leptospira interrogans*)、圣地罗西钩端螺旋

体 (*Leptospira santarosai*)、韦氏钩端螺旋体 (*Leptospira weilii*)、野口氏钩端螺旋体 (*Leptospira noguchii*)、绵羊李斯特氏菌 (*Listeria ivanovii*)、单核细胞增多性李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、黄色微球菌 (*Micrococcus luteus*)、摩氏摩根菌 (*Morganella morganii*)、卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*)、鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*)、偶然分枝杆菌 (*M. fortuitum*)、麻风分枝杆菌 (*M. leprae*)、派瑞分枝杆菌 (*M. peregrinum*)、结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、溃疡分枝杆菌 (*M. ulcerans*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、淋病奈瑟菌、乳糖奈瑟菌 (*N. lactamica*)、脑膜炎奈瑟菌 (*N. meningitidis*)、星形诺卡氏菌 (*Nocardia asteroides*)、奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、马红球菌 (*Rhodococcus equi*)、吡啶红球菌 (*Rhodococcus pyridinivorans*)、立克氏立克次体菌 (*Rickettsia rickettsii*)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、索氏志贺杆菌 (*Shigella sonnei*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、头状葡萄球菌 (*S. capitis*)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)、溶血性葡萄球菌 (*S. haemolyticus*)、人葡萄球菌 (*S. hominis*)、腐生葡萄球菌 (*S. saprophyticus*)、嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、酿脓链球菌 (*S. pyogenes*)、肺炎链球菌 (*S. pneumoniae*)、梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*)、解脲脲原体 (*Ureaplasma urealyticum*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 和假结核耶尔森氏菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)。

[0514] 病毒可以任选地是DNA病毒和RNA病毒或逆转录病毒。它可以任选地是单链(ss)或双链(ds)病毒。更确切地说,它可以任选地是ssDNA、dsDNA、dsRNA、ssRNA(正链)、ssRNA(负链)、ssRNA(逆转录)或dsDNA(逆转录)病毒。

[0515] 其可以任选地选自以下一种或多种:疱疹病毒科(Herpesviridae),任选地选自单纯疱疹病毒属(Simplexvirus)、水痘病毒属(Varicellovirus)、细胞巨大病毒(Cytomegalovirus)、玫瑰疹病毒(Roseolovirus)、淋巴隐病毒(Lymphocryptovirus)和/或细长病毒属(Rhadinovirus);腺病毒科(Adenoviridae),任选地选自腺病毒(Adenovirus)和/或哺乳动物腺病毒(Mastadenovirus);乳头状瘤病毒科(Papillomaviridae),任选地选自 α 乳头状瘤病毒(Alphapapillomavirus)、 β 乳头状瘤病毒(Betapapillomavirus)、 γ 乳头状瘤病毒(Gammapapillomavirus)、 μ 乳头状瘤病毒(Mupapillomavirus)和/或 ν 乳头状瘤病毒(Nupapillomavirus);多瘤病毒科(Polyomaviridae),任选地选自多瘤病毒(Polyomavirus);痘病毒科(Poxviridae),任选地选自软疣痘病毒属(Molluscipoxvirus)、正痘病毒(Orthopoxvirus)和/或副痘病毒(Parapoxvirus);指环病毒科(Anelloviridae),任选地选自 α 细环病毒属(Alphatorquevirus)、 β 细环病毒属(Betatorquevirus)和/或 γ 细环病毒属(Gammatorequevirus);霉菌去氧核糖核酸病毒科(Mycodnaviridae),任选地选自格环病毒属(Gemycircular-viruses);微小病毒科(Parvoviridae),任选地选自红细胞病毒属(Erythrovirus)、依赖性病毒(Dependovirus)和/或博卡病毒(Bocavirus);呼肠孤病毒科(Reoviridae),任选地选自科罗拉多蜱传热症病毒属(Coltivirus)、轮状病毒(Rotavirus)和/或东南亚十二节段RNA病毒属(Seadornavirus);冠状病毒科(Coronaviridae),任选地选自 α 冠状病毒(Alphacoronavirus)、 β 冠状病毒

(Betacoronavirus) 和/或环曲病毒属 (Torovirus); 星状病毒科 (Astroviridae), 任选地选自哺乳动物星状病毒属 (Mamastrovirus); 杯状病毒科 (Caliciviridae), 任选地选自诺如病毒 (Norovirus) 和/或札幌病毒 (Sapovirus); 黄病毒科 (Flaviviridae), 任选地选自黄病毒 (Flavivirus)、丙型肝炎病毒属 (Hepacivirus) 和/或庚型肝炎病毒 (Pegivirus); 小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae), 任选地选自心病毒属 (Cardiovirus)、卡萨病毒 (Cosavirus)、肠病毒 (Enterovirus)、肝病毒 (Hepatovirus)、库布病毒 (Kobuvirus)、双埃柯病毒 (Parechovirus)、若萨病毒 (Rosavirus) 和/或萨利病毒 (Salivirus); 披膜病毒科 (Togaviridae), 任选地选自 α 病毒 (Alphavirus) 和/或风疹病毒属 (Rubivirus); 弹状病毒科 (Rhabdoviridae), 任选地选自狂犬病毒属 (Lyssavirus) 和/或水泡病毒属 (Vesiculovirus); 丝状病毒科 (Filoviridae), 任选地选自埃博拉病毒 (Ebola virus) 和/或马尔堡病毒 (Marburgvirus); 副黏病毒科 (Paramyxoviridae), 任选地选自亨尼帕病毒 (Henipavirus)、麻疹病毒属 (Morbilivirus)、呼吸道病毒属 (Respirovirus)、腮腺炎病毒属 (Rubulavirus)、间质肺炎病毒 (Metapneumovirus) 和/或肺病毒属 (Pneumovirus); 沙粒病毒科 (Arenaviridae), 任选地选自沙粒病毒 (Arenavirus); 布尼亚病毒科 (Bunyaviridae), 任选地选自汉坦病毒 (Hantavirus)、内罗病毒 (Nairovirus)、正布尼亚病毒属 (Orthobunyavirus) 和/或白蛉病毒属 (Phlebovirus); 正黏病毒科 (Orthomyxoviridae), 任选地选自A型流感病毒、B型流感病毒、C型流感病毒和/或索戈托病毒属 (Thogotovirus); 逆转录病毒科, 任选地选自 γ 逆转录病毒属、 δ 逆转录病毒属、慢病毒、泡沫病毒属; 肝脱氧核糖核酸病毒科 (Epadnaviridae), 任选地选自正肝脱氧核糖核酸病毒 (Orthohepadnavirus); 戊型肝炎病毒属 (Hepevirus); 和/或 δ 病毒科。

[0516] 因此, 任选地, 谱数据可以用于被鉴别为以下的微生物: (i) 原核类或真核类; (ii) 属于特定界, 例如本文中列出的任一界; (iii) 属于特定门, 例如本文中列出的任一门; (iv) 属于特定纲, 例如本文中列出的任一纲; (v) 属于特定目, 例如本文中列出的任一目; (vi) 属于特定科, 例如本文中列出的任一科; (vii) 属于特定属, 例如本文中列出的任一属; (viii) 属于特定种, 例如本文中列出的任一种; 和/或 (ix) 属于特定菌株, 例如本文中列出的任一菌株。

[0517] 术语“表征 (characterise)”、“表征 (characterisation)”和这些术语的派生词在本文中可互换地用于意指获得关于目标实体的特征的信息。

[0518] 关于微生物的特征的信息可以例如选自以下各项中的一或多项: 毒性、抗微生物剂敏感性或抗性、产生特定化合物的能力、生长速率、特定化合物的产生速率、呼吸速率和/或对胁迫的反应/胁迫水平。因此, 表征可以包括分析微生物的基因型和/或表型, 和/或分析微生物的特性。

[0519] 分析表型、基因型和/或均质性

[0520] 基因突变可以例如通过对不同氨基酸编码和/或通过产生缩短或拉长的蛋白质来改变蛋白质的结构。基因突变可以替代地或另外导致基因产物的输出减少或缺乏基因产物。

[0521] 术语“表型”用以指微生物的物理和/或生物化学特征, 而术语“基因型”用以指微生物的基因组成。

[0522] 术语“表型”可以用于指微生物的物理和/或生物化学特征的集合, 它可以任选地

是微生物的所有物理和/或生物化学特征的集合;和/或指微生物的物理和/或生物化学特征中的一或多个。举例来说,微生物可以被称为具有特定微生物类型,例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株的表型和/或具有抗生素抗性的表型。

[0523] 术语“基因型”可以用于指遗传信息,它可以包括基因、调节元件和/或垃圾DNA。术语“基因型”可以用于指微生物的遗传信息的集合,它可以任选地是微生物的所有遗传信息的集合;和/或指微生物的遗传信息中的一或多个。举例来说,微生物可以被称为具有特定微生物类型,例如枯草芽孢杆菌菌株的基因型和/或具有抗生素抗性的基因型。

[0524] 微生物的基因型可能影响或可能不影响其表型,如下文所解释。

[0525] 基因型与表型之间的关系是简单明了的。举例来说,如果微生物包括编码特定蛋白质、例如粘附蛋白FimH粘附素的功能基因,那么它通常将在表型上是FimH粘附素阳性的,即在其表面上具有FimH粘附素蛋白,而如果微生物缺乏功能FimH粘附素基因,那么它将具有FimH粘附素阴性表型。

[0526] 突变基因型可能产生突变表型。举例来说,如果突变破坏基因的功能,那么所述基因的功能的缺失可能产生突变表型。但是,如遗传冗余等因素可以防止基因型性状产生对应表型性状。举例来说,微生物可以具有特定基因的多个拷贝,或具有编码产生相同结果的替代通路的基因。

[0527] 还必须记住的是许多基因型变化可能不具有表型影响,例如因为它们在垃圾DNA,即似乎未实现序列依赖性目的DNA中,或因为它们是沉默突变,即由于遗传密码的冗余而不改变DNA的编码信息的突变。

[0528] 微生物的表型由其基因型决定,因为细胞需要遗传信息来进行细胞过程并且任何特定蛋白质在细胞含有相关遗传信息的情况下只能在细胞内产生。但是,微生物的表型也会受环境因素和/或胁迫,如温度、养分和/或矿物质可用性、毒素等影响。此类因素可能影响如何使用基因信息,例如表达哪些基因和/或以哪种水平表达。环境因素和/或胁迫也会影响微生物的其它特征,例如热量可以使膜更具流动性。

[0529] 如果功能性转基因在适当的基因组位置插入到细胞中,那么这可能产生对应表型。

[0530] 插入转基因可能影响微生物的表型,但改变的表型可能任选地只在适当环境条件下才观测到。举例来说,插入编码参与特定物质的合成的蛋白质的转基因将只在微生物具备所需的起始物质的情况下得到产生所述物质的细胞。

[0531] 任选地,方法可以包括分析微生物群体的表型和/或基因型。

[0532] 可以对微生物群体的基因型和/或表型进行操纵,例如以分析细胞过程、使微生物群体更适于药物筛选和/或生产等等。任选地,方法可以包括分析此类基因型和/或表型操纵对微生物群体,例如对微生物群体的基因型和/或表型的影响。

[0533] 所述方法可以任选地用于在突变诱发之后分析微生物群体。确认微生物是否已突变的常规方法可能困难和/或费时。任选地,方法可以用于分析微生物是否已突变。突变可以例如是引入新基因、基因的沉默、基因表达的改变或产生改变的蛋白质。沉默可以例如通过基因敲除来实现。

[0534] 任选地,方法可以用于分析突变诱发对微生物,例如对微生物的基因型和/或表型的影响。

[0535] 任选地,方法可以在2个或更多个时间点,例如在突变诱发前后,和/或在突变诱发后的2个或更多个时间点分析微生物。

[0536] 任选地,微生物群体可以是均质或异质的。“均质”、“均质性”和这些术语的派生词意指群体是均一的,并且“异质”、“异质性”和这些术语的派生词意指群体是不均一的。

[0537] “均质性程度”或“异质性程度”意指微生物群体均质或异质的程度,它可以表示为百分比。举例来说,如果微生物的至少60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%是均质的,那么微生物群体可以视为具有高度均质性。如果微生物的至少40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%是异质的,那么微生物群体可以视为具有高度异质性。

[0538] 均质性和/或异质性可以是就一或多个基因型和/或表型特征,例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个基因型和/或表型特征而言,任选地就微生物的整个基因型和/或表型而言。

[0539] 任选地,方法可以包括分析微生物群体的均质性和/或异质性程度。

[0540] 在微生物群体培养期间,微生物可以生长和复制。复制可以涉及自我更新,即产生与母细胞具有相同基因型和/或表型的子细胞,和/或分化,即产生与母细胞具有不同基因型和/或表型的子细胞。

[0541] 可替代地或另外,微生物可以获得一或多个突变,因此获得不同基因型,此可以体现为不同表型。

[0542] 在异质微生物群体中,一种类型可以比另一细胞类型更好地生长和/或复制或以不同方式生长和/或复制,和/或一种细胞类型可以变成休眠和/或死亡。

[0543] 出于这些和/或其它原因,微生物群体可以变成大体上异质的,因此方法可以任选地包括监测微生物群体的均质性和/或异质性的变化。

[0544] 任选地,如果微生物群体的均质性和/或异质性程度高于或低于所需,那么方法可以包括影响均质性和/或异质性程度的步骤。此例如可以涉及调整培养条件和/或添加物质,以影响例如微生物群体中存在的一种或多种微生物类型的生长和/或分化速率。

[0545] 操纵基因型和/或表型

[0546] 任选地,可以操纵微生物群体,例如可以操纵构成微生物群体的一些或全部微生物的表型和/或基因型。

[0547] 操纵可以任选地包括使微生物群体或其一部分暴露于化合物和/或辐射。

[0548] 操纵可以任选地是基因操纵。

[0549] 基因操纵可以改变微生物的一或多个基因组区,所述基因组区可以在基因的编码区、基因的非编码区、调节区(例如启动子或强化子)和/或称作“垃圾”DNA的区中。

[0550] 基因操纵可以任选地包括随机突变诱发。举例来说,微生物可以暴露于诱变剂,诱变剂可以例如选自化学诱变剂和/或辐射。

[0551] 可以任选地是化学诱变剂的化合物可以任选地选自例如烷基化剂、交联剂和/或多环芳香烃(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)。烷基化剂通过向DNA碱基添加分子组分起作用,从而改变蛋白质产物。交联剂与DNA碱基产生共价键,而PAH通过人体代谢成其它潜在诱变分子。

[0552] 辐射可以任选地选自例如适合波长的光、热和/或电离辐射。电离辐射能够穿透微生物并在细胞内含物中产生离子。这些离子能够引起DNA的永久改变。电离辐射可以任选地选自例如x射线、 γ 射线、中子、电子(“ β ”粒子)和/或 α 粒子(氢核)。电离辐射能够改变DNA两股相互作用的方式。它能够重排整个染色体部分,改变DNA的相对较长伸长部。光可以任选地是例如UV光。这能够使得DNA中的相邻胸腺嘧啶碱基之间形成共价键,进而改变所述位置处的DNA。

[0553] 替代随机突变诱发或除随机突变诱发以外,基因操纵可以任选地包括定向突变诱发,定向突变诱发可以任选地例如是遗传信息的基因敲除、改变和/或插入。已通过定向突变操纵的细胞可以被称为“转化”细胞,尤其在已插入新基因或基因变异体,即“转基因”的情况下。类似地,包含已经通过定向突变操纵的细胞或由其组成的微生物群体可以被称为“转化”微生物群体。类似地,包含已经通过定向突变操纵的细胞或由其组成的细胞器可以被称为“转化”细胞器。

[0554] 突变诱发可以任选地涉及例如以下技术中的一种或多种以将所需遗传物质,如转基因引入细胞中:微注射至细胞的细胞核中;病毒载体,例如腺病毒或慢病毒载体;脂质体;磷酸钙;树枝状聚合物;阳离子聚合物,如DEAE-聚葡萄糖和/或聚乙烯亚胺;超声处理;电穿孔;利用磁粒子的磁力辅助转染;和/或粒子轰击。

[0555] 突变诱发可以任选地涉及基因组编辑,例如使用可编程核酸酶,如锌指核酸酶(zinc-finger nuclease,ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease,TALEN)和/或规律成簇的间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat,CRISPR)/CRISPR相关蛋白质9(Cas9)。

[0556] 任选地,方法可以包括例如通过本文中提及的任一方法,进行随机和/或定向突变诱发的步骤。

[0557] 分析污染

[0558] 微生物群体可能处于被另一微生物类型污染的风险下。具体地说,例如微生物类型培养物等微生物培养物应不含污染。“污染”意指微生物培养物不纯,即存在一种或多种其它(不希望)微生物类型。

[0559] 污染难以用常规方法检测,因为两个微生物类型可能无法用肉眼区分彼此。

[0560] 任选地,方法可以用于分析感染是否存在于微生物群体中。

[0561] 任选地,方法可以用于(i)确定所述微生物群体是否遭受污染;(ii)确定所述微生物群体是否无感染;(iii)确定所述微生物群体是否已消除污染;(iv)确定微生物群体的污染的进展或阶段;或(v)确定微生物群体的污染处理的进展或阶段。

[0562] 任选地,如果确定污染,那么可以鉴别污染微生物。

[0563] 任选地,如果确定污染,那么方法可以包括处理/去除污染的步骤,例如通过使微生物群体与有效地选择性杀死污染微生物或抑制其生长的适当物质接触。举例来说,如果确定被细菌污染,那么可以使用合适的抗生素。

[0564] 微生物群体的特性

[0565] 方法可以在具有所需特性的微生物群体上,通过选择具有所需特性的存在的微生物群体而进行。可替代地或另外,可以对微生物群体进行操纵以赋予微生物群体所需特性。

方法可以任选地包括分析微生物群体的一种或多种特性。

[0566] 可以选择、操纵、分析等的微生物群体的特性可以任选地选自下文所列的任一特性。

[0567] 微生物群体可以任选地是关于一种或多种物质为营养缺陷型的。营养缺陷型是微生物不能合成其生长所需的特定物质或合成能力降低。营养缺陷型是显示此特征的微生物；营养缺陷型是对应形容词。举例来说，营养缺陷型可能缺乏制备色氨酸所需的代谢酶，在此情况下它可以被称为trp-营养缺陷型。

[0568] 微生物群体可以任选地具有产生所需物质，例如药物的能力。因此，微生物群体可以任选地具有利用物质，例如用以使底物分子代谢形成所需化合物或前驱物的能力。第一物质的利用可以包括使用第一物质作为底物以产生第二物质；使用第一物质作为通用养分；和/或分解第一物质。

[0569] 微生物群体可以任选地具有关于所需物质的生产的高比生产率。微生物群体可以任选地高效利用和/或分解所需物质。它可以任选地包含高水平的或能够产生高水平的一种或多种与能量产生、细胞氧化还原电位的调节有关的关键代谢物，和用于糖基化的前驱物。方法可以任选地用于确定低产率/效率微生物群体是否展现与其高产率/效率对应物不同的代谢分布。方法可以任选地用于分析关于微生物群体的所需物质的利用和/或分解的比生产潜力和/或效率。

[0570] 微生物群体可以任选地具有分泌所产生物质的能力。

[0571] 微生物群体可以任选地具有快速复制的能力。

[0572] 方法可以任选地用于分析微生物群体的代谢物组、脂质组和/或蛋白质组。

[0573] 代谢物组是细胞中存在的一些或全部小分子代谢物的集合。脂质组是微生物中存在的一些或全部脂质的集合。蛋白质组是微生物中存在的一些或全部蛋白质的集合。尽管许多蛋白质和一些代谢物可能未必直接通过本文提供的方法分析，但它们可以任选地通过分析其对应的间接生物标记物而间接地分析。

[0574] 方法可以任选地包括分析微生物群体或其中存在的一种或多种微生物类型的状态。“状态”意指微生物群体或其中存在的一种或多种微生物类型的状况，状态可以例如是健康并且生长；健康并且不生长；受胁迫并且生长；受胁迫并且不生长；垂死；或死亡。

[0575] 方法可以任选地包括分析微生物群体的存活力。“存活力”意指微生物群体将继续存活的最小时间长度。存活力还可以被称作“稳固性”，因为稳固的微生物群体可能比不稳固的微生物群体存活更久。

[0576] 方法可以任选地包括分析细胞过程。细胞过程可以例如是产生物质；利用养分；对暴露于物质的反应；对暴露于环境条件的反应等。

[0577] 方法可以任选地涉及鉴别微生物类型、表型、基因型和/或微生物特性的谱生物标记物。已知例如大肠杆菌等许多微生物群体的身份和特征，并且本文提供的方法允许鉴别这些微生物类型或微生物特征的谱生物标记物。因此，方法可以例如用于使特征与谱数据，例如谱生物标记物相关。特征可以例如是对特定物质的敏感性。

[0578] 例如抗微生物剂等药剂的药物发现和筛选

[0579] 已知使用基于微生物的平台推进药物发现，并且本领域的技术人员应了解基于微生物的化合物筛选和生物分析对于此类药物发现来说是不可或缺的。

[0580] 任选地,本文提供的方法可以用于药物发现和/或药物分析。因此,所述方法可以例如用作筛选方法以筛选潜在治疗剂;或筛选已知治疗剂以分析其作用。举例来说,方法可以用于分析物质的功效;物质的作用机制;和/或物质的安全性。功效可以任选地是治疗功效。安全性可以任选地是药理学安全性。

[0581] 任选地,筛选可以是高通量筛选。任选地,筛选可以是针对有效抵抗本文中的其它地方列出的任一疾病,例如感染的治疗剂或此治疗剂的筛选。

[0582] 因此,方法可以任选地包含使微生物群体暴露于第一物质和使用所述方法来分析所述物质对微生物群体的影响。合适物质的细节论述于本文中的其它地方。

[0583] 任选地,可以使用第二物质,例如用于比较或对照目的。举例来说,方法可以包含使第一微生物群体暴露于第一物质并且可以使第二微生物群体暴露于第二物质,经由如本文中的其它地方所论述的质谱法和/或离子迁移谱法分析第一和第二微生物群体,以及分析两个微生物群体之间的任何差异。任选地,第二物质可以是对照物质,对照物质可以例如是阴性对照,例如水或缓冲液,或阳性对照,例如具有已知作用,例如已知抗微生物作用的药剂。任选地,在执行方法前第一和第二微生物群体可以一致。举例来说,两个样品可以从单一微生物群体获得以产生2个微生物群体。任选地,第一和第二微生物群体可以是同基因的。任选地,第一和第二微生物群体可以在表型和/或基因型上不同,例如它们可以是不同微生物类型。

[0584] 分析所述物质对微生物群体的影响可以包含分析微生物群体的一种或多种特性的变化,其细节论述于本文中的其它地方。

[0585] 因此,任选地,方法可以包含分析所述谱数据以便确定所述微生物群体是否以可能相关的方式与所述物质相互作用。

[0586] “以可能关注的方式相互作用”意指引起表型和/或基因型变化的相互作用。任选地,表型和/或基因型变化可以是微生物群体的一种或多种特性的变化,其细节提供于本文中的其它地方。

[0587] 任选地,可以对测试物质的EC₅₀进行测试。EC₅₀是产生半最大反应的药物的浓度。

[0588] 举例来说,可以对测试物质的细胞毒性进行测试,例如可以测量随测试物质的浓度而变的存活微生物的百分比并且可以鉴别对测试物质敏感和/或具抗性的微生物群体。

[0589] 任选地,方法可以包含分析微生物群体对物质的敏感性,例如微生物群体对已知或潜在的治疗剂的敏感性。举例来说,可以分析微生物群体对抗微生物药物的敏感性。

[0590] 任选地,方法还可以包含分析微生物群体的环境条件对微生物群体对所述物质的反应的影响的步骤。微生物群体的环境条件的细节提供于本文中的其它地方。因此,所述方法可以任选地包含(i)使微生物群体暴露于物质和(ii)改变微生物群体的环境条件的步骤。

[0591] 任选地,(i)使微生物群体暴露于物质和(ii)改变微生物群体的环境条件的步骤可以同时进行或按任何次序依次进行。单独和/或组合的任一这些步骤可以任选地重复例如至少2、3、4、5、6、7、8、9或10次。

[0592] 因此,微生物群体可以任选地例如暴露于物质,并随后可以改变微生物群体的环境条件;可以改变微生物群体的环境条件,并随后微生物群体可以暴露于物质;和/或微生物群体可以暴露于物质,并可以同时改变微生物群体的环境条件。

[0593] 应了解,任选地,一种或多种不同物质和/或一种或多种不同环境条件可以用于任一这些方法中。举例来说,可以任选地使用一组不同的物质。所述组可以例如包含单一类别的药物的成员和/或两种或更多种类别的药物,例如已知和未知药物的成员或由其组成。

[0594] 举例来说,任选地,物质可以是抗微生物药物。因此,例如,一种或多种微生物群体可以用一种或多种已知的抗微生物药物测试。任选地,一种或多种微生物群体可以例如使用一种或多种可能新颖治疗剂或抗微生物药物测试。

[0595] 任选地,一种或多种微生物群体可以进行遗传修饰,并且修饰过的微生物群体可以例如用已知的细胞毒性/细胞抑制药物和/或针对一组可能新颖治疗剂或细胞毒性/细胞抑制药物测试。

[0596] 任选地,一种或多种微生物群体可以针对第一物质测试并随后针对第二物质和任选地一种或多种其它物质测试。

[0597] 变化的分析

[0598] 可以用一种或多种不同方式进行任选的变化分析。

[0599] 任选地,可以在第一时间和在后续的另一时间,例如第二时间、第三时间、第四时间、第五时间、第六时间、第七时间、第八时间、第九时间、第十时间等时间通过本文提供的方法分析微生物群体。

[0600] 因此,任选地,方法可以包含在第一时间从所述目标产生所述气溶胶、烟雾或蒸气以获得所述第一谱数据;

[0601] 在后续时间从所述目标产生气溶胶、烟雾或蒸气;

[0602] 对在后续时间产生的气溶胶、烟雾或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析,以获得第二谱数据;以及

[0603] 比较第一和后续谱数据以测定目标的变化。后续时间可以是第二时间、第三时间、第四时间、第五时间、第六时间、第七时间、第八时间、第九时间、第十时间等时间。

[0604] 任选地,在第一时间与后续时间之间,微生物群体可以进行操纵和/或暴露于物质,所述物质可以任选地选自本文中列出的任一药剂,例如测试药剂。

[0605] 任选地,可以同时和/或依次分析2个或更多个,例如至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、150个、200个、300个、400个、500个、600个、700个、800个、900个、1000个、2000个、3000个、4000个、5000个、6000个、7000个、8000个、9000个或10000个一致和/或不一致微生物群体。如果分析一组3个或更多个微生物群体,那么所述组可以任选地包含例如2个或更多个彼此相同的微生物群体,以及2个或更多个彼此不相同的微生物群体。

[0606] 任选地,可以使用一种或多种其它测试药剂和/或参考或对照药剂。举例来说,第一微生物群体可以暴露于第一测试药剂并且第二微生物群体可以暴露于其它测试药剂、参考药剂或对照药剂。

[0607] 环境条件

[0608] 方法允许在界定的环境条件下分析微生物群体。此可以任选地允许例如在模拟体内条件的条件,例如宿主微环境的条件下分析微生物群体。

[0609] “界定的环境条件”意指控制至少一个环境因素。举例来说,控制的温度或温度范围,或控制的特定养分的水平可以称为界定的环境条件。

[0610] 任选地,方法可以包括分析一种或多种界定的环境条件对微生物群体的影响。任选地,可以分析一种或多种环境条件对微生物群体的影响。

[0611] 环境条件可以任选地是能够影响微生物群体生长、分化、迁移、微生物状态和/或表型和/或基因型的条件。因此,环境条件可以例如是培养基组分的性质和/或浓度,尤其养分和/或矿物质浓度;细胞-细胞接触的性质和程度;温度;pH值;流体平衡;压力;流动体积;和/或氧气压力。举例来说,微生物群体可以暴露于低氧。

[0612] 环境条件可以任选地通过将微生物群体引入宿主生物体或其样本中来改变。因此,任选地,微生物群体可以引入宿主生物体或其样本中。宿主生物体可以任选地选自人或非人动物。任选地,它可以是牲畜、家畜或实验室动物,例如啮齿动物。任选地,它可以是鼠类、豚鼠、仓鼠、大鼠、山羊、猪、猫、狗、绵羊、兔、母牛、马、羊驼、雪貂、家禽、水牛和/或猴。因此,任选地,细胞群体可以暴露于宿主生物体的体内环境或宿主生物体样本的离体环境,例如在其中维持和/或生长。此类暴露的影响可以任选地通过本文提供的方法分析。

[0613] 在分析目标前和/或后,可以任选地适当修改这些条件中的一种或多种。此类修改在所属领域的普通技术人员的能力内。

[0614] 因此,任选地,方法可以包含以下各项中的一或多个:改变或变化供应到微生物群体的养分的浓度;改变或变化供应到微生物群体的矿物质的浓度;改变或变化所述微生物群体维持的pH值水平;改变或变化所述微生物群体维持的温度;改变或变化所述微生物群体暴露的氧、二氧化碳或其它气体水平;改变或变化所述微生物群体暴露的污染对照物质或抗生素的浓度;改变或变化促使所述微生物群体产生治疗剂或其它产物的催化剂、诱导剂或试剂的浓度;和/或改变或变化所述微生物群体暴露的光水平。任选地,可以分析任一这些变化的影响。

[0615] 举例来说,环境条件可以是具有低浓度的一种或多种脂质和/或低总脂质浓度的培养基。

[0616] 同位素研究

[0617] 任选地,方法可以用于同位素研究或与其一起使用。

[0618] 同位素是在每个原子中中子数不同,而具有相同数目的质子的特定化学元素的变异体。同位素研究可以例如涉及使用稳定同位素,即非放射性同位素。举例来说,可以使用氢(H)、碳(C)、氮(N)、氧(O)、氟(F)和/或硫(S)的同位素。术语“不同类型的同位素”用于意指不同元素的同位素,因此C的同位素是与N的同位素不同类型的同位素。

[0619] 在自然界中,每种元素的一种同位素通常最丰富,并且可能存在的所述元素的任何其它稳定同位素通常丰度低得多。举例来说, ^1H 比 ^2H 丰富得多, ^{12}C 比 ^{13}C 丰富得多, ^{14}N 比 ^{15}N 丰富得多, ^{16}O 比 ^{17}O 或 ^{18}O 丰富得多,并且 ^{32}S 比 ^{34}S 丰富得多。较低丰度的同位素为较重同位素,因此其可以被称为“重同位素”。在同位素研究中,细胞可以暴露于一种或多种重同位素并且可以接着通过分析重同位素的归宿而分析细胞过程。

[0620] 不同非放射性稳定同位素可以通过质谱法或离子迁移谱法来区分,因此本文提供的方法可以任选地用于同位素研究或与其一起使用。

[0621] 因此,任选地,微生物群体可以暴露于一种或多种重同位素,例如包含一种或多种重同位素或由其组成的一种或多种物质。物质可以任选地选自本文中的其它地方列出的任一物质,例如任何养分,例如葡萄糖、谷氨酰胺等。包含一种或多种重同位素或由其组成的

物质可以被称为“重同位素物质”。重同位素物质可以任选地包含单一重同位素、2种或更多种重同位素,或由重同位素组成。重同位素物质可以任选地包含单一类型的重同位素或2种或更多种,例如至少2种、3种、4种、5种或6种不同类型的重同位素。

[0622] 物质可以任选地是同位素界定的,即有可能使用一种或多种特定原子经一种或多种重同位素置换的物质,此可以允许分析物质的特定部分的归宿。任选地,第一原子经重同位素置换的物质的分析可以与不同原子经重同位素置换的对应物质的分析相比。

[0623] 举例来说,可以使用重同位素物质,如养分,例如碳源,并且方法可以任选地用于分析养分是否被微生物群体使用和/或如何使用。因此,任选地,可以分析脂质、碳和/或蛋白质代谢,例如合成代谢和/或分解代谢。具体地说,方法可以任选地用于分析如脂肪酸类型等一种或多种代谢物中的重同位素类型的耗尽或富集。因此,举例来说,可以在微生物群体暴露于重同位素之前和/或之后分析一种或多种代谢物、脂肪酸、脂质和/或生物标记的存在或不存在和/或相对丰度。任选地,分析可以在2个或更多个时间点进行,例如以监测一种或多种代谢物、脂肪酸、脂质和/或生物标记物的存在或不存在和/或相对丰度随时间推移的变化。

[0624] 任选地,微生物群体可以同时和/或依序暴露于至少2种类型的重同位素和/或至少2种类型的重同位素物质。任选地,微生物群体可以在第一时间点暴露于第一类型的重同位素并且在第二时间点暴露于第二类型的重同位素。任选地,微生物群体可以在第一时间点暴露于第一类型的重同位素物质并且在第二时间点暴露于第二类型的重同位素物质。举例来说,微生物群体可以在第一时间点暴露于重同位素葡萄糖并且在第二时间点暴露于重同位素谷氨酰胺。

[0625] 同基因微生物群体

[0626] 任选地,方法可以涉及使用2个或更多个除了一或多个关注基因区以外同基因的微生物群体。术语“同基因”在所属领域中用于指示2个微生物群体除了一或多个关注基因区以外,在基因上一致或共用基本上相同的遗传信息。通常,2个同基因微生物群体将在单一基因中不同,所述基因可以任选地连接到其中同基因微生物群体也可能不同的报告基因。

[0627] 任选地,同基因微生物群体可以在内源性基因上不同,例如一个微生物群体可以具有野生型内源性基因并且另一微生物群体可以具有所述基因的突变型式。任选地,突变型式可以具有改变的功能性或是基因敲除。

[0628] 任选地,同基因微生物群体可以在外源性基因上不同,例如一个微生物群体可以包含内源性基因的第一型式并且另一微生物群体可以具有所述外源性基因的第二型式;或一种微生物群体可以包含第一外源性基因并且另一微生物群体可以具有第二外源性基因。

[0629] 因此,方法可以任选地用于分析2个或更多个同基因微生物群体之间的差异。使用同基因微生物群体可以例如适用于分析修饰或变化的影响,例如分析物质对微生物群体的影响;分析环境变化对微生物群体的影响;和/或分析微生物群体的物质产生。

[0630] 同基因微生物群体可以例如通过用编码第一转基因和第一标记物的第一载体转染第一微生物群体并用编码第二转基因和第二标记物的第二载体转染第二微生物群体而获得,所述第二不同于所述第一。

[0631] 任选地,标记物可以例如是荧光标记,其细节提供于本文中的其它地方。

[0632] 通过本文提供的方法培养和分析两个微生物群体允许例如筛选对关注基因具有选择性活性、例如毒性的化合物。此类药物筛选广泛地适用于挖掘靶向造成疾病发展的特定基因改变的治疗剂。

[0633] 微生物群体的物质产生和/或利用

[0634] 微生物可以产生例如群体感应分子、毒性因子等物质，因此对微生物群体的物质产生的分析可以提供有用的关于微生物群体的身份和/或特征的信息，例如其毒性、其与其环境的相互作用等等。合适物质的细节提供于本文中的其它地方。

[0635] 微生物群体可以用于产生例如治疗剂、燃料、食物等物质。举例来说，物质可以是生物医药，例如抗体、激素和/或细胞因子。微生物群体可以利用第一物质作为底物来产生第二物质。微生物群体可以用以分解物质，任选地分解成有用和/或不太有害的物质。它们可以例如用于分解工业废弃物、污染物、除草剂、杀虫剂、炸药等。

[0636] 因此，方法可以任选地用于分析微生物群体利用和/或产生物质的能力；和/或分析微生物群体的物质利用和/或产生。合适物质的细节提供于本文中的其它地方。

[0637] 任选地，方法可以涉及物质的纯化，因此它可以包括纯化物质的步骤。纯化物质的步骤可以例如包含以下各项中的一或多个：溶解细胞；离心，例如以实现等密度分带和/或非平衡沉降；过滤；膜分离，它可以例如是微过滤、超过滤和/或渗析；萃取，它可以例如是流体萃取和/或液体/液体萃取；沉淀，它可以例如是分级沉淀；色谱，它可以例如是离子交换色谱、凝胶过滤色谱、亲和色谱、疏水相互作用色谱、高效液相色谱（“HPLC”）和/或吸附色谱。任选地，所述步骤可以涉及所述物质的游离酸形式的沉淀，并且任选地，所述化合物的游离酸形式转化成所述化合物的盐。

[0638] 微生物群体可以用于分解物质，任选地分解成有用和/或不太有害的物质。它们可以例如用于分解工业废弃物、污染物、除草剂、杀虫剂、炸药等。合适物质的细节提供于本文中的其它地方。

[0639] 利用/产生/分解微生物群体的鉴别

[0640] 任选地，方法可以用作筛选方法，例如以鉴别合适利用/产生/分解微生物群体，和/或区别具有不同利用/产生/分解特性的微生物群体。

[0641] 细胞可以任选地进行操纵，例如基因操纵，以产生具有一种或多种所需特性的微生物群体。任选地，方法可以涉及鉴别/选择已成功地操纵的微生物群体，例如以鉴别具有所需基因型和/或表型的微生物群体的分析。

[0642] 用于从亲本群体得到合适利用/产生/分解微生物群体，例如高周转群体的常规方法非常耗时并且费力，并且在工业环境下可能例如花费超过六个月。第一步可能是基因操纵，通过插入转基因的基因操纵例示于下文的论述中。一旦转基因进入微生物，基因的整合位点是随机的，并且转基因的表达可以部分地由周围遗传结构指示。转基因的高表达可能非常合乎需要。任选地，本文提供的方法可以用于加速鉴别/选择合适产生/分解微生物群体的过程。

[0643] 可以筛选大量，例如一池至少或约50,000、40,000、30,000、20,000、10,000、5000、1000或500个微生物群体，以选择少量，例如约或至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、80、100或200个候选群体。

[0644] 任选地，一种或多种策略可以用于改善具有在转录活性位点整合的转基因的微生物

物的产生和/或选择。举例来说,转基因构筑体可以任选地包括一种或多种抗生素抗性基因。如果使用抗生素抗性基因,那么在突变诱发后,可以任选地使用相关抗生素来选择稳定表达转基因构筑体并因此表达抗生素抗性因子的微生物。

[0645] 选择策略,例如本文中提及的策略之一,可以产生具有不同转基因构筑体整合位点、拷贝数目等的异质微生物群体。

[0646] 任选地,可以例如在多孔板中进行一系列的限制稀释以分离均一微生物群体,所述微生物群体可以任选地进行筛选以选择候选微生物群体。

[0647] 任选地,可以更详细和/或在更大规模上评估候选微生物群体以选择一种或多种最终候选物。

[0648] 任选地,本文提供的方法可以用于在得到合适利用/产生微生物群体的此类过程的任何阶段分析微生物。任选地,可以分析转基因和/或一种或多种影响细胞的生长、效率和/或产率的因子的表达。此允许快速选择少量候选物。举例来说,细胞池可以减少大约或至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500或1000倍。

[0649] 因此,任选地,方法可以包括分析多个微生物培养物,每个微生物培养物包含一种或多种微生物群体。此可以任选地包括产生多个谱数据并从所述多个谱数据确定潜在关注利用物质和/或产生/分解所关注物质的微生物培养物的第一亚群。

[0650] 方法可以任选地进一步涉及使用基于液相色谱的分析,例如液相色谱质谱(liquid chromatography mass spectrometry,“LCMS”)分析;液相色谱离子迁移谱(liquid chromatography ion mobility spectrometry,“LCIMS”)分析;液相色谱串联质谱(liquid chromatography tandem mass spectrometry,“LCMS/MS”)分析;先液相色谱后 MS^E 谱(liquid chromatography followed by MS^E spectrometry,“LCMS^E”)分析;先液相色谱后离子迁移分离并接着质谱(liquid chromatography followed by ion mobility separation and then mass spectrometry,“LC-IMS-MS”)分析;和/或先液相色谱后离子迁移分离并接着 MS^E 谱(liquid chromatography followed by ion mobility separation and then MS^E spectrometry,“LC-IMS-MS^E”)分析。此类基于液相色谱的分析可以任选地用于分析微生物培养物的所述第一亚群,例如以产生微生物培养物的第二亚群。任选地,方法可以包含基于谱数据、基于液相色谱的分析数据或谱数据与基于液相色谱的分析数据的组合将细胞群体分类或划分成亚群。

[0651] 然而,本文中提及的敞开式电离质谱和/或离子迁移谱法比基于液相色谱的分析快得多,因此,任选地,方法任选地不涉及例如上文所列的任一基于液相色谱的分析等基于液相色谱的分析的使用。

[0652] 因此,任选地,方法可以用于药物制造和生产的进程中。

[0653] 通常,可以生产极大数目(例如约50,000个)的潜在微生物培养物批料。接着可以对微生物培养物中的每一个进行液相色谱分析(例如LCMS)以便确定就投入完全生产来说最关注的小微生物培养物亚群。

[0654] 但是,应了解,使约50,000个独立的微生物群体批料进行LCMS分析是复杂且费时的过程。

[0655] 本文提供的方法的一个特定优点是本文提供的方法使得实验结果能够基本上即时产生。此外,本文提供的方法适用于自动化并且能够在相对较短时段内依序和/或并行地

分析大量的细胞培养物。当然,有可能以比常规的LCMS方法快若干数量级的时间标度分析约50,000个独立的微生物培养物批料。

[0656] 因此,REIMS和相关电离技术的一种特定应用是在短时段内分析大量微生物培养物的能力。

[0657] 此分析使得大量的微生物培养物(例如50,000个)能够减少到例如仅十个微生物培养物的极小候选列表,接着可以投入全力生产/利用。

[0658] 可替代地,涵盖其它实施例,其中REIMS分析可以对约50,000个批料进行,使得能够建立微生物培养物的第一亚群。微生物培养物的第一亚群可以包含例如大约1000个批料。然后能够对此减少数目的1000个样品进行例如LCMS等液相色谱分析,以确定最有希望投入全力生产的微生物培养物的第二亚群(例如10个)。虽然此替代方法仍然涉及使用液相色谱分析,例如LCMS,但两步过程仍然节省大量时间,因为仅仅需要通过液相色谱分析,例如LCMS分析例如1000个批料(参考按照常规方法约50,000个)。

[0659] 确定或建立一种或多种亚群可以任选地涉及分类和/或物理分离。

[0660] 物质利用/产生/分解和品质控制

[0661] 通过微生物培养,利用、产生和/或分解物质,例如(生物)治疗产品的通用方法可以包括以下步骤中的一或多个:

[0662] 1.建立具有合适微生物培养条件的微生物培养设备;

[0663] 2.用微生物群体,例如以较小规模生长的起子培养物接种;

[0664] 3.使微生物生长

[0665] 4.如果物质的利用/产生/分解不是自动的(例如如果取决于特定温度或养分),那么调整条件以诱导利用/产生/分解;

[0666] 5.监测培养条件并视需要调整;

[0667] 6.监测物质利用/产生/分解;

[0668] 7.如果分泌物质或分解产物,那么从培养基收获物质,如果物质或分解产物积聚在微生物内,那么从微生物收获物质;

[0669] 8.例如通过去除任何污染物来纯化物质。

[0670] 在通过微生物培养利用和/或产生物质的方法期间,可以例如通过本文中描述的方法进行分析,例如用于监测培养条件和/或物质利用/生产。此可以任选地包括从微生物群体获得样品用于分析。技术人员将了解合适的样品获取方法,如移液、使用拭子等。样品可以任选地进行处理,例如液体样品可以如本文中的其它地方所提及进行过滤或处理以产生球粒。任选地,可以使用拭子,它可以任选地在不进一步处理的情况下使用利用REIMS离子源的方法进行分析。

[0671] 任选地,可以对培养条件作出任何调整,例如在分析展现需要调整的情况下。培养物pH值可以例如用pH计测量,并且任选地例如通过视需要添加酸或碱来调节。可以通过分析例如呼吸来监测养分利用。可以分析呼吸商,即二氧化碳释放率与氧气吸收率的比。可以分析代谢产物,例如关注物质、分解产物和/或污染物。

[0672] 因此,任选地,方法可以包括分析,例如监测通过培养微生物群体利用/产生/分解物质的过程。任选地,本发明提供一种通过培养微生物群体利用/产生/分解物质的方法,其中所述方法包括通过本发明的分析方法分析利用/产生/分解过程的步骤。任选地,所述方

法进一步包含基于分析调整培养条件的步骤。

[0673] 因此,方法可以任选地包含分析微生物群体的物质利用、产生和/或分解。提供一种产生和/或分解物质的方法,所述方法包含(a)使用第一装置从目标体外或离体微生物群体产生烟雾、气溶胶或蒸气;(b)对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析,以获得谱数据;以及(c)分析所述谱数据以分析所述目标微生物群体的物质产生和/或分解。还提供了一种鉴别能够利用、产生和/或分解物质的微生物群体的方法,所述方法包含:(a)使用第一装置从目标体外或离体微生物群体产生烟雾、气溶胶或蒸气;(b)对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析,以获得谱数据;以及(c)分析所述谱数据以鉴别能够利用、产生和/或分解物质的微生物群体。

[0674] 这些方法中的任一个可以任选地包含分析所述谱数据以(i)确定所述微生物群体是否利用、产生和/或分解所述物质;(ii)确定所述微生物群体利用、产生和/或分解所述物质的速率;(iii)确定所述微生物群体是否产生任何副产物;和/或(iv)确定所述微生物群体利用、产生和/或分解所述物质的机制。任选地,可以分析两个或更多个微生物群体以确定哪个微生物群体以更高速率和/或以更高纯度利用、产生和/或分解所述物质。任选地,可以分析多个微生物群体并基于所述分析分成2个或更多个亚群。举例来说,可以基于所述分析,将微生物群体基于以下各项划分为亚群:(i)能够或不能利用、产生和/或分解所述物质;(ii)利用、产生和/或分解所述物质的速率;(iii)任何副产物的产生和/或分解;和/或(iv)利用、产生和/或分解的机制。任选地,可以基于分析,将微生物群体划分成:(i)能够利用、产生和/或分解所述物质的第一亚群和不能利用、产生和/或分解所述物质的第二亚群;(ii)第一亚群和第二亚群,其中所述第一亚群以比所述第二亚群高的速率利用、产生和/或分解物质;(iii)第一亚群和第二亚群,其中所述第一亚群不产生副产物,或产生的副产物比所述第二亚群少;和/或(iv)第一亚群和第二亚群,其中所述第一亚群通过与所述第二亚群不同的机制利用、产生或分解所述物质。

[0675] 任选地,方法可以进一步包含使微生物群体或微生物群体亚群在分析方法之前和/或之后经受液相色谱质谱(LCMS)分析的步骤。任选地,基于所述LCMS分析,微生物群体可以分成亚群,或如上文所提及的所述微生物群体亚群可以分成进一步亚群。

[0676] 任选地,可以在适合于利用、产生和/或分解所述物质的条件下培养微生物群体或微生物群体亚群。

[0677] 任选地,方法不包含使微生物群体或微生物群体亚群经受液相色谱质谱(LCMS)分析的步骤。

[0678] 任选地,方法可以用于监测物质的利用和/或产生,尤其监测副产物的产生。这可以包括在各个时间点分析来自微生物群体的样品,如本文中的其它地方所论述。

[0679] 点击化学

[0680] “点击化学”是由夏普利斯(K.B.Sharpless)在2001年引入的术语,用于描述高产率、宽范围、仅产生不用色谱法即可去除的副产物、具立体特异性、易于进行并且能够在易于去除或良性的溶剂中进行的反应。

[0681] 典型点击化学(点击反应)是叠氮化物与乙炔之间的铜催化的1,3-偶极环加成。

[0682] 点击反应可以例如发生在包含炔烃的荧光探针与包含叠氮化物的生物分子之间。

[0683] 因此,点击化学可以用于将所关注的探针或底物连接到特定生物分子,一种称作生物结合的过程。连接荧光团和其它报告分子的可能性已使得点击化学成为鉴别、定位和表征旧生物分子和新生物分子的极强大工具。

[0684] 生物结合的最早和最重要方法之一是在与所关注的生物分子相同的开放阅读框架上表达报告子。值得注意的是,绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,“GFP”)以此方式表达在许多蛋白质的N端或C端。但是,此方法有一些困难。举例来说,GFP是极大的单元,通常会影响到所关注的蛋白质的折叠。此外,通过在一端表达,GFP加合物也会影响所需蛋白质的靶向和表达。最后,使用此方法,GFP只能够附接到蛋白质,并且并非在翻译后,使得无法到达其它重要的生物分子类别(核酸、脂质、碳水化合物等)。

[0685] 为了克服这些挑战,化学家选择通过鉴别生物正交反应搭配物对来进行,因此允许使用小外源分子作为生物分子探针。荧光团能够附接到这些探针之一以在报告分子结合到目标时发出荧光信号-正如GFP在其目标下表达时发荧光一般。

[0686] 任选地,本文提供的方法可以包括监测点击化学反应,例如以检测点击化学反应的最终产物和/或任何副产物。任选地,方法可以与点击化学组合使用,例如在点击化学反应之前或之后。任选地,可以使用所述方法代替点击化学。举例来说,方法可以允许分析通常将通过使用点击化学分析的生物标记物,因此避免了对点击化学反应的需要。

[0687] 疾病

[0688] 分析可以任选地涉及疾病或病状,例如此部分和/或本文其它地方列出的任何疾病或病状。术语“疾病”和“病状”在本文中可互换地使用。举例来说,目标可以是患有疾病的受试者,或来源于此类受试者的样本。

[0689] 疾病可以任选地是损伤、感染、癌症、梗塞、毒素、炎症、伤口部位缺乏适当护理、冻伤、糖尿病和/或动脉硬化或与前述相关。疾病可以任选地是自体免疫病症、发炎性疾病、热带性口炎性腹泻和/或食物不耐受。

[0690] 任选地,它可以是本文中的其它地方提及的任一组织的感染,例如阴道、肺、呼吸道、脑、皮肤和/或胃肠道感染。

[0691] 任选地,它可以是鹅口疮、疟疾、麻疹、脑膜炎、腹泻、支气管炎、咽炎、喉炎、慢性阻塞性肺病(Chronic obstructive pulmonary disease,COPD)、肺炎、败血症和/或囊肿性纤维化。

[0692] 疾病可以任选地是癌症或肿瘤,它可以任选地选自例如癌瘤、肉瘤、白血病、淋巴瘤和神经胶质瘤。疾病可以任选地是坏死,坏死可以任选地是例如凝固性坏死、液化性坏死、干酪样坏死、脂肪坏死、类纤维蛋白坏死和/或坏疽性坏死。

[0693] 更确切地说,疾病可以任选地选自例如哮喘、乳糜泻、胃炎、消化性十二指肠炎、麸质敏感性肠病;过敏症和/或过敏原不耐受,例如牛奶、大豆、树坚果、鸡蛋、小麦、肉、鱼、贝类、花生、种子(例如芝麻、葵花和/或罂粟籽)、大蒜、芥末、芫荽和/或洋葱不耐受;桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis);肠道易激综合症;格雷夫斯病(Graves's disease);反应性关节炎;牛皮癣;多发性硬化症;全身性红斑狼疮(SLE或狼疮);强直性脊柱炎;进行性硬化症(progressive systemic sclerosis,PSS);丝球体肾炎;自体免疫性肠病;IgA缺乏症;常见变异型免疫缺陷病;克罗恩氏病(Crohn's disease);结肠炎,例如淋巴细胞性结肠炎、胶原性结肠炎和/或溃疡性结肠炎;弥漫性淋巴细胞性肠胃炎;溃疡;肠T细胞淋巴瘤。

[0694] 任选地,微生物群体中的一种或多种微生物可能是(i)疾病的病因;(ii)与疾病相关;和/或(iii)加重疾病。

[0695] 诊断和/或治疗

[0696] 任选地,方法可以是一种治疗方法。因此,方法可以任选地包含向有需要的受试者给予治疗有效量的治疗剂的步骤。

[0697] 任选地,方法可以包含如本文中的其它地方所述从受试者中的目标或从受试者获得谱数据并分析谱数据以评估物质、任选地治疗剂或测试物质的效力。任选地,方法可以进一步包含确定受试者是否应接受治疗的步骤。任选地,方法可以进一步包含治疗受试者的步骤。治疗可以任选地用抗微生物剂,例如本文中的其它地方列出的任一抗微生物剂和/或本文中的其它地方列出的任一化合物进行。

[0698] 任选地,方法可以是一种诊断方法。因此,方法可以任选地包含基于所述谱数据的分析作出诊断的步骤。

[0699] 任选地,方法可以包括诊断步骤和治疗步骤。

[0700] 如本文中的其它地方所提到,方法包括分析目标实体,目标实体可以是微生物和/或化合物。在诊断和/或治疗的情况下,目标实体可以例如是病原性微生物和/或毒性因子。

[0701] 如本文所用的术语“诊断(diagnosis)”或“诊断(diagnosing)”和这些术语的派生词是指确定受试者是否患有疾病。任选地,方法可以包括分析目标并且基于以下一或多项,作出受试者是否患有特定疾病的诊断:检测目标实体;鉴别目标实体;检测目标实体的增加;检测目标实体的减少。

[0702] 增加或减少可以参考合适的参考物、比较物或对照物来确定。

[0703] 如本文所用的术语“监测”和这个术语的派生词是指确定是否发生/已发生任何改变。通常,确定随着时间推移,即从先前时间点开始,是否已发生任何改变。改变可以是例如疾病的发展和/或进展,如所提到的任何疾病的发展和/或进展。任选地,方法可以包括分析目标并且基于以下一或多项,监测受试者或疾病:检测目标实体;鉴别目标实体;检测目标实体的增加;检测目标实体的减少。

[0704] 如本文所用的术语“预后”和此术语的派生词是指疾病的严重度或与疾病相关的可能的过程和临床结果的风险预测。因此,如本文所用的术语“预后方法”是指技术人员能够估计和/或确定将出现给定结果的概率的方法。预后相关的结果可以是发病率和/或死亡率。确切地说,预后可以涉及“无进展存活期”(progression-free survival;PFS),它是患有疾病的受试者在疾病不进展的情况下生存的时间长度。因此,PFS可以例如是疗法开始到疾病进展的日期的时间,或从疗法结束到疾病进展的日期的时间。

[0705] 任选地,方法可以包括分析目标并且基于以下一或多项,作出预后:检测目标实体;鉴别目标实体;检测目标实体的增加;检测目标实体的减少。

[0706] “进展(progressing)”或“进展(progression)”和这些术语的派生词意指疾病变得更糟糕,即严重度增加。举例来说,在病原性感染的情况下,它可以意指病原体负荷增加,例如病原体繁殖和/或获得对一种或多种抗微生物剂的抗性。

[0707] 预后可能涉及总存活期。“总存活期”(overall survival;OS)意指患有疾病的受试者在死亡发生之前生存的时间长度。总存活期可以例如定义为从疾病诊断开始直到死亡的时间;治疗开始直到死亡的时间;或治疗结束直到死亡的时间。总存活期通常表示为“总

存活率”，它是在研究组或处理组中经诊断患有，或开始治疗，或结束治疗疾病之后仍然存活某一时段的人的百分比。总存活率可以例如陈述为一年存活率，它是在研究组或处理组中诊断或治疗开始或结束之后存活一年的人的百分比。

[0708] 所属领域的技术人员能够获得关于患有特定类型的疾病的受试者的平均(例如中值、平均值或众数)OS和PFS的统计信息。因此可以确定受试者是否具有或可能具有相比于此类平均值，增加或减少的OS或PFS。

[0709] 确定PFS和/或总存活期的可能性和/或长度减少意指预后不良或不利。术语“不良”和“不利”在本文中可互换地使用。“不良”预后可以被定义为比受试者的参考预后更坏的预后，因此它还可以被称作“更坏”预后，并且“良好”或“非不利”预后可以被定义为比受试者的参考预后更好的预后，因此它还可以被称作“更好”预后。技术人员将了解对于“参考预后”，应该使用患有相同类型疾病，任选地处于疾病相同阶段的受试者。“参考预后”可以通过任何其它合适的方法确定的平均预后或典型预后。

[0710] 不利或更坏预后可以被定义为更短总存活期或增加可能性的更短总存活期和/或更短PFS或增加可能性的更短PFS。

[0711] “消退(regressing/regression)”意指疾病改善，即严重度下降。举例来说，在感染的情况下，它可以意指病原体负荷减少。

[0712] “发展”意指疾病发作。

[0713] 如本文所用的术语“预测(prediction)”或“预测(predicting)”是指确定特定结果的可能性。

[0714] 如本文所用的术语“分层(stratification)”或“分层(stratifying)”是指群体基于指定准则分成亚群。更确切地说，它是指一组受试者基于特定准则分成至少两组，所述特定准则在本发明的情况下包含分析方法的结果或由其组成。任选地，受试者可以分层成可能对特定治疗起反应的受试者和不大可能起反应的受试者；和/或受试者可以基于诊断、预后和/或他们对治疗的反应分层。

[0715] 任选地，方法可以包括分析目标并且基于以下一或多项，将受试者分层：检测目标实体；鉴别目标实体；检测目标实体的增加；检测目标实体的减少。

[0716] 如本文所用的术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是指旨在为个体带来医疗益处的行动过程。治疗可以是防治性或治疗性的。

[0717] 「防治」意指治疗是预防性的，即治疗在疾病发作之前施加。“治疗性”意指治疗在疾病发作之后施加。

[0718] 任选地，方法可以包括分析目标并且基于以下一或多项，确定受试者是否应该接受特定治疗：检测目标实体；鉴别目标实体；检测目标实体的增加；检测目标实体的减少。

[0719] 任选地，方法可以包括分析目标并且基于以下一或多项，确定受试者是否对特定治疗起反应：检测目标实体；识别目标实体；检测目标实体的增加；检测目标实体的减少。

[0720] 任选地，方法可以包括分析目标并且基于以下一或多项，给予受试者特定治疗：检测目标实体；鉴别目标实体；检测目标实体的增加；检测目标实体的减少。

[0721] 治疗可以任选地是用本文中的其它地方列出的任一化合物治疗，例如用抗微生物化合物治疗。

[0722] 因此，任选地，方法可以包含基于谱数据确定或诊断：受试者(i)被微生物感染；

(ii) 被特定类型的微生物感染;和/或 (iii) 被对一种或多种抗微生物剂敏感或具有抗性的微生物感染。

[0723] 确定微生物对哪一种抗微生物剂敏感使得能够确定受试者需要接受哪种治疗和/或受试者需要接受治疗的迫切性。

[0724] 任选地,可替代地或另外,方法可以包含例如基于谱数据,确定或诊断:一受试者或所述受试者 (i) 需要用抗微生物剂治疗;和/或 (ii) 需要用选自所述微生物敏感药剂的抗微生物剂治疗。

[0725] 任选地,可替代地或另外,方法可以包含给予一受试者或所述受试者抗微生物剂,抗微生物剂可以任选地是如通过本文提供的方法确定,引起感染的微生物敏感的抗微生物剂。

[0726] 化合物

[0727] 如本文中的其它地方所论述,经常需要分析化合物。举例来说,方法可以任选地用于 (i) 检测化合物的存在; (ii) 鉴别化合物; (iii) 表征化合物;和/或 (iv) 分析化合物的空间分布。此可以任选地允许例如检测、鉴别和/或表征产生所述化合物的微生物;分析微生物群体对暴露于化合物和/或环境条件的反应;分析化合物的产生和/或分解。

[0728] 举例来说,微生物例如在对物质、环境条件等起反应时所产生的化合物的身份经常未知,因此可能需要分析此类化合物。在发酵的情况下,可能需要分析主要化合物和/或任何副产物的产生。

[0729] 因此,方法可以任选地包括直接或间接分析一种或多种物质。除非另有说明,否则术语“物质”、“化合物”、“分子”和“生物分子”在本文中可互换地使用。

[0730] 如本文中的其它地方所提到,方法还可以任选地包括向受试者,例如患有所述微生物群体感染的受试者给予治疗的步骤。此类治疗步骤可以例如包括给予治疗剂,所述治疗剂可以任选地包含本文中提及的任一物质或由其组成。

[0731] 化合物可以任选地是胞内的和/或胞外的。它可以任选地是内源性的,即微生物群体产生的,和/或外源性的,即加入微生物群体的。

[0732] 化合物可以例如包含生物分子、有机化合物和/或无机化合物或由其组成。任选地,它可以是微生物产生的化合物。它可以任选地是工业废品、污染物、除草剂、杀虫剂、炸药、治疗剂、燃料、食物等等。举例来说,物质可以是生物医药,例如抗体、激素和/或细胞因子。

[0733] 化合物可以任选地包含本文中提及的任一化合物或化合物类别,例如本文中提及的任一生物标记物化合物或由其组成。因此,举例来说,它可以任选地是萜;异戊二烯基酮;固醇;类萜;生物碱;糖苷;表面活性素;2-庚基-3-羟基-4 (1H) -喹诺酮或2-庚基-3,4-二羟基喹啉 (“PQS”或假单胞菌喹诺酮信号);4-羟基-2-庚基喹啉 (“HHQ”);酚,如天然酚;吩嗪;联苯;二苯并呋喃; β -内酰胺;聚酮;鼠李糖脂;心磷脂;磷脂酰甘油酯;磷脂酸 (PA);磷脂酰乙醇胺 (PE);磷脂酰甘油 (PG);磷脂酰胆碱 (PC);磷脂酰肌醇 (PI);磷脂酰丝氨酸 (PS);鞘脂;分枝菌酸;神经酰胺;聚羟基烷酸酯;二酰甘油 (DAG);和/或三酰甘油 (TAG)。

[0734] 任选地,它可以包含以下各项或由以下各项组成:例如脂质,如糖脂或磷脂;碳水化合物;DNA;RNA;蛋白质,例如抗体、酶或激素;多肽,如核糖体肽或非核糖体肽;寡肽;脂蛋白;脂肽;氨基酸;和/或化学分子,任选地有机化学分子。

[0735] 化合物可以任选地是直链、环状或支链。

[0736] 化合物可以任选地是代谢物,如初级或次级代谢物;抗生素;群体感应分子;脂肪酸合酶产物;信息素;蛋白质;肽;和/或生物聚合物。它可以任选地是抗体或激素。

[0737] 化合物可以任选地通过以下官能团中的一或多个表征:醇、酯、烷烃、烯烃、炔烃、醚、酮、醛、酸酐、胺、酰胺、腈、芳香族化合物、羧酸、烷基卤化物和/或羰基。任选地,它可以另外被鉴别为伯、仲或叔,例如伯醇、仲胺等。

[0738] 物质可以任选地是测试试剂或药物。

[0739] 物质可以任选地是已知药物,例如抗癌药物,例如细胞抑制剂和/或细胞毒性剂,它可以任选地选自下文列出的任一物质。

[0740] 物质可以任选地是例如芳香酶抑制剂;抗血管生成剂;微管蛋白结合剂;生脂通路抑制剂;和/或细胞抑制剂;任选地选自烷基化剂、交联剂、插入剂、核苷酸类似物、纺锤体形成抑制剂和/或拓扑异构酶I和/或II的抑制剂。

[0741] 它可以例如是对癌细胞所表达的受体具有特异性的抗体,所述抗体可以任选地结合到化学疗法药物或放射性粒子。

[0742] 抗体可以任选地例如选自HER-2/neu特异性单克隆抗体,如曲妥珠单抗(Trastuzumab)(赫赛汀(Herceptin));阿达木单抗(Adecatumumab)、阿仑单抗(alemtuzumab)、布林莫单抗(Blinatumomab)、贝伐单抗(Bevacizumab)、卡托莫西单抗(Catumaxomab)、西妥木单抗(Cixutumumab)、吉妥珠单抗(Gemtuzumab)、利妥昔单抗(Rituximab)、曲妥珠单抗(Trastuzumab)和/或布突默单抗(lbritumomab)。

[0743] 物质可以任选地是例如蒽环霉素、表鬼臼毒素、放线菌素D(Dactinomycin)、喜树碱、紫杉烷、长春花生物碱、沙罗酚A和/或辛伐他汀(Simvastatin)。

[0744] 细胞毒性抗癌药物(有时称为抗肿瘤药)描述了一组含有对细胞具毒性的化学物质的药物。细胞毒性药物阻止细胞复制和生长,因此适用于治疗癌症。大部分常用的细胞毒性抗癌药物是通过合成化合物和天然产物在基于细胞的细胞毒性分析中的随机高通量筛选而发现的。大部分的化合物是具有低治疗指数的DNA损伤剂。

[0745] 所述物质可以任选地选自例如阿那曲唑(anastrozole);硫唑嘌呤(azathioprine);卡介苗(bcg);比卡鲁胺(bicalutamide);氯霉素(chloramphenicol);环孢菌素(ciclosporin);西多福韦(cidofovir);含煤焦油的产品;秋水仙碱;达那唑(danazol);己烯雌酚(diethylstilbestrol);地诺前列酮(dinoprostone);含蒽三酚的产品;度他雄胺(dutasteride)(dutasteride);雌二醇;依西美坦(exemestane);非那雄胺(finasteride);氟他胺(flutamide);更昔洛韦(ganciclovir);绒毛膜促性腺激素;戈舍瑞林(goserelin);含干扰素的产品(包括聚乙二醇化干扰素);来氟米特(leflunomide);来曲唑(letrozole);乙酸亮丙瑞林(leuprorelin acetate);甲羟孕酮(medroxyprogesterone);甲地孕酮(megestrol);促生育素(menotropin);米非司酮(mifepristone);霉酚酸吗啉乙酯(mycophenolate mofetil);那法瑞林(nafarelin);含雌激素的产品;催产素(包括合成催产素(syntocinon)和麦角新碱(syntometrine));盾叶鬼臼树脂(podophyllin);含孕酮的产品;雷诺昔酚(raloxifene);利巴韦林(ribavarin);西罗莫司(sirolimus);链脲霉素(streptozocin);他克莫司(tacrolimus);他莫昔芬(tamoxifen);鞣固酮;沙立度胺(thalidomide);托瑞米芬(toremifene);曲氟尿苷

(trifluridine);曲普瑞林(triptorelin);缬更昔洛韦(valganciclovir);和/或齐多夫定(zidovudine)。这些物质可以任选地称为非化疗批准的细胞毒性/细胞抑制性药物。

[0746] 所述物质可以任选地选自例如阿地白介素(aldesleukin);阿仑单抗(alemtuzumab);安吡啶(amsacrine);三氧化二砷;天冬酰胺酶(asparaginase);博来霉素(bleomycin);硼替佐米(bortezomib);白消安(busulphan);卡培他滨(capecitabine);卡铂(carboplatin);卡莫司汀(carmustine);西妥昔单抗(cetuximab);苯丁酸氮芥(chlorambucil);顺铂(cisplatin);克拉屈滨(cladribine);环磷酰胺(cyclophosphamide);阿糖胞苷(cytarabine);达卡巴嗪(dacarbazine);放线菌素D;道诺霉素(daunorubicin);达沙替尼(dasatinib);多烯紫杉醇(docetaxel);小红莓(doxorubicin);表柔比星(epirubicin);雌氮芥(estramustine);依托泊苷(etoposide);氟达拉滨(fludarabine);氟尿嘧啶(flourouracil);吉西他滨(gemcitabine);吉妥珠单抗(gemtuzumab);羟基尿素(hydroxycarbamide);艾达霉素(idarubicin);异环磷酰胺(ifosfamide);甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate);伊立替康(irinotecan);洛莫司汀(lomustine);美法仑(melphalan);巯基嘌呤(mercaptopurine);甲氨蝶呤(methotrexate);丝裂霉素(mitomycin);米托坦(mitotane);米托蒽醌(mitoxantrone);奥沙利铂(oxaliplatin);太平洋紫杉醇(paclitaxel);潘他米丁(pentamidine);喷司他汀(pentostatin);丙卡巴肼(procarbazine);雷替曲赛(raltitrexed);利妥昔单抗(rituximab);替莫唑胺(temozolomide);噻替派(thiotepa);拓朴替康(topotecan);曲妥珠单抗(trastuzumab);维达拉丁(vidaradine);长春碱(vinblastine);和/或长春新碱(vincristine)。这些物质可以任选地称为非化疗批准的细胞毒性/细胞抑制性药物。

[0747] 所述物质可以任选地选自例如麦司卡林(Mescaline)、苯环利定(Phencyclidine, PCP)、赛洛西宾(Psilocybin)、LSD、海洛因(Heroin)、吗啡(Morphine)、可待因(Codeine)、右旋苯丙胺(dextroamphetamine)、安非他酮(bupropion)、卡西酮(cathinone)、赖氨酸安非他命(lisdexamfetamine)、阿洛巴比妥(Allobarbitol)、苯烯比妥(Alphenal) (5-烯丙基-5-苯基巴比妥酸)、异戊巴比妥(Amobarbitol)、阿普比妥(Aprobarbitol)、溴烯比妥(Brallobarbitol)、丁巴比妥(Butobarbitol)、布他比妥(Butalbital)、环巴比妥(Cyclobarbitol)、甲苯比妥(Methylphenobarbitol)、甲巴比妥(Mephobarbitol)、美索比妥(Methohexital)、戊巴比妥(Pentobarbitol)、苯巴比妥(Phenobarbitol)、司可巴比妥(Secobarbitol)、他布酮(Talbutal)、硫戊巴比妥(Thiamylal)和/或硫喷妥(Thiopental)。雷尼替丁(Ranitidine)、苯丙氨酸(phenylalanine) PKU、二甲基戊胺、可卡因(cocaine)、安定(diazepam)、雄二烯二酮、豆固酮(stigmastadienone)、雄酮半琥珀酸盐(androsteronehemisuccinate)、5 α -雄甾-3 β ,17 β -二醇-16-酮、雄酮葡萄糖苷酸、表睾酮、6-去氢胆甾烯酮、苯丙氨酸、亮氨酸、缬氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、西他马喹(sitamaquine)、特非那定(terfenadine)、哌唑嗪(prazosin)、美沙酮(methadone)、阿米替林(amitriptyline)、去甲替林(nortriptyline)、哌替啶(pethidine)、多巴(DOPA)、麻黄碱(ephedrine)、布洛芬(ibuprofen)、普萘洛尔(propranolol)、阿替洛尔(atenolol)、醋氨酚(acetaminophen)、苄索氯铵(bezethonium)、西酞普兰(citalopram)、右啡烷(dextrorphan)、太平洋紫杉醇、氯胍(proguanil)、辛伐他汀、舒尼替尼(sunitinib)、替米沙坦(telmisartan)、维拉帕米(verapamil)、阿米替林(amitriptyline)、帕唑帕尼

(pazopanib)、他莫昔芬(tamoxifen)、伊马替尼(imatinib)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、伊立替康(irinotecan)、多西他赛(docetaxel)、拓扑替康(topotecan)、酰基肉碱(acylcarnitine)(C2-C18)、烟碱(nicotine)、可替宁(cotinine)、反式-3'-羟基可替宁、毒藜碱(anabasine)、安非他明(amphetamine)、安非他明类刺激剂(amphetamine-like stimulant)、甲基安非他明(methamphetamine)、MDA、MDMA、MDEA、吗啡、 Δ^9 -THC、他克莫司(tacrolimus)、苄索铵(benzethonium)、甲丙氨酯(meprobamate)、O-去甲基-顺式-曲马多(tramadol)、肌安宁(carisoprodol)、曲马多、去甲西洋(nordiazepam)、EDDP、去氢可酮(norhydrocodone)、氢吗啡酮(hydromorphone)、可待因、替马西洋(temazepam)、去甲羟考酮(noroxycodone)、阿普唑仑(alprazolam)、羟考酮(oxycodone)、丁丙诺啡(buprenorphine)、去丁丙诺啡(norbuprenorphine)、芬太尼(fentanyl)、丙氧芬(propoxyphene)、6-单乙酰吗啡、咖啡因(caffeine)、卡巴多(carbadox)、卡马西平(carbamazepine)、地高辛(digoxigenin)、地尔硫卓(diltiazem)、苯海拉明(diphenhydramine)、普萘洛尔、磺胺嘧啶(sulfadiazine)、磺胺甲噁唑(sulfamethazine)、磺胺噻唑(sulfathiazole)、噻苯唑(thiabendazole)、氯胺酮(ketamine)、去甲氯胺酮(norketamine)、BZE、AMP、MAMP和/或6-MAM。

[0748] 本发明的方法可以任选地涉及使用抗微生物剂,例如以测试抗生素抗性或防止某些微生物的生长,例如防止污染。

[0749] 本发明的方法可以任选地涉及检测和/或表征抗微生物剂、产生抗微生物剂的微生物和/或对抗微生物剂敏感或具抗性的微生物。

[0750] 物质可以例如是抗微生物剂。术语“抗微生物剂”包括抵抗任何类型的微生物的任何药剂。因此,抗微生物剂可以任选地选自抗菌剂、抗病毒剂、抗真菌剂和抗原虫剂。更确切地说,它可以任选地选自氨基糖苷类、 β -内酰胺抗生素、氯霉素(chloramphenicol)、氟喹诺酮(fluroquinolone)、糖肽、林可酰胺(lincosamide)、大环内酯、多粘菌素(polymixin)、利福平(rifampin)、链阳霉素(streptogramin)、磺酰胺、四环素和/或二氨基嘧啶。

[0751] 氨基糖苷类可以任选地选自庆大霉素(gentamicin)、托普霉素(tobramycin)、阿米卡星(amikacin)、链霉素(streptomycin)、卡那霉素(kanamycin)。 β -内酰胺抗生素可以任选地选自青霉素(penicillin),例如甲氧西林(methicillin)、青霉素、阿莫西林(amoxicillin)、安比西林(ampicillin)、卡本西林(carbenicillin)、苯唑西林(oxacillin)或萘夫西林(nafcillin);头孢菌素,例如头孢噻吩(cephalothin)、头孢孟多(cefamandole)、头孢噻肟(cefotaxime)、头孢他啶(ceftazidime)、头孢哌酮(cefoperazone)或头孢曲松(ceftriaxone);卡巴盘尼姆(carbapenem),例如亚胺培南(imipenem)、美罗培南(meropenem)、厄他培南(ertapenem)或多尼培南(ordoripenem);或单酰胺菌素,例如氨曲南(aztreonam)。氟喹诺酮可以任选地选自恩氟沙星(Enrofloxacin)、环丙沙星(ciprofloxacin)、达氟沙星(Danofloxacin)、二氟沙星(Difloxacin)、依巴沙星(lbafloxacin)、马波沙星(Marbofloxacin)、普多沙星(Pradofloxacin)和奥比沙星(Orbifloxacin)。糖肽可以任选地选自万古霉素(vancomycin)、替考拉宁(teicoplanin)和阿伏霉素(avoparcin)。林可酰胺可以任选地选自林可霉素(Lincomycin)、克林达霉素(Clindamycin)和吡利霉素(Pirlimycin)。大环内酯可以任选地选自红霉素(Erythromycin)、泰洛星(Tylosin)、螺旋霉素(Spiramycin)、替米

考星(Tilmicosin)和托拉霉素(Tulathromycin)。多粘菌素可以任选地选自多粘菌素B和粘菌素(多粘菌素E)。利福平可以任选地选自利福平、利福布汀(Rifabutin)和利福喷丁(Rifapentine)。链阳霉素可以任选地选自维吉霉素(Virginiamycin)。磺酰胺可以任选地选自磺胺嘧啶(Sulfadiazine)、磺胺甲基异噁唑(sulfamethoxazole)和磺胺多辛(sulfadoxine)。四环素可以任选地选自氯四环素(Chlortetracycline)、土霉素(oxytetracycline)、去甲基金霉素(demethylchlortetracycline)、罗利环素(rolitetracycline)、石灰环化素(limecycline)、氯莫环素(clomocycline)、甲烯土霉素(methacycline)、多西环素(doxycycline)和米诺环素(minocycline)。二氨基嘧啶可以任选地选自甲氧苄氨嘧啶(Trimethoprim)、阿地普林(Aditoprirn)、巴喹普林(Baquiloprim)和/或奥美普林(Onnetoprim)。

[0752] 所述物质可以例如是抗病毒药物。

[0753] 所述物质可以例如是消炎药,任选地选自例如类固醇、双氯芬酸、布洛芬、萘普生、塞内昔布、甲芬那酸、依托昔布、吲哚美辛和/或阿司匹林。

[0754] 任选地,一种或多种微生物群体可以用已知的抗微生物药物测试。任选地,一种或多种微生物群体可以例如使用一组可能新颖治疗剂或抗微生物药物测试。

[0755] 任选地,一种或多种微生物群体可以进行基因修饰并且修饰过的微生物群体可以用已知抗微生物药物或针对一组可能新颖治疗剂或抗微生物药物进行测试。

[0756] 自动化和/或光学识别

[0757] 任选地,所述方法可以包括自动化。任选地,所述方法可以包括获取样品的光学(或其它)图像,接着(例如光学)识别一种或多种微生物群体,例如菌落,接着对一种或多种微生物群体取样(例如使用第一装置)。任选地,这些步骤中的一或多个步骤,例如所有步骤可以自动化。因此,方法可以任选地包括自动取样,取样可以任选地使用例如REIMS装置进行。任一方法都可以任选地包含使用一次性取样尖端。

[0758] 成像

[0759] 本文提供的方法可以任选地包含确定一种或多种微生物和/或化合物的空间分布。

[0760] 本文提供的方法可以任选地包含确定源自一种或多种微生物的一种或多种分泌物质的空间分布。

[0761] 根据本文中的各个实施例,离子成像可以用于产生目标的一种或多种特性的图像或图谱。此可以如下实现:使用第一装置从目标的多个不同区产生气溶胶、烟雾或蒸气;使来源于不同区域的烟雾、气溶胶或蒸气中的分析物电离以产生分析物离子(或者由此衍生的离子,例如碎片离子);并接着分析分析物离子(或者由此衍生的离子)以获得目标的每个区的谱数据。使谱数据与其所涉及的目标区域(即产生烟雾、气溶胶或蒸气,谱数据所来源的区域)相关以便产生图像或图谱数据。接着能够基于图像或图谱数据产生目标的图像或图谱。举例来说,目标的每个区域的一种或多种特性可以由谱数据来确定并且此可以包括于图像或图谱数据中并因此绘制为目标内的位置的函数。接着图像或图谱数据可以显示给使用者。

[0762] 第一装置可以在目标的多个间隔开的区域之间步进以便从目标的离散区产生气溶胶、烟雾或蒸气。可替代地,多个装置可以用于从目标的离散区域产生气溶胶、烟雾或蒸

气,任选地同时产生。这些多个装置可以不移动跨越目标,但可以与目标接合地移进和移出。可替代地,第一装置可以连续地移动跨越或穿过目标,以便从目标的不同区域产生气溶胶、烟雾或蒸气。第一装置或多个装置的任何移动都可以通过机器自动化和控制。

[0763] 可以分析每个区域的谱数据并转化成代表目标的所述区域的材料的类型、条件或成分的数据。接着代表性数据可以显示为展示材料的类型、条件或成分作为在目标中的位置的函数的图像或图谱。

[0764] 举例来说,代表性数据可以指示目标中的每个区域的微生物和/或化合物的类型、水平、存在和/或不存在。举例来说,谱数据可以用于鉴别和/或显示目标中的感染和/或未感染组织的边缘位置。

[0765] 另外或可替代地,谱数据可以用于鉴别和/或显示所关注的一种或多种微生物类型的位置。

[0766] 代表性数据可以指示目标中微生物和/或化合物的不同类型。

[0767] 另外或可替代地,代表性数据可以指示目标内的一种或多种类型的微生物的存在和/或分布。

[0768] 另外或可替代地,代表性数据可以指示目标内的一种或多种类型的化合物的存在和/或分布。

[0769] 另外或可替代地,代表性数据可以指示目标中的生物标记物的类型或水平,并且可以鉴别和/或显示目标内的生物标记物的类型或水平的分布。

[0770] 离子成像和图谱数据可以实时产生和/或显示。此适用于例如确定外科手术期间将采取的行动。第一装置和/或另一工具的至少一部分相对于目标的位置可以例如实时显示在图像或图谱上。举例来说,例如用于切除或烧蚀组织的工具等手术工具的位置可以显示在目标的图谱上。此使外科医生能够基于图像或图谱中显示的代表性数据选择性地切除或烧蚀组织。

[0771] 离子成像质谱技术,如DESI-MS和/或REIMS技术,可以任选地用于获得目标的不同区域的谱数据。REIMS技术装置可以任选地以切割和/或指向模式使用。

[0772] 此离子成像分析可以任选地与目标的另一分析组合。其它分析方法和工具的细节提供于本文中的其它地方。任选地,质谱成像的结果可以与另一分析的结果相关。

[0773] 下文中参考DESI成像的特定实例论述关于如何执行离子成像的更多细节。应了解,论述的特定参数是本发明人用于分析中的参数,并且这些参数中的任一个都可以变化。

[0774] 例如组织切片或涂抹到标准玻璃显微镜载玻片的表面上的微生物等样本使用Exactive质谱仪(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific Inc.),德国不来梅(Bremen,Germany))进行DESI-MS成像分析。Exactive仪器参数在下表中列出。

[0775] 用于DESI-MS成像的赛默Exactive仪器参数

	参数	设置
	极性	负
	分辨率	100,000
	质量范围	200-1050
	喷雾电压	- 4.5kV
[0776]	毛细管温度	250℃
	毛细管电压	- 50V
	管透镜电压	- 150V
	撇渣器电压	- 24V
	最大注射时间	1000ms
	微扫描	1
	AGC 目标	5e6

[0777] 甲醇/水 (95:5v/v) 用作电喷雾溶剂,流动速率是1.5μL/min。氮N4.8用作雾化气体,压力是7巴。所有使用的溶剂都是LC-MS级 (Chromasolv,美国密苏里州圣路易斯的西格玛阿尔德里奇 (SigmaAldrich, St Louis, MO, USA))。DESI喷雾器与样品表面之间的高度距离设定为2mm并且喷雾器与嗅探器之间的距离设定为14mm。样品表面与质谱仪的入口毛细管之间的距离<<1mm。喷雾器尖端与样品表面之间的角度设定为80°。入口毛细管与样品之间的收集角设定为10°。

[0778] 作为使用DESI MS的成像方法的基础的通用原理是并非如逐点取样,水平直线扫描是在样本表面上,通过以在质谱仪需要完成一次扫描(获取一个质谱)的时间内覆盖确定为像素(空间分辨率)的区域的速度移动自动化取样平台来执行。此产生每行一个文件的所得图像(行数通过样品高度除以空间分辨率确定)。

[0779] 对于图像分析,个别水平直线扫描使用imzML转换器1.1.4.5版(www.maldivmsi.org)转换成imzML文件。单离子图像和RGB图像使用MSiReader 0.05版(146)以线性插值法(1阶)和0.005Da面元大小产生。

[0780] 培养基

[0781] 微生物群体可以是微生物培养物,因此它可以维持在培养基中。培养基可以任选地包含复杂组分,如血液或其衍生物,例如血清,或是无血清的成分确定的培养基。除非需要测试与培养基相关的环境因素,否则培养基可以任选地无菌、等张、具有合适的pH值和/或包含微生物群体所需的所有矿物质和养分。

[0782] 微生物可以任选地在固体培养基上培养并且它可以任选地直接从其固体培养基上取样。应了解在所属领域中术语“固体培养基”用以指非液体,它可以例如是真正固体或凝胶形式。

[0783] 微生物可以任选地在液体培养基中培养并且它可以任选地如本文中的其它地方所论述进行加工以提供固体样品。

[0784] 培养基可以任选地包含矿物质;养分;指示剂,例如酚红;和/或选择剂,例如特定抗生素。

[0785] 培养基可以例如任选地包含血液、血清、碳水化合物和/或酵母提取物。

[0786] 固体培养基可以任选地包含凝固剂或基质,所述凝固剂或基质选自:琼脂,它是一种可以从一组红紫色海藻中提取的藻胶;木薯淀粉;甲基纤维素;胶原蛋白基质;或任何其

它合适的聚合物。琼脂可以例如任选地以1-2%的最终浓度用于凝固培养基。

[0787] 培养基可以例如任选地选自任一以下通常已知的培养基的液体或固体(例如琼脂)形式:卢里亚贝尔塔尼(Luria Bertani, LB)、脑心浸液、哥伦比亚马血、巧克力、米勒-辛顿(Mueller-Hinton)、胰酶大豆、氨曲南、布拉泽培养基(Braziers media)、苛求厌氧生物、曙红亚甲基蓝、甘露糖醇盐和/或麦康凯(MacConkey)。

[0788] 可以将以下培养基组分中的一或多个任选地最佳化或改变:(i)养分,可以将养分最佳化以包括充足水平的所有必需养分,或可以改变例如到一种或多种养分的水平不充足;矿物质,可以将矿物质最佳化以包括充足水平的所有必需矿物质,或可以改变例如到一种或多种矿物质的水平不充足;(ii) pH值;(iii) 温度;和/或(iv)微生物群体暴露的例如氧气和/或CO₂等气体的水平。最佳培养条件将取决于微生物的类型。例如,病原性微生物可以具有约30-37℃的最佳生长温度,而嗜热性微生物可以具有更高的最佳生长温度。

[0789] 养分

[0790] 微生物群体需要养分来存活和/或生长。因此,一种或多种适合的养分可以用于培养微生物群体。任选地,可以使用不同养分的混合物,例如包含下文列出的一种或多种养分的混合物。如本文中的其它地方所论述,可以改变任何养分的类型和/或水平,例如当分析环境条件的影响时。

[0791] 任何养分都可以任选地是重同位素养分。

[0792] 合适的养分是熟知的,但养分可以任选地包含例如碳水化合物或由其组成,任选地选自单糖、双糖、寡糖和/或多糖。它可以任选地选自蔗糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖、淀粉、乳糖、半乳糖、乳果糖和/或海藻糖。

[0793] 养分可以任选地包含例如氨基酸、肽、多肽或蛋白质或由其组成,任选地选自必需氨基酸、非必需氨基酸和/或包含一种或多种必需和/或非必需氨基酸的肽、多肽或蛋白质。必需氨基酸可以选自苯丙氨酸、缬氨酸、苏氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸和/或组氨酸。任选地,养分可以是谷氨酰胺。

[0794] 养分可以任选地包含维生素,例如维生素A、B、C、D或E,或由其组成。

[0795] 养分可以任选地包含脂质,例如脂肪酸、卵磷脂和/或固醇,或由其组成。

[0796] 流式细胞测量术

[0797] 任选地,方法可以另外包括流式细胞测量术的步骤,例如在质量和/或离子迁移率谱分析之前和/或之后。举例来说,方法可以任选地在先前通过流式细胞测量术分析的微生物群体上进行,例如它可以任选地在通过荧光辅助细胞分选(fluorescence-assisted cell sorting, "FACS")进行分选的微生物亚群上进行。

[0798] 任选地,方法可以包含事先将标记的微生物与未标记的微生物分离成第一与第二亚群,任选地标记和未标记的亚群。此分离可以任选地在产生谱数据之前和/或之后。因此,任选地,目标可以是微生物群体的亚群,其中亚群已使用流式细胞测量术,例如FACS产生。

[0799] 任选地,所述分离标记的微生物与未标记的微生物的步骤可以在执行本文提供的方法之前进行。任选地,(i)所述亚群中的至少一个可以通过根据前述技术方案中任一项所述的方法直接分析;(ii)至少一个亚群可以直接引入质谱仪和/或离子迁移谱仪中;和/或(iii)FACS装置可以任选地直接连接到任选地如本文中的其它地方所定义的装置,例如质谱仪和/或离子迁移谱仪。

[0800] 在生物技术中,流式细胞测量术是一种用于例如细胞计数、细胞分选、生物标记物检测和蛋白质工程中的基于激光的生物物理学技术。流式细胞测量术可以任选地用于例如分析微生物细胞表面和/或细胞内分子的表达、表征和/或鉴别异质微生物群体中的不同微生物类型、评估分离亚群的纯度和/或分析细胞尺寸和体积。它允许单一微生物细胞的同步多参数分析。

[0801] 它尤其可以用于测量结合于特定细胞相关分子的配体所产生的荧光强度,所述配体例如 (i) 荧光标记的抗体检测蛋白质;或 (i i) 结合于DNA的碘化丙锭。

[0802] 染色程序可以包括从微生物培养物或样品制造单细胞悬浮液。微生物接着可以例如在管和/或微量滴定板中与未标记或荧光染料标记的抗体一起培育。微生物可以悬浮于流体流中并经过电子检测设备。

[0803] 流式细胞仪能够每秒分析几千个粒子。流式细胞仪包含流动池,其中液流携带细胞并将细胞对齐以使其成一系列纵队穿过光束以进行感应。可以测量细胞的阻抗或传导性和细胞的各种光学特性。

[0804] 流式细胞测量术虽然常规用于健康病症,尤其血癌的诊断,但在基础研究、临床实践和临床试验中具有许多其它应用。常见变化是基于粒子的特性将粒子物理分类,以便例如通过荧光辅助细胞分选(“FACS”)来纯化所关注的群体。

[0805] 荧光激活细胞分选(FACS)是一种基于每个细胞的特定光散射和荧光特征将例如微生物细胞等生物细胞的异质混合物分选到两个或更多个容器的方法,一次一种细胞。因此,FACS允许将细胞的异质混合物物理分选成2个或更多个不同的亚群。

[0806] 如上所述,微生物细胞可以用对特定细胞标记物具有特异性的荧光标记来标记。如果细胞群体对于所述标记物来说是异质的,那么将仅标记细胞的标记物阳性亚群。

[0807] 接着FACS设备可以用于分选细胞。细胞悬浮液夹带于狭窄的快速流动的液体流的中央。所述流被布置成使细胞之间的间隔相对于其直径来说较大。振动机构使得细胞流分解成个别小滴。系统经过调节以使得每个小滴超过一个细胞的机率较低。在所述流即将分解成小滴时,所述流穿过荧光测量台,在所述荧光测量台中测量每个细胞的所关注的荧光特征。充电环恰好置于所述流分解为小滴的点。电荷基于刚刚先前的荧光强度测量置于环上,并且相反电荷在小滴从所述流分解时捕获于小滴上。带电小滴接着穿过静电偏转系统落下,所述系统基于小滴的电荷将小滴转移到容器中。在一些系统中,电荷直接施加到所述流,并且分解的小滴保留与所述流相同符号的电荷。所述流接着在小滴分解之后返回到中性。

[0808] 荧光标记

[0809] 任选地,一或多个微生物细胞上或内的分子可以进行标记。标记可以例如是荧光标记。

[0810] 下表详述用于免疫荧光显微术的荧光染料的列表:

[0811]

荧光染料	激发 (nm)	发射 (nm)
AMCA	347	445
Alexa Fluor 350	345	440
Alexa Fluor 488	488	520

Cy2	492	510
Fluorescein	496	518
Bodipy-FL	503	511
TRITC	544	572
Cy3	550	570
LRSC	572	590
若丹明红 (Rhodamine Red) -X	570	590
德克萨斯红 (Texas Red)	596	620
Cy5	650	670
Alexa Fluor 647	650	668

[0812] 其中AMCA是氨甲基香豆素乙酸,Cy2是花青,Fluorescein是异硫氰酸荧光素,TRITC是异硫氰酸四甲基若丹明,Cy3是吲哚花青,LRSC是丽丝胺若丹明磺酰氯并且Cy5是吲哚二碳花青。

[0813] 其它分析工具

[0814] 本发明的任一方法可以任选地包括使用一种或多种额外分析工具检测、鉴别和/或表征微生物的步骤。此类工具可以例如选自显微镜检查;革兰氏染色;检查微生物群落或个别微生物的形态;核酸分析,例如使用限制酶、杂交、聚合酶链反应 (PCR) 扩增和/或定序;形态检查;针对养分需求和/或抗微生物剂敏感性的基于培养物的筛选;脂肪酸分布分析;和/或测试抗原。虽然此类工具是所属领域中众所周知的,但简要细节提供于下文中。

[0815] 显微镜检查可以例如任选地涉及例如通过将一滴含微生物的溶液放到载玻片上或通过将来自微生物群落或其它含微生物的物质的样品连同一滴水涂抹到载玻片上来将微生物样品安装在显微镜载玻片上。

[0816] 革兰氏染色可以例如任选地包括例如通过将载玻片轻缓地移过热源,例如本生燃烧器 (Bunsen-burner) 来将微生物样品热固定在显微镜载玻片上。接着可以施加染料,通常是结晶紫。此染料通常穿过革兰氏阳性与革兰氏阴性细胞的细胞壁和细胞膜并将细菌细胞染成紫色。接着可以加入碘。碘充当媒染剂和捕获剂。媒染剂是一种通过结合于初染剂,因此形成截留在细胞壁中的不溶复合物,来增加细胞壁对染色剂的亲和力的物质。在革兰氏染色反应中,结晶紫和碘形成不溶复合物,所述复合物用以将刮片变成暗紫色。在此阶段,所有细胞将变成紫色。接着可以加入例如95%乙醇等合适醇或丙酮以溶解革兰氏阴性细菌的脂质外膜,因此暴露肽聚糖层并增加细胞壁的孔隙率。然后从革兰氏阴性细菌的薄肽聚糖层洗掉结晶紫-碘复合物,使其无色。相比之下,在革兰氏阳性细菌中,结晶紫-碘复合物紧紧结合到多层高度交联的革兰氏阳性细胞壁中,因此将细胞染成紫色。任选地,然后用合适的复染剂使任何脱色的革兰氏阴性细胞可见,复染剂例如带正电的番红精,它将革兰氏阴性细胞染成粉红色。

[0817] 核酸分析可以任选地涉及分离和纯化DNA和/或RNA。

[0818] 通过PCR扩增的核酸分析可以例如任选地包括使用统一或物种特异性引物将例如细菌16S rRNA基因等合适基因的全部或部分扩增。可以任选地分析的合适基因的其它实例可替代地或另外包括例如物种特异性基因或毒性基因,例如志贺样毒素 (Shiga toxin, stx)、紧密粘附素 (eae)、鞭毛H-抗原基因fliC-fliA、hsp65、rpoB和/或recA。对于真菌,内

部转录间隔区 (ITS) 的全部或一部分的PCR扩增尤其适合。

[0819] 利用限制酶的核酸分析可以例如任选地涉及限制性片段长度多态性 (restriction-fragment length polymorphism; RFLP) 分析。RFLP是一种利用同源DNA序列的长度变化的技术。RFLP分析可以涉及限制性消化, 即DNA与如BamHI、HindIII或EcoRI等合适限制酶一起培育。每种限制酶能够识别和切割特定短核酸序列。接着所得DNA片段可以例如通过琼脂糖凝胶电泳按长度分离。凝胶中的DNA片段可以任选地例如用溴化乙锭染色, 并且可以测定不同长度的片段的图案。

[0820] 任选地, DNA片段可以通过DNA印迹程序转移到膜。接着膜可以暴露于标记的DNA探针以允许进行杂交。标记可以例如是或包含放射性同位素或地高辛 (digoxigenin, DIG)。接着可以洗掉任何未杂交的探针。接着可以检测标记并且可以测定杂交到标记探针的片段的图案。

[0821] 定序可以例如任选地涉及双脱氧或链终止方法。在此方法中, DNA可以用作模板来产生一组彼此长度相差单个碱基的片段。接着片段可以按尺寸分离, 并且可以鉴别末端处的碱基, 重建DNA的原始序列。

[0822] 杂交分析可以例如任选地包括来自第一微生物的一或多个所选DNA片段、基因或全基因组DNA与标记DNA探针的DNA-DNA杂交以确定第一微生物与已知或比较微生物之间的遗传相似性。杂交分析可以例如涉及如上文所述, 通过DNA印迹程序将DNA转移到膜、标记和检测。

[0823] 微生物的脂肪酸分布分析可以例如任选地使用气相色谱联合火焰电离检测器 (GC-FID) 或高效液相色谱 (high performance liquid chromatography; HPLC) 进行。

[0824] 关于菌落形态, 可以例如任选地检查以下各项中的一种或多种: 尺寸; 整体菌落形状, 形状可以例如是圆形、不规则或根状; 菌落边缘, 边缘可以例如是平滑、丝状或波状; 高程, 它可以例如是平坦、升高、凸状或漏斗状; 表面, 表面可以例如是起皱、粗糙、蜡质或反光的; 不透明度, 它可以例如是透明、半透明或不透明; 色素沉着; 颜色, 颜色可以例如是红色、黄色或白色; 和/或水溶性。

[0825] 关于个别微生物的形态, 此可以例如任选地确定为球菌 (球形)、杆菌 (杆状)、螺旋菌 (扭转) 或多形的。球菌可以任选地是单球菌、双球菌、链球菌、四联球菌、八联球菌或葡萄球菌。杆菌可以任选地是单杆菌、双杆菌、链杆菌或球杆菌。螺旋菌可以任选地是弧菌、螺旋状菌或螺旋体。

[0826] 针对养分需求的基于培养物的筛选可以任选地涉及将微生物接种到一种或多种不同生长培养基, 如不同选择性培养基之上或之中, 并且观测在哪个培养基里面/上面出现微生物生长, 以及不同培养基之间的生长差异程度。

[0827] 针对抗微生物剂敏感性的基于培养物的筛选可以任选地涉及将微生物接种到一种或多种不同生长培养基上, 此可以例如通过将微生物划线或涂铺到含有适合的养分琼脂的皮氏培养皿上而进行。接着可以加入抗微生物剂, 此可以例如通过将浸渍有抗微生物剂的滤纸盘放到生长培养基上而进行。各含有不同抗微生物剂的若干个盘可以加入单个皮氏培养皿上。接着可以确定是否在盘中的任一个周围出现生长抑制区, 并且如果是, 那么确定此区的大小。

[0828] 针对抗原的测试还可以被称作血清分型。尤其微生物的细胞表面上的特定抗原的

存在可以通过使用特异性抗体来测试。抗体可以是多克隆或单克隆的。测试可以任选地涉及仅检测存在或不存在凝集,即形成微生物与抗体的复合物。可替代地或另外,抗体可以经标记并且分析可以涉及例如酶联免疫吸附分析(“ELISA”)和/或荧光激活细胞分选(“FACS”)。

[0829] 以下阐述其它方面和实施例。

[0830] 根据一方面,提供了一种离子成像的方法。所述方法包括使用快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置对已经培养到培养基上的细菌和/或真菌样品的多个不同位置自动取样;获得对应于每个位置的谱数据;以及使用所得谱数据鉴别每个位置处的一种或多种细菌菌株和/或一种或多种真菌菌株。

[0831] 任选地,方法可以另外包括流式细胞测量术的步骤,例如在质量和/或离子迁移率谱分析之前和/或之后。举例来说,方法可以任选地在先前通过流式细胞测量术分析的细胞群体上进行,例如它可以任选地在通过荧光辅助细胞分选(“FACS”)进行分选的细胞亚群上进行。

[0832] 斯特里特马特(Strittmatter)公开了一种手动方法,其中如第6556页上所描述,呈钳子形式的两个手持式电极用作取样探针。斯特里特马特未公开自动取样的方法。

[0833] WO 2010/136887 (塔卡特(Takats))未公开对进行培养的培养基上的不同位置自动取样。

[0834] 使用具有癌转移和细菌菌株的人肝脏的样品证实根据一个实施例的方法,所述菌株在固体培养基上培养,属于物种绿脓杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌。对于两个样品类型,获得空间分辨的谱信息,使得健康/癌性肝脏组织之间和细菌物种之间清晰可识别的多变量聚类。

[0835] 培养基可以包含基于琼脂的培养基、碳水化合物基质或如本文中的其它地方所论述的另一固体生长培养基。

[0836] 所述方法可以进一步包含确定源自己已经在所述培养基上培养的一种或多种细菌菌落和/或真菌菌落的一种或多种分泌物质的空间分布。

[0837] 所述一种或多种分泌物质可以选自本文中的其它地方论述的任一化合物,任选地,更确切地说,由以下各项组成的群组:(i)一种或多种代谢物;(ii)一种或多种初级代谢物;(iii)一种或多种次级代谢物;(iv)一种或多种脂肽;(v)表面活性素;(vi)一种或多种群体感应分子;(vii)2-庚基-3-羟基-4(1H)-喹诺酮或2-庚基-3,4-二羟基喹啉(“PQS”或假单胞菌属喹诺酮信号);(viii)4-羟基-2-庚基喹啉(“HHQ”);(ix)一种或多种抗生素;(x)一种或多种生物碱;(xi)一种或多种萜类化合物;(xii)一种或多种糖苷;(xiii)一种或多种天然酚类;(xiv)一种或多种吩噻;(xv)一种或多种联苯和二苯并呋喃;(xvi)一种或多种 β -内酰胺;(xvii)一种或多种聚酮化合物;(xviii)一种或多种脂肪酸合酶产物;(xix)一种或多种非核糖体肽;以及(xx)一种或多种核糖体肽。

[0838] 对细菌和/或真菌样品的多个不同位置自动取样的步骤可以包含使用一次性尖端取样。

[0839] 根据另一方面,提供了一种离子成像器。所述离子成像器包括快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置,它被布置成对已经培养到培养基上的细菌和/或真菌样品的多个不同位置自动取样;以及质量分析器,它被布置和调适用于:(i)获得对应于每个位置的谱数据;以及

(ii) 使用已获得的谱数据鉴别每个位置的一种或多种细菌菌株和/或一种或多种真菌菌株。

[0840] 培养基可以包含基于琼脂的培养基、碳水化合物基质或另一固体生长培养基。

[0841] 所述离子成像器可以被布置和调适用于确定源自己已经在培养基上培养的一种或多种细菌菌落和/或真菌菌落的一种或多种分泌物质的空间分布。

[0842] 所述一种或多种分泌物质可以选自由以下各项组成的群组：(i) 一种或多种代谢物；(ii) 一种或多种初级代谢物；(iii) 一种或多种次级代谢物；(iv) 一种或多种脂肽；(v) 表面活性素；(vi) 一种或多种群体感应分子；(vii) 2-庚基-3-羟基-4(1H)-喹诺酮或2-庚基-3,4-二羟基喹啉(“PQS”)或假单胞菌属喹诺酮信号)；(viii) 4-羟基-2-庚基喹啉(“HHQ”)；(ix) 一种或多种抗生素；(x) 一种或多种生物碱；(xi) 一种或多种萜类化合物；(xii) 一种或多种糖苷；(xiii) 一种或多种天然酚类；(xiv) 一种或多种吩嗪；(xv) 一种或多种联苯和二苯并呋喃；(xvi) 一种或多种 β -内酰胺；(xvii) 一种或多种聚酮化合物；(xviii) 一种或多种脂肪酸合酶产物；(xix) 一种或多种非核糖体肽；以及(xx) 一种或多种核糖体肽。

[0843] 所述离子成像器可以被布置和调适用于使用一次性尖端对细菌和/或真菌样品的多个不同位置自动取样。

[0844] 根据另一方面,提供了一种快速蒸发电离质谱(“REIMS”)方法。所述方法包括使用REIMS电离源针对生物液体中细菌的存在或不存在分析生物液体。

[0845] 所述生物液体可以选自由以下各项组成的群组：(i) 血液；(ii) 尿；(iii) 唾液；(iv) 痰液；或(v) 血清。

[0846] 方法可以进一步包含使用一次性取样尖端对生物液体取样。

[0847] 方法可以进一步包含抽吸或传送生物液体穿过过滤介质。

[0848] 方法可以进一步包含分析过滤介质上在抽吸或传送生物液体穿过过滤介质后残留的残留物。

[0849] 根据另一方面,提供了一种设备。所述设备包含快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置,所述装置被布置和调适用于针对生物液体中细菌的存在或不存在分析生物液体

[0850] 所述生物液体可以选自由以下各项组成的群组：(i) 血液；(ii) 尿；(iii) 唾液；(iv) 痰液；或(v) 血清。

[0851] 所述设备可以进一步包含一次性取样尖端以对生物液体取样。

[0852] 所述设备可以进一步包含被布置和调适用于抽吸或传送所述生物液体穿过过滤介质的装置。

[0853] 所述设备可以进一步包含被布置和调适用于分析所述过滤介质上在抽吸或传送所述生物液体穿过所述过滤介质后残留的残留物的分析器。

[0854] 根据另一方面,提供了一种方法。所述方法包括:获得基质的光学图像并基于所述光学图像,确定一或多个关注区域是否存在于所述基质上;其中如果确定存在一或多个关注区域,那么所述方法进一步包含以下步骤:(i) 使用快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置对至少一个确定的关注区域内的至少一个位置自动取样并获得对应于所述至少一个位置的谱数据;以及(ii) 使用所述已获得的谱数据鉴别所述一或多个位置上的一种或多种细菌菌株和/或一种或多种真菌菌株。

[0855] 基质可以包含食品。

[0856] 根据另一方面,提供了一种设备。所述设备包括:快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置;被布置和调适用于获得基质的光学图像的装置;以及控制系统,其被布置和调适用于:(i)基于所述光学图像确定一或多个关注区域是否存在于所述基质上,其中如果确定一或多个关注区域存在,那么所述控制系统被进一步布置和调适用于:(ii)使用所述快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置对至少一个确定的关注区域内的至少一个位置自动取样并获得对应于所述至少一个位置的谱数据;以及(iii)使用所述已获得的谱数据鉴别所述一或多个位置上的一种或多种细菌菌株和/或一种或多种真菌菌株。

[0857] 基质可以包含食品。

[0858] 根据另一方面,提供了一种离子成像的方法。所述方法包括:将细菌和/或真菌样品分配到培养基上,其中一种或多种抗生素和/或抗真菌物质包埋在所述培养基内和/或所述培养基上;使用快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置对已经在培养基上培养的所述细菌和/或真菌样品的多个不同位置自动取样;获得对应于每个所述位置的谱数据;以及从所述谱数据确定关于所述样品对所述一种或多种抗生素和/或抗真菌物质的抗性或其它方面的信息。

[0859] 根据另一方面,提供了一种离子成像器。所述离子成像器包括:快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置;以及控制系统,其被布置和调适用于:(i)使用快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置对已经在培养基上培养的细菌和/或真菌样品的多个不同位置自动取样,其中一种或多种抗生素和/或抗真菌物质包埋在所述培养基内和/或所述培养基上;(ii)获得对应于每个位置的谱数据;以及(iii)从所述谱数据确定关于所述样品对所述一种或多种抗生素和/或抗真菌物质的抗性或者其它方面的信息。

[0860] 根据另一方面,提供了一种离子成像的方法。所述方法包括:使用快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置对样品上的多个不同位置自动取样;以及获得对应于每个位置的谱数据;以及使用已获得的谱数据构筑、训练或改良样品分类模型。

[0861] 根据一个实施例,样品可以包含生物样品、生物组织、人体组织、动物组织、一种或多种细菌菌株或一种或多种真菌菌株。

[0862] 可以使用包含生物样品分类模型、生物组织分类模型、人体组织分类模型、动物组织分类模型、细菌菌株分类模型或真菌菌株分类模型的样品分类模型。

[0863] 方法可以进一步包含任选地在从样品上的至少一些位置获得谱数据之前、任选地在获得谱数据期间及视情况在获得谱数据之后,相对于REIMS装置自动平移样品。

[0864] REIMS装置可以包含一或多个电极或一或多个电外科尖端。

[0865] 一或多个电极或一或多个电外科尖端可以包含单极装置。

[0866] 根据一个实施例,可以提供单独的返回电极。

[0867] 一或多个电极或一或多个电外科尖端可以包含双极装置。

[0868] 在样品上的多个不同位置自动取样的步骤可以进一步包含向一或多个电极或一或多个电外科尖端施加RF电压。

[0869] RF电压可以具有选自以下组成的群组的振幅、峰间电压或RMS电压:(i)约<100V;(ii)约100-200V;(iii)约200-300V;(iv)约300-400V;(v)约400-500V;(vi)约500-600V;(vii)约600-700V;(viii)约700-800V;(ix)约800-900V;(x)约900-1000V;以及(xi)

约>1kV。

[0870] RF电压可以具有选自由以下各项组成的群组的频率：(i) <约1kHz (ii) 约1-2kHz；(iii) 约2-3kHz；(iv) 约3-4kHz (v) 约4-5kHz；(vi) 约5-6kHz；(vii) 约6-7kHz；(viii) 约7-8kHz；(ix) 约8-9kHz；(x) 约9-10kHz；(xi) 约10-20kHz；(xii) 约20-30kHz；(xiii) 约30-40kHz；(xiv) 约40-50kHz；(xv) 约50-60kHz；(xvi) 约60-70kHz；(xvii) 约70-80kHz；(xviii) 约80-90kHz；(xix) 约90-100kHz；(xx) 约100-200kHz；(xxi) 约200-300kHz；(xxii) 约300-400kHz；(xxiii) 约400-500kHz；(xxiv) 约500-600kHz；(xxv) 约600-700kHz；(xxvi) 约700-800kHz；(xxvii) 约800-900kHz；(xxviii) 约900-1000kHz；(xxix) 约1-2MHz；以及 (xxx) 约>2MHz。

[0871] 方法可以进一步包含抽吸由样品产生的分析物、烟雾、烟气、液体、气体、手术烟雾、气溶胶或蒸气。

[0872] 方法可以包含以基本上脉冲方式抽吸分析物、烟雾、烟气、液体、气体、手术烟雾、气溶胶或蒸气。

[0873] 方法可以包含基本上仅在电外科电压或电位供应到一或多个电极或一或多个电外科尖端时抽吸分析物、烟雾、烟气、液体、气体、手术烟雾、气溶胶或蒸气。

[0874] 方法可以包含在手术、非手术或其它程序过程期间改变抽吸占空比。

[0875] 方法可以包含将分析物、烟雾、烟气、液体、气体、手术烟雾、气溶胶或蒸气传送到质谱仪的真空室中。

[0876] 方法可以包含使至少一些分析物、烟雾、烟气、液体、气体、手术烟雾、气溶胶或蒸气撞击在位于质谱仪的真空室内的碰撞表面。

[0877] 在撞击碰撞表面时可以使至少一些分析物、烟雾、烟气、液体、气体、手术烟雾、气溶胶或蒸气电离，从而形成分析物离子。

[0878] 方法可以包含加热碰撞表面。

[0879] 加热碰撞表面的步骤可以包含将碰撞表面加热到选自由以下各项组成的群组的温度：(i) 约<100℃；(ii) 约100-200℃；(iii) 约200-300℃；(iv) 约300-400℃；(v) 约400-500℃；(vi) 约500-600℃；(vii) 约600-700℃；(viii) 约700-800℃；(ix) 约800-900℃；(x) 约900-1000℃；(xi) 约1000-1100℃；以及 (xii) 约>1100℃。

[0880] 方法可以包含对分析物离子进行质量分析。

[0881] 方法可以包含将基质添加到分析物、烟雾、烟气、液体、气体、手术烟雾、气溶胶或蒸气中。

[0882] 基质可以在分析物、烟雾、烟气、液体、气体、手术烟雾、气溶胶或蒸气撞击在碰撞表面上之前加入分析物、烟雾、烟气、液体、气体、手术烟雾、气溶胶或蒸气中。

[0883] 基质可以选自由以下各项组成的群组：(i) 分析物、烟雾、烟气、液体、气体、手术烟雾、气溶胶或蒸气的溶剂；(ii) 有机溶剂；(iii) 挥发性化合物；(iv) 极性分子；(v) 水；(vi) 一种或多种醇；(vii) 甲醇；(viii) 乙醇；(ix) 异丙醇；(x) 丙酮；以及 (xi) 乙腈。

[0884] 基质可以包含质量锁或校准化合物。

[0885] 方法可以包含以切割操作模式操作REIMS装置，其中REIMS装置在样品中形成一或多个基本上连续的切口。

[0886] 方法可以包含维持REIMS装置在基本上相同的高度下，同时在样品中执行一或多

个基本上连续的切割。

[0887] 方法可以包含维持REIMS装置与样品基本上连续接触,同时在样品中执行一或多个基本上连续的切割。

[0888] 方法可以包含以指向操作模式操作REIMS装置。

[0889] 方法可以包含降低REIMS装置,以便接触样品并获取谱数据,接着在接触样品后和获取进一步谱数据前升高REIMS装置。

[0890] 方法可以包含获得样品的光学图像。

[0891] 方法可以包含基本上共同记录光学图像和离子图像。

[0892] 方法可以包含界定光学图像和/或离子图像中的一或多个关注区域。

[0893] 方法可以包含确定一或多个关注区域的类别或分类。

[0894] 类别或分类可以包含健康状态、癌变前状态、癌变状态、细菌菌株或真菌菌株。

[0895] 根据另一方面,提供了一种方法。方法包括使用快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置对样品的多个不同位置取样并获得每个位置的谱数据;以及使用事先构筑、培训或改良的样品分类模型对每个位置的样品进行分类。

[0896] 根据另一方面,提供了一种离子成像器。离子成像器包括快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置;以及控制系统,所述控制系统被布置和调适用于:(i)使用快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置对样品上的多个不同位置自动取样,并获得对应于每个位置的谱数据;以及(ii)使用所得谱数据构筑、训练或改良样品分类模型。

[0897] 根据另一方面,提供了一种设备。所述设备包括快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置;以及控制系统,所述控制系统被布置和调适用于:(i)使用快速蒸发电离质谱(“REIMS”)装置对样品的多个不同位置自动取样,并获得每个位置的谱数据;以及(ii)使用事先构筑、训练或改良的样品分类模型对每个位置的样品进行分类。

[0898] 细菌样品的自动离子成像

[0899] 对于人样品的分析,从国家医疗服务研究伦理委员会(National Healthcare Service Research Ethics Committee)(研究ID 11/L0/1686)获得了伦理批准。

[0900] 根据各个实施例,提供了一种自动离子成像器,它被布置成对目标的不同位置(例如已经在培养基上培养的细菌或真菌样品)自动取样。

[0901] 图1示出了其中REIMS成像平台位于有待成像的组织样品上方的相关实施例。

[0902] 图2示出了说明从手术切除样本获得新鲜人肝癌转移样品并立刻冷冻到-80℃的实施例的各个方面的 workflows。将组织样品冰冻切片(赛默Microm HM550低温恒温器,德国(Germany)赛默飞世尔科技(RTM))到10μm厚并解冻安装到载玻片上供解吸电喷雾电离(“DESI”)分析。剩余的块状组织用于REIMS分析。

[0903] 使用内部建构的DESI平台进行DESI分析,并使用修改的普若索(Prosolia)(RTM)流量探头平台(美国普若索(RTM))执行REIMS分析。

[0904] 使用以负离子模式操作的质谱仪进行组织的DESI分析。

[0905] DESI成像像素尺寸设为100μm,电喷雾溶剂是甲醇:水(95:5vol/vol),溶剂流速是1.5μL/min,并且使用4巴压力的零级氮气雾化气体。在DESI分析后,组织切片用H&E(苏木紫和曙红)染色并数字扫描(日本(Japan)滨松(Hamamatsu)(RTM)的Nano-Zoomer 2.0-HT)以产生光学图像用于与MS图像比较。

[0906] 在质谱仪上进行一种肝癌转移样品的行扫描模式(切割模式)REIMS分析,并且在沃特斯Xevo G2-S Q-TOF仪器(RTM)(英国(U.K.)沃特斯迈克马斯(Waters Micromass)(RTM))上以负离子模式进行另一肝癌转移样品和微生物培养物的定点取样(指向模式)分析。

[0907] 沃特斯Xevo G2-S(RTM)质谱仪装备有改良的大气压界面,将用于转移气溶胶的正交文氏管泵与加热毛细管入口组合,如图3中所示。

[0908] 在约1巴文氏管气体压力(Venturi gas pressure)和约4kV p-p幅度下在约50kHz交流电频率(AC)下,以(第一)切割模式进行肝癌转移的REIMS成像分析。使用约500 μ m像素大小、约1mm/s切割速度和约1mm切割深度的叶片形的电外科尖端。

[0909] 在约0.25巴的文氏管气体压力、约50kHz AC下约2kV幅度下并使用在约750 μ m像素大小、保留在样品内部约0.1s的时间和约1mm的指向深度的线状电外科尖端,以(第二)指向模式进行肝癌转移的分析。

[0910] 使用1/8"OD 2mm 1D PTFE管道转移气溶胶。由于所使用的功率设定足够高,如足以可能引起严重损伤,所以应高度关注仪器设置的处理并戴上绝缘手套。

[0911] 使用猪肝样品进行REIMS成像平台的参数最佳化。为比较REIMS成像与iKnife之间的谱图案,使用电外科手持件(德国迈尔-哈克公司(Meyer-Haake GmbH)(RTM))分析猪肝、猪肾皮质、羔羊肝脏和鸡骨骼肌,所述电外科手持件并有连接到文氏管的PTFE管道(1/8"OD, 2mm 1D)。肝、肾脏和肌肉是食品级并如所指来购买。iKnife结合ValleylabSurgiStat 11(RTM)功率控制的电外科发生器(爱尔兰的科维迪恩公司(Covidien, Ireland))在约40W和约1巴的气体压力下以切割模式中操作。

[0912] 数据处理

[0913] 原始谱分布被加载到MATLAB(RTM)环境(美国迈斯沃克(Mathworks, USA) R2014a版)以用于预处理、MS图像可视化和图案识别分析。所有质谱都以线性方式内插到0.1Da的共同区间并分别相对于每个质谱的总离子计数("TIC")标准化。所述数据用于跨越肝脏组织类型和电离技术的强度水平的单变量比较以及用于单离子的细菌MS图像可视化。肝癌转移样品的峰值标注是基于从未处理的原始文件获得的m/z精度,而细菌峰值标注是基于质量精度和基于使用双极钳获得的串接MS谱。

[0914] 针对生物组织在m/z 600-1000Da的质量范围中和针对细菌在m/z 400-2000的质量范围中以额外分组为1Da的间隔对质谱执行多变量MS图像可视化。对于多变量图像可视化,共同记录MS-图像和光学图像以定义关注区域("R01")用于构建监督训练模型。所定义R01(类别)是肝样品的健康和癌变组织,以及每个细菌加琼脂的一个区域,总体上产生肝样品的2个类别以及细菌样品的4个类别。

[0915] 所述训练模型用于对同样品的每个像素进行分类,并且将所获得的分数值的色码编成红色-绿色-蓝色的颜色标度。用于图像可视化的此监督策略是基于将递归最大边缘准则("RMMC")与线性判别分析("LDA")组合的算法。对于无监督分析,对由关注区域定义的质谱执行主成分分析("PCA")。

[0916] 一致性相关系数用于测量REIMS成像平台("R1P")质谱与iKnife质谱之间的一致性。此定量量度被定义为:

$$[0917] \quad \rho_c = \frac{2\rho\sigma_{RIP}\sigma_{iKnife}}{\sigma_{RIP}^2 + \sigma_{iKnife}^2 + (\mu_{RIP} - \mu_{iKnife})^2} \quad (1)$$

[0918] 其中 ρ_c 是一致性相关系数, ρ 是皮尔森相关系数,并且 $\sigma_{RIP/iKnife}$ 是 $\mu_{RIP/iKnife}$ 的平均强度值的标准偏差。

[0919] 接近值0的低一致性相关系数指示低一致性,而接近值1的值表明谱分布之间的高相似度。

[0920] 盒形图示出了在盒的边缘具有第25百分点和第75百分点的盒内中心标记的中值。上须线和下须线说明约2.7的标准偏差(99.3%数据覆盖率)。在质谱的数据用盒形图可视化之前,质谱相对于100%强度标度标准化。

[0921] 图4进一步详细地示出了REIMS成像平台,它包含三个主要功能元件,所述三个功能元件都影响质谱的品质。成像平台包含电力产生器、具有取样探针的xyz-平台和质谱仪。

[0922] 用于所述平台的电源设置包含泰克(Tektronix) (RTM) AFG 3022任意函数发生器(美国的泰克(RTM))、泰克(RTM) DPO 3014示波器和崔克(Trek) 10/40A高压放大器(美国的崔克(RTM))。

[0923] 所述任意函数发生器用于生成频率处于约10kHz到60kHz的范围内、幅度在约1V和6V之间的正弦波形。所述高压功率放大器将电压放大1000倍并向所连接的取样探针提供电流。所述示波器提供反馈以确保正确的工作参数。

[0924] xyz-平台包含修改的普若索(RTM) 2D DESI平台,所述平台包括流量探头(RTM)升级(美国普若索(RTM))与高精度z轴致动器。取样探针安装到致动器上并连接到电力产生器装置以及MS入口毛细管(如图5中所示)。

[0925] 可以提供激光高度传感器以测量电外科尖端与样品表面之间的距离并确保尖端穿透到样品中相同的穿透深度,此尤其适用于不均匀的样品表面。电外科尖端能够依据应用的领域而更换其它材料或形状。在高精度取样的情况下,可以使用小直径的金属丝,而大表面尖端适合于使质谱信号强度达到最大。电外科尖端被管道包围,管道连接到文氏管的喷气泵。

[0926] 细菌鉴别/成像

[0927] 以上已经描述组织离子成像以帮助理解微生物群体的离子成像。

[0928] 在约1巴文氏管气体压力、约2kV、约40kHzAC下,使用叶片形的电外科尖端、约1mm像素大小、约0.1s时间保持在样品内部和约1mm指向深度,进行细菌的REIMS成像分析。

[0929] 在单个皮氏培养皿中的基于固体琼脂的培养基(英国奥西德(Oxoid) (RTM))上培养绿脓杆菌ATCC 27853、枯草芽孢杆菌ATCC 6633和金黄色葡萄球菌ATCC 25923的细菌菌株。在大气压条件下在37℃下培育隔夜。在沃特斯Xevo G2-S (RTM) 质谱仪上直接从固体培养基进行REIMS分析。在分离菌株上使用串联质谱和REIMS双极钳法鉴别峰。

[0930] 在微生物学背景下,逐渐应用成像质谱技术,例如MALDI-MSI和(纳米) DESI-MSI,因为这些技术为研究微生物菌落中代谢物的空间分辨的分布提供了独特的机会。另外,虽然无法只单独研究微生物培养物,但能够直接分析不同微生物的相互作用并且在多数情况下体内以2D分析并且在生长培养基切片后以3D分析。此能够全新地了解某些类型细菌的防御机制,并能够延伸到微生物感染的成像和微生物-宿主相互作用的研究。

[0931] 直接从体内在琼脂板上生长的菌落进行细菌菌株绿脓杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄

色葡萄球菌的REIMS成像分析。所检测的谱物种展示与使用双极性REIMS获得的相同菌株高度相似性。每个质谱主要是 m/z 600到1000的质量范围内的完整磷脂物质,被鉴别为磷脂酸(“PA”)、磷脂酰基-甘油(“PG”)和磷脂酰基-乙醇胺(“PE”)物质。脂肪酸大部分存在于较低质量范围,而心肌磷脂在较高质量范围中产生强烈信号(参见图6)。使用 m/z 400到2000的质量范围,所有三种菌株使用监督与无监督多变量方法可彼此相区别(参见图7和8)。多变量图像展示三种物质中的每一种的明显分离,其中琼脂未分组到三种菌株中的任一种。

[0932] 不同于双极性REIMS中,在琼脂表面保持完整的情况下,在分析期间,利用单极REIMS成像装置,取样探针直接浸入琼脂培养基中。然而,来自琼脂的离子产率一般低,缺乏在细菌中观测到的所有脂质峰。此低离子产率可能与基于碳水化合物的琼脂基质相关,所述基质通过损失水进行缩合反应,导致炭化,因此阻碍通过REIMS机制形成离子。

[0933] 单离子图像显示例如枯草芽孢杆菌中脂肽表面活性素等分泌的代谢物的空间分布。据报告表面活性素展现抗细菌、抗病毒和抗真菌特性。表面活性素信号同等地分布在枯草芽孢杆菌培养物上。然而,在图7中能够观测到表面活性素分泌到枯草芽孢杆菌不直接栖息的相邻区域。

[0934] 在绿脓杆菌的情况下,观测一系列PQS衍生的群体感应分子彼此的分布类似。

[0935] 在图9中,虽然例如PA (34:1) 等结构细胞膜组分同等地分布在绿脓杆菌覆盖的整个区域上,但如针对PQS(假单胞菌属群体信号,2-庚基-3-羟基-4(1H)-喹诺酮)所目测,在绿脓杆菌生长区域的外缘,发现显著更高丰度的细胞外群体感应代谢物。

[0936] 高浓度群体感应分子的区域似乎与从主要生长区域涌来的绿脓杆菌细菌细胞相关。各种细菌分泌例如PQS等群体感应分子,用于相同细菌物种内或细菌物种之间的细胞与细胞通信。群体感应已经与绿脓杆菌中之各种行为相关,包括涌动和生物膜产生。磷脂类别的平均强度水平的比较说明所有细菌菌株之间PA、PE和PG类别的相对强度分布相似(参见图9)。PA离子物质的累积强度比其它类别略微升高,与绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌的PG类别相比强度高约5%,并且对于枯草芽孢杆菌,高约15%。

[0937] 结果证实成功的内源性和外源性细菌物种的多变量分化和鉴别,同时允许代谢特征的空间分辨的定位,最终得到关于生物化学通路和微生物物质之间的相互作用的信息。基于REIMS的成像平台另外标志着微生物培养物的自动化取样系统在含有多种生物体的板上用于菌落到菌落取样的第一步。

[0938] REIMS成像平台的自动化性质使得能够系统性收集参考质谱,用于将未知组织或细菌分类所需的谱文库中。在两种情况下,REIMS成像技术能够清晰地区别健康/癌变组织和三种细菌菌株。此能够定位细菌生长区域内的代谢物以及实现微生物的自动化鉴别系统。

[0939] 任意选择电极的材料和形状的能力提供了此项技术的各种应用,取决于使用者的需求,而两种模式的取样(指向和切割)的可用性增添了另一层灵活性。主要地,生物来源的任何导电材料能够不必预先制备即可用此技术系统地分析,实现各种应用,例如组织基质分析、细菌鉴别或食物质量管理。因为REIMS质谱分布跨越组织学肿瘤类型和细菌变化,所以基础生物化学信息连同大型谱数据库可以为未来生物标记物发现或细菌通路探索提供额外信息。

[0940] 使用REIMS技术的分析

[0941] 在本文中所公开的实施例中,对于使用REIMS技术的分析,呈钳子形式的两个手持型电极用作取样探针(双极钳,从德国图宾根的爱尔博电子医疗仪器公司(Erbe Elektromedizin,Tübingen,Germany)获得)。使用60W功率设定下双极性模式的Valleylab Force EZc功率控制的电外科单元(爱尔兰都柏林的科维迪恩公司(Covidien,Dublin,Ireland))作为RF交流电电源(470kHz,正弦波)。应用约1.5m长、1/8英寸外径、1/16英寸内径的PTFE管道(Fluidfion PTFE管道;德国于伯林根的LIQUID扫描公司(LIQUID-scan GmbH Co.KG,Überlingen,Germany))连接双极钳的包埋流体管线和LTQ Orbitrap Discovery仪器(德国不来梅的赛默科技公司(Thermo Scientific GmbH,Bremen,Germany)、赛默Exactive仪器(赛默科技公司)或Xevo G2-S Q-TOF仪器(英国曼彻斯特的沃特斯公司(Waters Corporation,Manchester,UK))的入口毛细管。在每种情况下,质谱仪的固有真空系统用于抽吸气溶胶。此装置展示于图10A-C中,而仪器设置在下表中给出。

[0942] 在本研究中使用的Orbitrap Discovery和Xevo G2-S仪器的仪器参数

[0943]

赛默 Orbitrap Discovery		Exactive	沃特斯 Xevo G2-S	
参数	设置	设置	参数	设置
注射时间	1000ms	1000ms	扫描时间	1000ms
微扫描	1	1	扫描模式	灵敏度
质量分析器	FTMS ^a	FTMS ^b	质量分析器	TOF
离子模式	负	负	离子模式	负
质量范围	150-2000	150-2000	质量范围	150-2000
管透镜电压	-120V	-160V	取样锥电压	30V
毛细管电压	-40V	-50V	源偏移	80V
撇渣器电压	na	-24V	源温	150°C
毛细管温度	250°C	250°C		
自动增益控制	关	开		

[0944] a:Orbitrap Discovery仪器在30,000的分辨率下在 $m/z=400$ 下工作,b:质量分析器在50,000的分辨率($m/z=200$)下使用

[0945] 微生物的质谱分析通常直接从固体培养基进行,在此情况下使用双极钳的电极之一从琼脂表面刮下约0.1-1.5mg微生物生物质。随后使两个电极极为接近(即通过将生物质夹捏在钳子尖端之间)并使用脚踏开关触发RF电源。微生物生物质由于非零阻抗而快速加热,并且产生含有分析物的气溶胶并直接转移到质谱仪中。可能时,针对每个菌株进行五次个别测量并求平均值,作为数据库条目。

[0946] 微生物的培养

[0947] 在本文中所公开的一些实施例中分析的所有临床分离株都在临床微生物学工作期间通过经过培训的NHS工作人员常规分离。在本研究期间分析的大部分微生物事先从血液培养物中分离,使用布鲁克(Bruker)Biotyper仪器鉴别,并存储在-80°C冷冻机中的珠粒上。对于REIMS分析,微生物例如生长在临床微生物学环境中常用的一系列基于琼脂的固体培养基上。培养基购自奥西德(英国贝辛斯托克(Basingstoke))或E&O实验室有限公司(E&O Laboratories Ltd.)(英国邦尼布里奇(Bonnybridge))。在分析前细菌在适当大气压条件下在37°C下培育隔夜。大气压条件包括好氧条件(热的房间)、厌氧条件(培育箱)、微好氧条

件(热的房间中的瓶)和含有5%CO₂的有氧条件(含湿气培育箱)。使用惠特利罐放气系统(Whitley Jar Gassing System)(英国希普利的唐惠特利科学有限公司(Don Whitley Scientific Ltd., Shipley, UK))产生微好氧条件。

[0948] 使用REIMS技术分析细菌

[0949] 当本文提供的使用REIMS技术的方法应用于细菌时,大部分检测到的磷脂物质能够归于PA、PE和PG。此能够在表1中清晰地看到,表1示出了使用在REIMS技术测量期间获得的精确质量测量和串联质谱测量针对九种不同细菌病原性物种获得的定性磷脂分布。仅仅包括高丰度信号(>5%相对丰度)。能够获得所有细菌物种的独特峰图案,即使是紧密相关的细菌物种,例如不同的链球菌属,或肠内菌科的成员(大肠杆菌、克氏柠檬酸杆菌(*C. koseri*)、肺炎克雷伯氏菌、粘质沙雷氏菌(*S. marcescens*)、奇异变形杆菌(*P. mirabilis*))。看到革兰氏阴性与革兰氏阳性物种的大部分谱图案主要是高丰度半分子PG信号。

[0950] 一般来说,革兰氏阴性物种显示更高量的不饱和磷脂物质和更高相对量的PE。此与公开的关于细菌磷脂组合物的文献非常一致。金黄色葡萄球菌(和其它葡萄球菌属)通过其独有地示出由饱和磷脂物质产生的信号的事实与其它细菌物种清晰地区别。

[0951] 代谢物鉴别

[0952] 主要基于精确质量测量和关于在相同细菌物种中发现的具有相同精确质量的化合物的参考文献鉴别细菌代谢物。使用下式计算质量偏差

$$[0953] \quad \Delta m[\text{ppm}] = \left| \frac{m_{\text{exp}} - m_{\text{th}}}{m_{\text{th}}} 10^6 \right|$$

[0954] 其中 Δm = 质量偏差 (ppm)

[0955] m_{exp} = 实验精确质量,精度达到第4个小数位

[0956] m_{th} = 理论精确质量,精度达到第4个小数位

[0957] 质量精确度<3ppm被视为确认所提议的总式。进一步结构鉴别仅仅通过额外参考文献进行,如果发现信号强度足够高并且可获得参考谱,那么由额外串联质谱测量确认。在赛默LTQ XL或Xevo G2-S仪器上使用碰撞诱导解离作为碎片化机制,进行碎片化实验。

[0958] 细菌与酵母之间的区别

[0959] 细菌与真菌之间在磷脂组成上存在显著差异。本发明人已确定在不同细菌之间细菌的REIMS谱分布图非常不同,而真菌的REIMS谱的外观总体上非常保守,差异基本上由不同磷脂比率产生,而非某些脂质物质存在或不存在。因此,本文提供的方法成功地用于区别细菌与真菌。

[0960] 因此,任选地,方法可以用于检测样品中细菌的存在或不存在。任选地,方法可以用于检测样品中真菌的存在或不存在。任选地,方法可以用于确定微生物是细菌还是真菌。任选地,方法可以用于检测例如真菌培养物或动物细胞系培养物等非细菌培养物中细菌污染的存在。任选地,方法可以用于检测例如细菌培养物或动物细胞系培养物等非真菌培养物中真菌污染的存在。

[0961] 念珠菌属物种形成

[0962] 在环境、土壤内和表面上发现念珠菌属物种。它们能够引起从鹅口疮到败血症的一系列感染,并且例如在免疫缺陷患者中,例如患有HIV或囊肿性纤维化的患者中是一个问

题。在英国,此物种是血流感染的第9大病因并且其中90%是由白色念珠菌引起。形成念珠菌属物种在临床上适用的,因为除白色念珠菌外的念珠菌属物种通常更抗药并且经常本质上对唑类抗真菌剂具抗性。

[0963] 使用MALDI TOF MS鉴别酵母需要在质谱分析前将酵母样品预处理以进行可靠的鉴别(分数>2.0)。虽然针对MALDI TOF MS所推荐的样品预处理包含使用甲酸和乙腈完全萃取真菌物质,但完整的酵母物种能够直接通过本文提供的方法来分析,不必对实验设置或分析工作流程作任何修改。

[0964] 使用钳法和REIMS取样和检查七种不同念珠菌属物种。

[0965] 如图26中所展示,能够区分所有物种。留一交叉验证分数是100%。在此实例中,任一测试的念珠菌属物种的谱数据都可以充当其它测试物种中的每一物种的“比较”谱数据。可替代地或另外,这些物种中任一物种的谱数据可以与一种或多种已知的念珠菌属物种的参考相比谱数据。

[0966] 因此,任选地,方法可以用于检测、鉴别和/或表征一种或多种念珠菌属物种。任选地,方法可以用于检测或确认样品中白色念珠菌的存在或不存在,例如通过比较来自样品的谱数据与白色念珠菌的参考谱数据来进行。

[0967] 任选地,方法可以用于检测或确认一种或多种选自以下各项的念珠菌属物种的存在或不存在:白色念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、季也蒙念珠菌、葡萄牙念珠菌、近平滑念珠菌和/或热带念珠菌。

[0968] 任选地,方法可以用于检测或确认一种或多种选自本文中的其它地方列出的念珠菌属物种的念珠菌属物种的存在或不存在。

[0969] 可以任选地已知样品含有至少一种酵母物种,例如一种念珠菌属物种。

[0970] 微生物混合物的分析

[0971] 为了确定是否能够从混合培养物观测到物种特定峰,将已知量的细菌合并并且使用基于钳子的REIMS分析。举例来说,如图27A-C中所示,当将10 μ I大肠杆菌和白色念珠菌混合在一起并使用REIMS分析时,能够在混合谱图内观测到物种特定峰。

[0972] 图27A示出了大肠杆菌的质谱,图27B示出了白色念珠菌的质谱,并且图27C示出了大肠杆菌与白色念珠菌的混合物的质谱。

[0973] 因此,在一个实施例中,本文提供的方法可以用于检测、鉴别和/或表征包含微生物混合物的样品。“微生物混合物”意指样品中存在至少2种不同微生物,因此可以存在第一与第二微生物。任选地,样品中存在至少3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种或至少10种不同微生物。任选地,不同微生物是分类学上不同的,例如不同菌株、种、属、纲等等。在另一实施例中,不同微生物的不同之处至少在一种特征上,例如药物敏感性或产生特定化合物的能力。因此,任选地,不同微生物可以是在分类层级下一致或不同,例如革兰氏染色、纲、科、属、种和/或菌株。

[0974] 任选地,方法可以用于检测、鉴别和/或表征包含微生物混合物的样品中存在的1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种或10种或至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种或至少10种微生物。

[0975] 任选地,本文提供的方法可以用于确认样品中大肠杆菌和/或白色念珠菌的存在或不存在。任选地,样品可以包含微生物混合物。

[0976] 微生物的亚分型

[0977] 微生物分型提供了有关菌株之间的遗传关系的信息。此过程对于追踪感染疾病的扩散、通知感染控制实践以及在一些情况下提供有用的关于微生物的性质的信息,例如微生物是否是高度病原性变异体来说是关键的。使用如下文所论述的各种实例,展示本文提供的使用REIMS技术的方法提供准确的菌株水平鉴别的适合性。

[0978] 艰难梭菌的核糖体分型

[0979] 艰难梭菌是一种革兰氏阳性厌氧细菌,并且由其产生的感染是经常在广谱抗生素治疗后获得的医院(即在医院)获得性感染,它允许更强壮且形成孢子的此物种过度生长。艰难梭菌是抗生素相关腹泻的主要原因,并且具有高达30%的病例死亡率。分型信息在临床上用于了解疾病的流行病学并确定分离株是否已经从一个患者转移到另一个患者。在常规的临床微生物学中,严重艰难梭菌爆发常与某些核糖体基因型相关,例如被认为是尤其致病的核糖体基因型027或078。因此,临床微生物学实验室尤其关注的是确定感染是否在住院期间获得(医院内-预期所有患者会被相同核糖体基因型的菌株感染)或是否感染由在进入医院前获得的菌株引起(可以预期不同患者会被不同核糖体基因型的菌株感染)。

[0980] 艰难梭菌的核糖体分型按常规通过以下来进行:在例如布拉泽培养基等特定培养基上分离艰难梭菌上,并随后对16S-23S基因间隔区进行PCR扩增,以确定核糖体基因型模式。此过程是非常费时和劳动密集的,因此研究REIMS技术针对此特定问题的特异性。

[0981] 因为艰难梭菌在不利的条件中形成孢子,所以此可能影响细胞膜脂质,又影响谱分布图。培养条件应该标准化以减少任何可能引入谱图案差异的混杂因素。

[0982] 将艰难梭菌的三种不同核糖体基因型各10个菌株在哥伦比亚血琼脂上在厌氧条件下培养24小时。核糖体基因型包括认为更少致病的002和014和更多致病的核糖体基因型078。能够观测到清楚分离趋势(参见图28)。总体上交叉验证精确度是90%。因此,本文提供的使用REIMS的方法能够提供菌株层级信息。

[0983] 绿脓杆菌的分型

[0984] 绿脓杆菌(绿脓杆菌)是一种虽然普遍存在且一般不致病,但能够引起包括败血症和肺炎在内的严重感染的生物体。它对于囊肿性纤维化(Cystic Fibrosis,“CF”)患者来说也是一种重要的病原体,其中它能够导致病情恶化。当前绿脓杆菌分离株通常通过例如英国公共卫生参考实验室(Public Health England reference Laboratory)的可变数目串联重复序列(Variable Number Tandem Repeat,VNTR)测试来分型。

[0985] 本文提供的使用REIMS的方法成功地用于区别从CF患者获得的两种不同绿脓杆菌菌株(数据未示)。

[0986] 大肠杆菌的分型

[0987] 本文提供的使用REIMS的方法成功地用于区别两种不同大肠杆菌菌株:来源于亲本菌株B的OP50和来源于亲本菌株K-12的C600(数据未示)。

[0988] 肺炎链球菌的血清分型

[0989] 肺炎链球菌是一种革兰氏阳性细菌,它在儿童和成年人中引起多种传染性疾病,包括菌血症、脑膜炎和呼吸道感染。幼儿和老年人最受影响,并且据估计每年约一百万名儿童死于肺炎球菌疾病,尤其是在发展中国家。肺炎链球菌细胞被多糖层覆盖,形成囊状物,它是基本毒性因子。已经鉴别出91种独特的肺炎球菌血清型,然而,这些血清型中仅仅相当

少的数目解释婴儿中的大部分疾病。肺炎链球菌血清型的鉴别最常使用荚膜膨胀反应 (Quellung reaction) 进行,所述反应包括添加抗体溶液到肺炎链球菌肉汤并观测细菌细胞的“膨胀”所指示的阳性反应。此测试费力且耗时,并且由一系列后续个别测试组成,直到明确地鉴别出血清型。通常抗体溶液以若干抗体的混合物一次性加入,以减少所需的测试量。涉及PCR的分子血清分型方法相当昂贵并且需要大规模的样品处理。因此,除鉴别物种层级所需的步骤外不需要引入其它样品处理步骤的简单明了的区别不同肺炎球菌血清型的方式将对每天微生物学实践产生巨大影响。

[0990] 本文提供的使用REIMS的方法成功地用于区别两种不同肺炎链球菌血清型-血清型14和血清型3(数据未示)。

[0991] 因此,在一个实施例中,本文提供的方法可以用于微生物分型,例如菌株分型、核糖体分型和/或血清分型,任选地艰难梭菌核糖体分型、肺炎链球菌血清分型、大肠杆菌分型和/或绿脓杆菌菌株分型。

[0992] 通常,核糖体分型基于细菌的rRNA基因序列对细菌进行表征或分类。它能够例如通过16S rRNA基因PCR-RFLP和定序来进行。任选地,本文提供的方法可以用于分析例如微生物是否具有特定核糖体基因型,区别具有不同核糖体基因型的2种或更多种微生物,检测具有特定核糖体基因型的微生物等等。

[0993] 通常,血清分型基于特定表面结构对微生物进行表征或分类。任选地,本文提供的方法可以用于分析例如微生物是否具有特定血清型,区别具有不同血清型的2种或更多种微生物,检测具有特定血清型的微生物等等。

[0994] 物种间方差对比物种内方差的分析

[0995] 对于充当通用鉴别工具的方法来说需要满足的一般需求是物种间方差大于物种内方差。针对在临床微生物学中遇到的三种最常见和最充分研究的病原性物种,即绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌,评估由相同物种的不同菌株引入到总谱外观中的生物方差并且能够在图30中看到结果。

[0996] 图30示出了针对对应物种的五个不同临床分离株获得的REIMS谱分布图。针对金黄色葡萄球菌,能够观测到优良的图案稳定性。对于大肠杆菌,能够在 m/z 600-800的质量范围中的主要磷脂酰甘油磷脂物质之间观测到相对信号强度的一些改变。在高质量范围观测到非常高的相似度。在绿脓杆菌的情况下,五种菌株中的三种展现例如分别在 m/z 200-350和 m/z 500-680的质量范围中的群体感应分子和鼠李糖脂等细胞外代谢物的产生。此外,一致的菌株展现在 m/z 900-1100范围内的一组信号。然而, m/z 680-800与超过 m/z 1100的质量之间的磷脂区展示绿脓杆菌的所有五种临床分离株之间非常一致。

[0997] 在所有这些情况下,很明显大部分谱信息保持保守,尤其是超过 m/z 1100的质量。过去其它脂质组学技术基本上忽略了在 $m/z > 1000$ 下信号的此高度保守性,这可能是由于例如DESI等技术进行检测存在困难。

[0998] 因此,在一个实施例中,本文提供的方法可以用于检测、鉴别和/或表征选自假单胞菌属、葡萄球菌属和/或埃希氏杆菌属,任选地绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌和/或大肠杆菌的微生物。

[0999] 产生包含由15个不同临床分离株表示的28个不同细菌物种的另一数据集,每一个如下表中所详述:

[1000]

革兰氏染色	科	属	种	生长条件
阴性	假单胞菌科	假单胞菌属	绿脓杆菌	CBA, 好氧
	肠内菌科	柠檬酸杆菌属	克氏柠檬酸杆菌	CBA, 好氧
		肠杆菌属	产气肠杆菌	CBA, 好氧
			阴沟肠杆菌	CBA, 好氧
		克雷伯氏菌	产酸克雷伯氏菌	CBA, 好氧
			肺炎克雷伯氏菌	CBA, 好氧
		埃希氏杆菌属	大肠杆菌	CBA, 好氧
		变形杆菌属	奇异变形杆菌	CBA, 好氧
		摩根氏菌属	摩氏摩根菌	CBA, 好氧
		沙雷氏菌属	粘质沙雷氏菌	CBA, 好氧
	巴斯德氏菌科	嗜血杆菌属	流感嗜血杆菌	CHOC, 好氧 (5 % CO ₂)
	伯克氏菌科	伯克氏菌属	洋葱伯克氏菌群	CBA, 好氧 (5% CO ₂)
	黄单胞菌科	寡养单胞菌属	嗜麦芽窄食单胞菌	CBA, 好氧
	拟杆菌科	拟杆菌属	脆弱拟杆菌	CBA, 厌氧

[1001]

阳性	莫拉氏菌科	莫拉菌属	卡他莫拉菌	CBA, 好氧
	奈瑟菌科	奈瑟菌属	淋病奈瑟菌	CBA, 好氧 (5 % CO ₂)
	葡萄球菌科	葡萄球菌属	金黄色葡萄球菌	CBA, 好氧
			表皮葡萄球菌	CBA, 好氧
			头葡萄球菌	CBA, 好氧
			溶血性葡萄球菌	CBA, 好氧
			人葡萄球菌	CBA, 好氧
	肠球菌科	肠球菌属	粪肠球菌	CBA, 好氧 (5 % CO ₂)
			屎肠球菌	CBA, 好氧 (5 % CO ₂)
	梭菌科	梭菌属	艰难梭菌	CBA, 厌氧
	微球菌科	微球菌属	黄色微球菌	CBA, 好氧
	链球菌科	链球菌属	无乳链球菌	CBA, 好氧 (5 % CO ₂)
			酿脓链球菌	CBA, 好氧 (5 % CO ₂)
			肺炎链球菌	CBA, 好氧 (5 % CO ₂)

[1002] 使用监督和无监督分析对所产生的数据集进行分析。一般来说,由REIMS技术数据的监督和无监督分析产生的曲线图展示彼此高相似性。这是由于REIMS技术独特地表征源自样品(即非源自化学背景)的信号。与MALDIMS相比,这是一个优点,在MALDIMS中基质相关的信号显著影响总谱信息。

[1003] 结果证实REIMS技术谱分布图基本上遵循分类学趋势。交叉验证揭露在种、属和革兰氏层级下95.9%、97.8%和100%的正确分类。

[1004] 发现革兰氏阳性和革兰氏阴性物种在PCA与RMMC分析中沿着第一多变量成分分离。与革兰氏阴性物种相比,革兰氏阳性细菌一般展示更高量的饱和磷脂物质和较低相对丰度的磷脂酰乙醇胺。这些观测结果与文献中报告的细菌细胞膜组成一致。执行分层聚类分析以研究如16S rRNA基因序列所测定,REIMS谱分布图如何很好地遵循细菌分类学。使用

欧几里得成对距离计算 (Euclidean pairwise distance calculation) 利用完全连接度量值, 进行分层聚类分析 (Hierarchical Cluster Analysis, HCA)。将每个细菌物种的初始数据集的 3×3 菌株求平均值, 以形成数据集, 然后进行 HCA。进行此步骤以促进可视化, 同时仍然并入某一物种的菌株之间的生物方差最大值。本发明人发现紧密相关的细菌物种的谱分布图紧密地分组在一起, 而实际上不相关的细菌物种分开分组。对于革兰氏阳性物种, 此针对葡萄球菌属 (金黄色葡萄球菌、头葡萄球菌、表皮葡萄球菌、人葡萄球菌和溶血性葡萄球菌)、链球菌属 (无乳链球菌、肺炎链球菌、酿脓链球菌) 和两种肠球菌属 (粪肠球菌和屎肠球菌) 每一个物种确定。均属于乳杆菌目的链球菌属和肠球菌属进一步位于 HCA 中的相同聚类上。

[1005] 关于革兰氏阴性物种, 肠内菌科的所有成员 (埃希氏杆菌属、柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、变形杆菌属、摩根氏菌属、克雷伯氏菌和沙雷氏菌属的成员) 紧密分组在一起。此外, 当与其它革兰氏阴性物种相比时, 绿脓杆菌、卡他莫拉菌和洋葱伯克氏菌群菌株都一起位于另一聚类。假单胞菌属和莫拉菌属都是假单胞菌目的一部分。虽然现在洋葱伯克氏菌群菌株属于 β -变形菌门, 但它们先前分类成假单胞菌属, 因此表明假单胞菌属与伯克氏菌属之间的高表型相似性, 此解释了此两种物种在 HCA 树状图上接近。在 PCA 曲线图中仅仅观测到革兰氏阳性和革兰氏阴性物种趋势相同。类似于 HCA, 这些结果证实 REIMS 技术谱分布图基本上遵循分类学趋势。

[1006] 生长条件的影响

[1007] 绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌都是兼性厌氧菌, 因此能够在多种不同的气氛下存活和生长。在将细菌在四种最常使用的气氛下培养后获得 REIMS 技术分布图。对于绿脓杆菌和大肠杆菌, 不同的培养条件未引起谱数据的任何显著差异 (数据未示)。

[1008] 图 31A 示出了在好氧条件下生长的金黄色葡萄球菌在质量范围 m/z 650–800 中的质谱的缩放区, 图 31B 示出了在厌氧条件下生长的金黄色葡萄球菌在质量范围 m/z 650–800 中的质谱的缩放区, 图 31C 示出了在好氧条件下生长的金黄色葡萄球菌在质量范围 m/z 1250–1750 中的质谱的缩放区, 以及图 31D 示出了在厌氧条件下生长的金黄色葡萄球菌在质量范围 m/z 1250–1750 中的质谱的缩放区。

[1009] 在金黄色葡萄球菌的谱分布图中能够观测到显著改变, 其中磷脂酰甘油表示向链长度更长的脂质物质强烈转变, 在 m/z 650–800 下的磷脂酰甘油与 m/z 1300–1700 范围内的更高质量物质均如此, 如图 31A–D 中的缩放谱区中所示。

[1010] 在使用气液色谱法分析在好氧和厌氧条件下生长的金黄色葡萄球菌的脂肪酸组成的研究中获得类似结果。虽然在好氧条件下, 具有 15、18 和 20 个碳原子的脂肪酸占总脂肪酸含量的 40.86%、3.7% 和 21.84%, 但在厌氧条件下这些数目分别变成 16.26%、22.38% 和 37.65% (怀特 (D.C.White), 弗里曼 (F.E.Frerman), 在膜结合的电子传输系统形成期间金黄色葡萄球菌的复合脂质的脂肪酸组成 (Fatty Acid Composition of the Complex Lipids of *Staphylococcus aureus* During the Formation of the Membrane-bound Electron Transport System).《细菌学杂志 (Journal of Bacteriology)》95, 2198–2209 (1968))。此与膜结合的电子传输系统在厌氧条件下失活相关。因为发现金黄色葡萄球菌含有少于 1% 游离脂肪酸, 所以这些脂肪酸主要建构到膜脂质物质中, 因此导致较重的磷脂物质显著增加, 此能够使用通过本文中的使用 REIMS 技术的方法获得的谱数据确认。

[1011] 通过使表皮葡萄球菌的十个不同分离株在如下三种常用琼脂上生长来确定不同培养基对细菌的影响:氨曲南、血琼脂和巧克力琼脂。琼脂类型不影响脂质分布图(数据未示)。

[1012] 棒状杆菌亚目中的分枝菌酸

[1013] 亚目棒状杆菌亚目形成一大组特征在于存在分枝菌酸的放线菌物种。分枝菌酸是长脂肪酸,它一般由较长 β -羟基链(部分霉菌酸酯链)和更短 α -烷基侧链(α -分支)构成。链长度的变化性和结构的复杂性界定了属,从最简单的棒状杆菌属的白喉菌酸到最复杂的分枝杆菌属的分枝菌酸。主链和侧链的碳原子数目和不饱和度(是指双键和/或环丙烷环的数目)根据所考虑的属变化。使用本文提供的利用REIMS技术的方法,获得如在临床微生物学中遇到的棒状杆菌亚目的四个最常见属的成员的谱分布图。本发明人确定非发酵棒状杆菌显示链长度在C28到C36范围内的分枝菌酸;而马红球菌显示链长度在C28到C39范围内的分枝菌酸;星形诺卡氏菌显示链长度在C48到C60范围内的分枝菌酸;以及鸟分枝杆菌显示链长度在C77到C81范围内的分枝菌酸。

[1014] 确定马红球菌ATCC 6939的分枝菌酸成分。根据报告已知红球菌属含有30-54的碳链长度和0-2的不饱和度的分枝菌酸。对于所分析的红球菌属菌株,发现总链长在28-39和不饱和度0-3的分枝菌酸。此特定菌株的总链长与如文献中报告的马红球菌物种非常一致。然而,在所呈现的研究中发现更高量的不饱和度(参见表4)。此可能是由于文献来源中缺乏灵敏度,即由于本文提供的方法与常规方法相比灵敏度更高,因为在REIMS技术谱中检测到的高度不饱和物质具有低谱强度。

[1015] 根据报告已知诺卡氏菌属含有链长度在C48-60之间并且不饱和度在0-3之间的分枝菌酸。这些发现能够使用本文提供的方法针对从呼吸来源的样品中分离的诺卡氏菌属和模式菌株星形诺卡氏菌19247进行确认。检测到的分枝菌酸物质在表5中列出。

[1016] 鸟分枝杆菌、偶然分枝杆菌和派瑞分枝杆菌的菌株是从临床呼吸样本获得的并使用本文中的使用REIMS技术的方法分析。检测到的分枝菌酸物质在表6中列出。根据报告已知分枝杆菌含有链长度在60-90个碳之间和不饱和度在1-2之间的分枝菌酸。虽然棒状杆菌亚目的其它成员主要含有未官能化的分枝菌酸,但在未官能化的 α -分枝菌酸到甲氧基、酮基和环氧基官能团作为 β -羟基侧链的一部分的范围内的分枝杆菌存在更大的结构变化性。除慢反应脂肪酸菌属以外,未有棒状杆菌亚目的其它成员含有类似长的分枝菌酸。然而,虽然发现较短链长的分枝菌酸具有高强度,但发现在分枝杆菌属的情况下的分枝菌酸具有相当低的谱强度。此可能是由于分枝杆菌的膜中总丰度比其它属低,或随着分枝菌酸的链长增加,电离效率更可能降低。

[1017] 拟杆菌纲中的鞘脂

[1018] 鞘脂的产生是真核生物之间普遍存在的,但只在很少的细菌种类中存在。拟杆菌门是一种成员经常包含大约50%的人肠菌落的革兰氏阴性细菌门,其物种是不寻常的,因为它们产生总膜磷脂含量多达40%-70%的鞘脂。

[1019] 鞘脂是在调节宿主免疫反应中起关键作用的信号传导分子。包含在拟杆菌门内的属包括拟杆菌属、副拟杆菌属、普雷沃氏菌属、坦纳菌属和卟啉单胞菌属。

[1020] 本文提供的使用REIMS技术的方法用于分析拟杆菌门的成员。在文献中描述并在通过此方法产生的谱中鉴别的鞘脂包括游离神经酰胺、磷酸乙醇胺二氢神经酰胺以及被取

代和未被取代的磷酸甘油二氢神经酰胺。表7中给出这些化合物的综述,其中a)表示:参见图13中的碎片化谱;以及b)表示:参见图14中的碎片化谱。

[1021] 未发现神经酰胺与针对哺乳动物来源的样品观测到的神经酰胺一致,而发现含有额外氧分子。图13中示出了 m/z 590下 $[M+Cl]^-$ 离子的碎片化机制,这通过母离子的碰撞诱导解离解释了观测到的两个主要碎片。图14示出了针对由副拟杆菌属的成员产生的C15:0取代的磷酸甘油二氢神经酰胺获得的碎片化谱。 m/z 153和171下的主要碎片可以归于甘油磷酸头基,而 m/z 241可以归于C15:0酰基链。242Da从母离子的中性损失可以额外归于C15:0酰基链。已经针对牙龈卟啉单胞菌描述了这些化合物(不是当前数据库的一部分),因此似乎是卟啉单胞菌科所特有的。此外,据报告,这些化合物穿透到人类组织中,并在血液、血管组织和脑中发现。

[1022] 近来报告脆弱拟杆菌NCTC 9343另外产生 α -半乳糖神经酰胺的同功异型物, α -半乳糖神经酰胺是由海绵产生的鞘脂,它充当宿主免疫受体CD1d的配体。本发明人确定能够在脆弱拟杆菌菌株的REIMS技术谱中在 m/z 752、766和780下发现这些化合物,在拟杆菌纲内的任何其它分析物种中未能发现。

[1023] 棒状杆菌属物种形成

[1024] 使用现有的方法在棒状杆菌属内进行物种鉴别是具挑战性的。举例来说,部分16S rRNA定序未产生足够特异性,因此,理想地,需要不太常用的完整序列。棒状杆菌通常含有分枝菌酸,因此REIMS可以例如基于关于分枝菌酸的谱数据,用于鉴别棒状杆菌属物种或区分棒状杆菌属物种。

[1025] 本文提供的使用REIMS技术的方法成功地用于区别五种不同棒状杆菌属物种:纹带棒状杆菌、微细棒状杆菌、模拟棒状杆菌、白喉棒状杆菌、无枝菌酸棒状杆菌(图32)。最惊人地,无枝菌酸棒状杆菌,一种新出现的机会病原体,容易由其缺乏分枝菌酸信号来区分。

[1026] 使用碰撞诱导解离,分枝菌酸在部分霉菌酸酯链与 α -分支之间的键处断裂。虽然部分霉菌酸酯链形成醛并且使母离子成为中性实体,但分枝菌酸的 α -分支形成带负电的羧酸根离子,允许母离子的结构分配。观测到的碎片离子(参见表3)与文献中针对谷氨酸棒状杆菌所报告的碎片离子非常一致,并且确认化学分配。

[1027] 因此,在一个实施例中,本文提供的方法可以用于检测、鉴别和/或表征一种或多种棒状杆菌属物种。在一个实施例中,本文提供的方法可以用于检测或确认目标中无枝菌酸棒状杆菌的存在或不存在,例如通过比较来自所述目标的谱数据与无枝菌酸棒状杆菌的参考谱数据来进行。在一个实施例中,本文提供的方法可以用于检测或确认选自纹带棒状杆菌、微细棒状杆菌、模拟棒状杆菌、白喉棒状杆菌和/或无枝菌酸棒状杆菌的一种或多种棒状杆菌属物种的存在或不存在。

[1028] 在任一这些实施例中,可以任选地已知样品含有至少一种细菌物种,例如一种棒状杆菌属物种。

[1029] 抗微生物剂敏感性测试(“AST”)

[1030] 微生物的抗生素抗性是一个日益显著的普遍问题,它经常使感染治疗大为复杂。在常规MALDI TOF分析期间获得的蛋白质分布图不含关于抗生素敏感性和抗性图案的信息。如本文中的其它地方所论述,用于测试抗生素敏感性的基于培养物的方法花费太长时间。

[1031] 金黄色葡萄球菌能够引起一系列的感染,包括肺炎、菌血症以及皮肤和软组织感染。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)菌株对 β -内酰胺抗微生物剂具抗性,并引起住院时间增长,经济成本更高并且临床结果更差。此外,它是医院内获得性感染(Acquired Infections, HAI)的主要原因,并且据估计每年在欧洲占到HAI的44%。因为MRSA定殖已经被鉴别为MRSA感染发展中的主要风险因子,所以为了抑制医院内的扩散,经常采用统一或定向筛选程序。

[1032] 使用本文提供的使用REIMS技术的方法检查30个MRSA和30个甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌(methicillin susceptible *S. aureus*, MSSA)。LDA和交叉验证分析(图29)揭露了MSSA和MRSA分离株清楚分离,此表明本文提供的方法提供了一种有用的筛选MRSA的工具。

[1033] 本文提供的使用REIMS技术的方法也成功地用于区别肺炎克雷伯氏菌的一些抗微生物剂抗性(产生碳青霉烯酶)与抗微生物剂敏感性(不产生碳青霉烯酶)的菌株。

[1034] 因此,在一个实施例中,本文提供的方法可以用于检测、鉴别和/或表征对抗微生物剂具有敏感性的微生物。在一个实施例中,本文提供的方法可以用于检测、鉴别或表征对抗微生物剂具有抗性的微生物。在一个实施例中,方法可以用于区别抗微生物剂抗性微生物与抗微生物剂敏感性微生物。

[1035] 任选地,抗微生物剂可以选自本文中的其它地方公开的任一抗微生物剂。

[1036] 任选地,抗微生物剂抗性微生物可以选自例如碳青霉烯酶或TEM-1 β -内酰胺酶等 β -内酰胺酶的生产者;氯霉素乙酰转移酶的生产者;四环素流出系统的生产者;AmpC头孢菌素酶的生产者;和/或DHF(二氢叶酸)还原酶的过度生产者。

[1037] 任选地,抗微生物剂抗性微生物可以是MRSA和/或抗微生物剂敏感性微生物可以是MSSA。

[1038] 液体和微生物混合物的分析

[1039] 直接分析液体,例如微生物培养基或体液是不合理的,因为蒸发温度受水的沸点限制,因此无法超过100℃。此连同培养基对细胞的稀释一起显著地限制了灵敏度。因此,液体培养物的分析可以任选地包括或前面存在一个处理步骤以去除过量的液体,从而制备固体样品。本文中的其它地方论述了例如离心和/或过滤等合适的处理步骤。

[1040] 对于大部分细菌物种来说,在3500rpm下10分钟的离心步骤足够形成适合于REIMS技术分析的细胞球粒。然而,例如肺炎克雷伯氏杆菌或绿脓杆菌等某些细菌物种可能需要在更严格的条件下离心,例如在12500rpm下离心10分钟,以允许有效去除上清液。技术人员了解或能够容易地确定哪些离心条件适合有效地去除上清液。所得球粒可以直接例如使用REIMS技术分析,或它可以转移到例如拭子或载玻片等固体载体上。本发明人已确定此类转移不会影响分析。

[1041] 在一组实例中,以不同比率产生细菌的二元混合物并使用本文提供的使用REIMS技术的方法分析。

[1042] 出于此目的,针对绿脓杆菌、脆弱拟杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌,将细菌生物物质在血琼脂上培养48小时,并随后使用10 μ L环管刮下,并收集在埃彭道夫管中。使用分析天平,将细菌以1:5、1:3、1:1、3:1和5:1(重量:重量)的比率称重到新埃彭道夫管中。所述方法允许检测每个混合物内的每个物种。

[1043] 因此,任选地,本文提供的方法可以用于检测、鉴别和/或表征液体中存在的微生物。任选地,方法可以用于分析液体以确定是否存在任何微生物;和/或鉴别和/或表征所述液体中存在的微生物。如上文所解释,方法任选地包括制备固体样品的处理步骤。任选地,方法可以用于分析包含微生物混合物或由其组成的目标,例如以检测、鉴别和或表征所述混合物中存在的一种或多种或所有不同微生物。

[1044] 心肌磷脂

[1045] 心肌磷脂(1,3-双(sn-3'-磷脂酰基)-sn-甘油)是复杂的双磷脂酰甘油脂质,含有长度和不饱和度不同的四个脂肪酸链。它们主要分布在细菌质膜和真核线粒体内膜中。虽然考虑到存在四个脂肪酰基链,心磷脂结构很可能是复杂的,但一般发现心磷脂轮廓相当简单并且可再现。细菌心肌磷脂主要展现较短碳链长度与大部分饱和或单不饱和脂肪酸。然而,真核细胞主要特征是较长链的多不饱和脂肪酸作为其心肌磷脂的构建基块。使用本文提供的利用REIMS技术装置的方法,基于精确质量测量,在各种革兰氏阳性与革兰氏阴性细菌中检测和鉴别心肌磷脂。通常在 $m/z = 1300-1450$ 之间的质量范围中检测到,对应于CL(60:0)-CL(72:0)的总链长度。

[1046] 举例来说,对于表皮葡萄球菌ATCC 12228,使用碎片化图案进一步确认心肌磷脂的存在。出于此目的,将菌株在BHI培养基上培养,发现BHI培养基与血琼脂相比,心肌磷脂的相对谱强度增加。所鉴别的心肌磷脂物质和碎片化结果在表2中列出。与葡萄球菌属情况下的磷脂酰甘油物质(参见表1)非常一致,仅仅检测到具有饱和脂肪酰基的心肌磷脂。此是预料中的,因为磷脂酰甘油部分形成心肌磷脂的构建基块。

[1047] 绿脓杆菌中的群体感应分子

[1048] 在细菌世界中经由所谓的群体感应(QS quorum-sensing, QS)机制进行细胞到细胞通信是普遍存在的。这些系统依赖于在细胞中和外扩散的小分子的合成,所述小分子通过促进基因表达来促成集体行为。这些分子又称为自体诱导物,因为它们还促成引起其自身合成的基因的表达。还已知QS信号分子跨越原核生物-真核生物的界限,其中它们可以通过促进集体有利行为来帮助细菌存活。已经描述了QS分子的若干化学上不同的分子家族,其中革兰氏阴性细菌中的N-酰基高丝氨酸内酯(N-acylhomoserine lactone, AHL)家族无疑研究得最透彻。已知绿脓杆菌采用AHL与一种更独特的系统,所述更独特的系统连接到前者并利用2-庚基-3-羟基-4(1H)-喹诺酮作为主要功能实体(假单胞菌属喹诺酮信号, PQS)。已知PQS和结构上类似的衍生物调节例如弹性蛋白酶、鼠李糖脂、亲水性凝集素、LecA和颜料绿脓菌素等毒性决定因子的产生。进一步报告其影响生物膜发育和成熟。

[1049] 使用本文提供的利用REIMS技术的方法,在绿脓杆菌中观测到与基于PQS的群体感应系统相关的大量信号。发现这些基于培养基、培养时期、生长模式和菌株而呈不同丰度和组成。图34中给出在多种绿脓杆菌菌株中观测到的不同生长模式的一个实例并且示出了从在相同板上呈小的单个菌落($<1\text{mm}$ 直径)生长的相同菌株的细胞获得和从呈菌苔生长的细胞获得的细胞的谱。虽然在从单个菌落获得的谱的情况下未观测到对应于群体感应分子的信号,但对于呈菌苔图案生长的那些细胞,观测到大量的群体感应分子。已知群体感应分子的产生和所引起的基因表达取决于细胞密度,并且发现其在绿脓杆菌的生物膜中增加;因此观测到的发现与此影响相关。在鼠李糖脂产生的情况下观测到相同影响(参见下文)。

[1050] 发明人已经通过与标准化合物的串联质谱比较,确认了化合物2-庚基喹啉-4

(1H)-酮和2-庚基-3-羟基-4(1H)-喹诺酮(PQS)。羟基壬烯基喹啉($m/z=268$)、羟基壬基喹啉($m/z=270$)和羟基十一碳烯基喹啉($m/z=296$)展示相似的碎片化图案,因此归于结构上相似的化合物。常见碎片包括 m/z 143、157和170。仅仅针对 $[M+H]^+$ 半分子离子,报告在文献中特写的这些化合物的串联质谱。然而,以负离子模式观测到的碎片($m/z=157$ 和170)似乎与以阳离子模式观测到的碎片($m/z=159$ 和172)相关并指示4-羟基-2-烷基喹啉(770)。表8中列出了结构上确认的群体感应分子。此外,在306和332下的 m/z 信号分别展示在 m/z 270和296下的碎片(和在 m/z 157下的常见碎片)(损失36Da)和指示 $[M+Cl]^-$ 加合物的同位素图案。

[1051] 绿脓杆菌中的鼠李糖脂

[1052] 已知如细菌、酵母和真菌等微生物产生不同类型的生物表面活性剂。鼠李糖脂是一类表面活性糖脂,含有一或两种各种长度的3-羟基脂肪酸连接于单鼠李糖或二鼠李糖(Rha)部分。发现其是次级代谢物并且在多种假单胞菌属物种中浓度和组成模式不同。已经报告如一些伯克氏菌属等其它细菌物种产生烷基链比绿脓杆菌产生的鼠李糖脂更长的鼠李糖脂。鼠李糖脂的产生可能与例如生物膜形成、难溶性底物的吸收和生物降解、表面活动性以及针对革兰氏阴性与革兰氏阳性物种和一系列真菌物种呈现抗微生物活性等生理功能相关。

[1053] 鼠李糖脂可能引起在囊肿性纤维化(CF)患者的肺中观测到的发炎相关组织损伤。实际上,CF患者中的鼠李糖脂浓度高:根据报告,在从绿脓杆菌定殖的CF患者获得的痰液样品中发现多达 $8\mu\text{g/mL}$ 鼠李糖脂浓度,并且根据报告,在从CF患者去除的肺的分泌物中发现多达 $65\mu\text{g/mL}$ 。

[1054] 虽然最初被描述成四种同类物的混合物,但更灵敏的分析型技术的发展已进一步发现了约60种鼠李糖脂同源物。

[1055] 本文提供的方法与REIMS一起使用,以分析绿脓杆菌分离株的鼠李糖脂产生。表9中列出鉴别出的鼠李糖脂物种。本发明人确定鼠李糖脂的总谱强度取决于多种因素:观测到单个菌落比呈菌苔生长时鼠李糖脂更少(此影响与群体感应分子的检测和产生相关,参见先前的论点)。还看到鼠李糖脂强度随着培养时期增加而显著增加。然而,不是所有分析的绿脓杆菌菌株都观测到产生鼠李糖脂。鼠李糖脂产生与群体感应设备相关,这是在绿脓杆菌的REIMS谱中也观测到的事实,其中鼠李糖脂的高丰度通常伴有大量的群体感应信号。

[1056] 在图35中能够见到表9中列出的鼠李糖脂物种的碎片化谱。通过与文献中公开的串联质谱比较,确认 $m/z=503$ 和 $m/z=649$ 下的鼠李糖脂。基于相似的碎片化图案,例如鼠李糖部分的损失和酰基链之一的损失,以及精确质量测量,分配其它鼠李糖脂。

[1057] 鼠李糖脂具有若干潜在的生物技术应用,尤其是作为生物可降解的表面活性剂用于工业或医药,或作为产生鼠李糖的可能替代物。因此,根据本发明的筛选方法可以任选地应用于鉴别最佳鼠李糖脂生产者。

[1058] 芽孢杆菌属物种中的脂肽

[1059] 枯草芽孢杆菌是一种重要的革兰氏阳性模式生物体,产生多种抗生素,其中最重要的抗生素是表面活性素,一种环状脂质七肽($\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{HCO}|\text{CH}_2\text{CO-Glu-Leu-D-Leu-Val-Asp-D-Leu-Leu}|$,其中标志'|'表示两个环键结位点)。表面活性素和其异构体是环状脂肽生物表面活性剂,由七个氨基酸单元和一个 β -羟基脂肪酸侧链组成。侧链的碳长度能够在13-15

个碳范围内变化。由于具有疏水性侧链,所以表面活性素能够并入磷脂双层中,在磷脂双层中它们扰乱细胞。它们展示多种活性,例如抗凝剂和免疫抑制剂,以及抵抗癌症、病毒和炎症。表面活性素分子的各种极性官能团允许以正离子与负离子模式迅速电离。枯草芽孢杆菌产生的其它不太相关的抗生素化合物包括丰原素和伊枯草菌素,然而,在REIMS谱中未观测到这些化合物,可能是因为测试菌株中浓度低于检测极限。

[1060] 使用本文提供的利用REIMS技术的方法,本发明人确定枯草芽孢杆菌质谱主要是负离子模式下大约 $m/z=1034$ 和阳离子模式下 $m/z=1059$ 的物种聚类。这些聚类能够分别归于[表面活性素(C15)-H]⁻和[表面活性素(C15)+Na]⁺以及C13和C14同源物,如表10中所示。在阳离子模式下未观测到对应于[M+H]⁺加合物的质子化半分子离子。这是因为表面活性素对钠阳离子的亲和力高并且在所有活的生物体和培养基中钠的丰度高。通过串联质谱测量进一步确认表面活性素和其同源物的存在。在负离子模式下观测到的碎片化图案与文献中报告的碎片化图案非常一致。

[1061] 表11提供了在地衣芽孢杆菌中使用本文提供的利用REIMS技术的方法检测到的地衣素化合物的细节。因此,本文提供的方法可以任选地用于区别各种芽孢杆菌属物种。尤其是区别枯草芽孢杆菌与地衣芽孢杆菌。这是使用常规方法难以实现的。

[1062] 聚羟基烷酸酯聚合物

[1063] 聚羟基烷酸酯或PHA是自然界中,通常结合例如氮气等非碳养分不足,由糖或脂质的细菌发酵产生的线性聚酯。它们由细菌产生以存储碳和能量。这些塑料是生物可降解的,并用于产生生物塑料。PHA最简单并且最常存在的形式是发酵产生聚-β-羟基丁酸盐(聚-3-羟基丁酸盐,P3HB)。然而,已经报告超过100种不同单体作为PHA成分。一般来说,PHA根据单体碳链长分类成三种不同类别:短(C3-C5)、中等(C6-C14)和长(C>14)链PHA。已经报告超过90种古细菌和真细菌种类(革兰氏阳性与革兰氏阴性)产生PHA。

[1064] 使用本文提供的利用REIMS技术的方法,本发明人检测到由C₄H₆O₂(聚羟基丁酸酯)单体组成的聚合物,在蜡样芽孢杆菌菌株、食酸代尔夫特、洋葱伯克氏菌和氧化木糖无色杆菌中量不同。本文提供的利用REIMS技术的方法检测若干细菌物种中聚合物产生的能力为生物技术应用提供了快速筛选生物体以成功产生聚合物、平均聚合物链长和改性和/或最佳聚合物生产者的机会。

[1065] 分类单元特异性标记物的获得

[1066] 图33中显示用于发现分类单元特异性标记物之通用工作流程。将所有数据汇集并产生记录的>4,000个细菌和真菌菌株的代表性亚群。接着是峰挑选和峰匹配程序和基于ANOVA的生物标记物发现,以获得分类单元特异性标记物。

[1067] 产生包含228个不同细菌物种的大数据集,所述细菌物种属于80个属、47个科、23个目、11个纲和5个门。最大五到七个个别菌株用于计算不良表示的属,而最大每个物种3个菌株用于良好表示的属(10个物种或更多)。不同培养基、培养时期和培养气氛包括到样品集中。

[1068] 为获得分类单元特异性标记物,数据以质心而非分布图模式处理。为此,通过ProteoWizard msconvert工具(3.0.4043版)将原始质谱文件转码成mzXML格式。

[1069] 对每个单独文件内的个别谱进行峰挑选,其中对 m/z 值的每个集合和对应强度值进行处理。根据局部最小值或零强度值确定局部最大值和最大值两侧的峰边界。峰强度计

算为两个边界之间的总和,其中边界强度减半(仅仅对于未分辨峰具有意义;分辨峰边界是0)。峰的‘质量中心’借助于强度加权平均值测定。处理单个m/z XML文件的所有谱后,使用动态规划算法比对个别m/z和强度向量。使用者指定最大峰值位移(ppm),其充当峰能够匹配的最大距离。如果比较多种文件,那么使用相同参数再运行峰匹配算法。

[1070] 每个变量最初通过单向方差分析(ANOVA)独立地分析,以确定所界定的群组(例如细菌物种)的平均值之间是否存在显著差异。通过杜克真实显著差异(Tukey's honestly significant difference, HSD)事后方法来进一步分析显著差异(例如 $p < 0.05$)。HSD提供了关于置信区间的信息,并且如果此区间跨越零,那么两个平均值之间的差异被视为不显著。测定所有群组之间每个变量的差异。因此,一个群组与所有其它群组之间显著差异的变量被视为是可能候选生物标记物。每个变量的结果以ANOVA p值(即群组平均值存在显著差异。NB其未鉴别出实际差异)和显著差异的群组平均值的数目传回。重点放在一个群组中比其它群组中显著更高的变量,而非除一个分类学群组外在所有群组中不存在的变量。

[1071] 对于每个分类层级,产生每个分类单元20个最显著峰和数据集中150个最显著峰的列表并手动汇集成在不同分类层级上特异性的标记物。尝试性地使用精确质量测量、文献研究和在总脂质提取物的LC/MS实验期间或在沃特斯Xevo G2-XS仪器上使用REIMS获得的串联质谱测量分配质谱信号。汇集在不同分类层级下的大部分特异性标记物的列表,随后将这些标记物在结肠直肠癌肿瘤切除样品和胃肠道活检样品中可视化,以测试这些分类单元的存在或不存在。因为使用m/z 200-1000的质量范围记录这些成像数据集,所以分类单元特异性标记物的鉴别限于相同质量范围。

[1072] 单离子图像和RGB图像使用MSiReader 0.05版(135)以线性插值法(1阶)和0.005Da面元大小产生。

[1073] 应用PCA以最初评估REIMS谱分布图和在不同更高分类层级(例如革兰氏、门、纲和目层级)上细菌物种之间的相似性。

[1074] 沿着第一主成分,获得革兰氏阳性和革兰氏阴性物种总体上良好的分离。还鉴别出较低分类单元,例如目、科、属、种或菌株的良好分类标记物。

[1075] 举例来说,m/z=618.5233(羟基化神经酰胺物质,C₃₆H₇₃N₄O₄Cl,呈[M+Cl]⁻)指示存在拟杆菌目的成员,而m/z=820.7522指示拟杆菌科的成员。对应于α-半乳糖基神经酰胺的m/z=752.5449指示脆弱拟杆菌。

[1076] 鉴别生物标记物的以下实例。

[1077] 首先,分枝菌酸,用于属于棒状杆菌亚目的细菌,如分枝杆菌属、棒状杆菌属和红球菌属。确切地说,以下分枝菌酸已经从对应属检测到:

[1078] 分枝杆菌属:C77-C81(偶数和奇数编号,0-2不饱和度);棒状杆菌属:C28-C36(偶数编号,0-2不饱和度);

[1079] 诺卡氏菌属:C48-C56(偶数编号,0-3不饱和度);

[1080] 红球菌属:C28-C38(偶数和奇数编号,0-4不饱和度)。

[1081] 其次,发现多种鞘脂物种是拟杆菌门的成员所特有的。这些鞘脂包括氧化神经酰胺物质、磷酸乙醇胺二氢神经酰胺和C15:0取代的磷酸甘油二氢神经酰胺和二氢神经酰胺。在那些鞘脂物质中,发现一系列半乳糖化鞘脂是脆弱拟杆菌(脆弱拟杆菌α-半乳糖神经酰胺)所特有的。

[1082] 第三,在细菌中,缩醛磷脂是厌氧细菌,如梭菌属和梭杆菌属高度特有的。这是由于好氧细菌失去缩醛磷脂合成所需的生物化学通路的事实。虽然人类能够合成缩醛磷脂(尽管通过与厌氧菌不同的生物化学通路),但一般发现这些缩醛磷脂的链长度比细菌缩醛磷脂长。

[1083] 指示某一细菌群的其它生物标记物包括例如特定地由某些芽孢杆菌物种产生的脂肽,如枯草芽孢杆菌产生的表面活性素和地衣芽孢杆菌产生的地衣素。产生这两种分子也使得能够简单明了地区别这些在其它方面极密切相关的细菌。另一实例包括针对绿脓杆菌所发现的PQS衍生的群体感应分子以及单鼠李糖脂和二鼠李糖脂物质。

[1084] 结果示于表1以及下列等等。

[1085] 支原体感染的细胞系的分析

[1086] 细胞培养物时常受支原体感染,支原体是一种在细胞膜周围缺乏细胞壁的细菌种类。支原体感染能够改变许多生理过程,因此在使用感染细胞进行研究的情况下导致误导性实验结果。PIasmocin (RTM) (InvivoGen,美国加利福尼亚州圣地亚哥 (San Diego, CA, USA)) 是一种常用于根除细胞培养物中的支原体感染的市售抗生素治疗剂。本文提供的使用REIMS技术的方法用于从无支原体、支原体感染和PIasmocin (RTM) 治愈的海拉和HEK细胞系产生谱数据。

[1087] 进行ANOVA测试以确定支原体阳性和阴性样品之间的显著差异。使用适应性本亚明-霍赫贝格 (Benjamini-Hochberg; BH) 程序获得经调整的p值以针对多个测试进行校正。图36示出了在 $m/z = 747.5183$ 的情况下,支原体感染的PIasmocin (RTM) 治疗过程中的时间依赖性原始强度。

[1088] 取样点#1对应于第1天和原始支原体阳性或阴性样品并且取样点#2对应于第2天和添加PIasmocin (RTM) 抗生素。取样点#3对应于第3天。取样点#4对应于去除PIasmocin (RTM) 抗生素。取样点#5对应于所有样品是无PIasmocin (RTM) 的。

[1089] 如图37A所示,23和386分仓 m/z 信号分别在支原体感染的HEK和海拉细胞中显著较高。较高数目的显著增加的峰可以由较高数目的取样点(引起显著性测试中的较高功率)解释或可以反映海拉细胞对支原体感染的反应性增加。有趣的是,我们发现在支原体感染的细胞系中没有显示强度减弱的信号($p = 0.15$)。表13列出发现跨越所有支原体感染的细胞($p = 1.37E-20$)显著增加的18个 m/z 信号的注解。举例来说,无支原体、支原体感染和PIasmocin™治疗的HEK和海拉细胞中显示 m/z 819.52(基于精确质量测量鉴别为PG (40:7))的强度变化(图38A及B)。发现此 m/z 值连同对应于其同位素的信号在支原体感染的海拉和HEK细胞中增加,而强度在成功的PIasmocin™治疗后返回到感染前的水平。对于表13中示出的其它 m/z 信号获得类似结果。

[1090] 在这些 m/z 信号的18维空间中,通过PCA分析支原体感染和无支原体的HEK和海拉样品(图37B)。第一主成分(PC1)在两个不同细胞系之间展现差异,而第二PC分离无支原体和支原体感染的样品。

[1091] 发现这些物质的谱强度的趋势在健康和感染细胞系的情况下显著不同,表明脂质代谢已被支原体感染扰乱。以上方法表明本文提供的方法能够用于研究支原体感染期间的变化和用于支原体筛选。

[1092] 人类结肠直肠组织样本中的细菌的检测

[1093] 本发明人尝试将人类结肠直肠组织样本中的细菌的存在和分布可视化。已知细菌覆盖肠中的粘膜,并且肠微生物菌落无疑是研究和表征最为深入的。分析通过产生表14中列出的分类标记物的单离子图像来进行。能够在>90%分析的结肠直肠样本中,包括健康和癌变组织样本中将细菌可视化。在癌性样本之间,基本上发现细菌位于被H&E染色的组织切片的组织病理学检查鉴别为坏死的区域。然而,还经常沿着健康粘膜检测到细菌。

[1094] 坏死组织的分析

[1095] 图39示出了来源于在右半结肠切除术期间解剖的肿瘤的中央的癌组织样品的组织类型分布。组织病理学检查揭露存在癌性和基质组织。

[1096] 坏死组织区域以及周围癌性和基质组织的质谱展示于图39中并且显示坏死区域与活人体组织相比,磷脂组成显著不同,即甘油磷脂含量显著减少和在 $m/z=500-700$ 的质量范围中多种较低分子量的鞘脂衍生的分类标记物物质。

[1097] 当这些分类标记物可视化时,发现对应的单离子图像主要显示分类标记物分子和因此细菌细胞的共同定位。图40中显示同源分子的一系列共同定位的单离子图像,并能够归于拟杆菌门。发现异-C15:0取代的磷酸甘油二氢神经酰胺是紫单胞菌科特有的(拟杆菌门的一部分),在本研究中,仅仅由副拟杆菌属表示。然而,报告所提到的化合物高丰度存在于牙龈卟啉单胞菌中,表明此标记物对此科的通用性。在宏基因组研究报告拟杆菌门的成员占肠微生物群落多达50%。然而,未检测到脆弱拟杆菌的分类单元特异性标记物,表明当前的拟杆菌门细菌不含高量的机会性病原体脆弱拟杆菌。

[1098] 图41示出了在那些二氢神经酰胺与具有两个更多的双键(或同等物)的相关化合物之间发现是拟杆菌门所特有的其它分类标记物的单离子图像。发现 $m/z=639.4954$ 下的化合物是前面提及的 $m/z=653.5113$ 下的脂质物质的同源物。 $m/z=566.4790$ 下的信号指示存在黄杆菌纲的成员。另外发现梭菌目和梭杆菌纲的特定缩醛磷脂物质,以及示出了肠杆菌目特异性的奇数编号的PE。所有这些细菌类别都能够在厌氧条件下存活,并且报告它们是人类肠微生物组的主要组分。

[1099] 虽然拟杆菌门的成员基本上聚类在其中鉴别到坏死区域的组织切片的左侧,但在组织切片内更居中的点处另外检测到梭菌目和梭杆菌纲,因此确认不是所有细菌物种都展示一致定位的预期。在坏死组织区域中观测到的大量细菌存在假设与缺乏人体的免疫反应相关,缺乏人体的免疫反应使得细菌能够基本上不受控地繁殖。

[1100] 健康粘膜中的细菌的检测

[1101] 图39示出了源自右侧半结肠切除术的健康组织样本的组织类型分布。样本源自距离肿瘤中央5cm处的健康结肠组织。组织病理学检查揭露健康粘膜和粘膜下层,由粘膜肌层分隔。另外,能够观测到两个集合淋巴结(炎症)。

[1102] 图40示出了在此样品中检测到的那些分类单元特异性标记物的单离子图像。一般来说,观测到强度信号比坏死组织远少得多。此假设归因于健康免疫反应,健康免疫反应限制如在坏死组织样本中观测到的无限的细菌生长。然而,仍然能够检测到共生人类微生物组的两个主要细菌组分,即拟杆菌门和梭菌科的成员。

[1103] 针对此样品进行宏基因组表征,并确认大量拟杆菌门、变形菌门和厚壁菌门的存在,在纲层级上基本上分别归于梭菌纲、拟杆菌纲和 γ -变形菌门。

[1104] 本研究证明分子物质在微生物脂质组与人体组织脂质组之间显著不同。显示多种

细菌类型的分类单元特异性标记物不存在于人类脂质组/代谢物组中,因此能够用于将人类样品中的细菌的存在可视化,如针对人类结肠直肠组织所示。进一步证明通过REIMS技术获得分类标记物能够与例如DESI等检测脂质分布图的其它质谱电离技术结合使用。

[1105] 使用DESI检测细菌

[1106] 图43A示出了根据一个实施例的拭子上的细菌(肺炎克雷伯氏菌)样品的解吸电喷雾电离(“DESI”)质谱分析。图43A中示出的数据表明,根据各个实施例,能够使用解吸电喷雾电离(“DESI”)质谱法检测拭子上的细菌样品。图43B示出了直接从琼脂板测量的相应细菌样品的快速蒸发电离质谱(“REIMS”)与飞行时间(“TOF”)质谱法数据的比较。两种电离技术均检测到了用星号突出显示的峰。

[1107] 在所培养的六个物种上进一步测试解吸电喷雾电离(“DESI”)拭子分析用于微生物检测,这六个物种包括白色念珠菌、蒙氏假单胞菌、表皮葡萄球菌、卡他莫拉菌、肺炎克雷伯氏菌以及乳酸杆菌属。这些物种全是重要的细菌和真菌物种,它们从妊娠患者的阴道粘膜中分离出来并通过序列分析,如16S rRNA基因定序进行鉴别。

[1108] 将拭子快速地浸渍到来自每个物种的经过稀释的生物质于10 μ L甲醇中的溶液中,接着对拭子表面进行解吸电喷雾电离(“DESI”)质谱分析。

[1109] 图44A-C示出了使用解吸电喷雾电离(“DESI”)质谱对拭子进行的微生物分析。

[1110] 图44A示出了所分析的不同微生物物种的平均解吸电喷雾电离(“DESI”)质谱,这些物种包括白色念珠菌、蒙氏假单胞菌、表皮葡萄球菌、卡他莫拉菌、肺炎克雷伯氏菌以及乳酸杆菌属。

[1111] 图44B和图44C示出了PCA图,显示在前两个成分内阴道粘膜(妊娠和非妊娠组)与微生物物种之间的分离。另外,能够观测到不同细菌与真菌物种之间的分离。

[1112] 在如图44A中所示的质谱中观测到独特的谱特征,从而能够在不同微生物类别之间进行区分,以及PCA分数图(图44B和图44C)中在前两个成分内与阴道粘膜区分。

[1113] 此结果说明在医用拭子上能够使用解吸电喷雾电离(“DESI”)质谱表征来自动物(例如人)粘膜的特定微生物(例如细菌)群落的微生物(例如细菌)特异性和宿主反应代谢物生物标记物和特征。

[1114] 数据分析的实例

[1115] 将原始质谱文件转化成mzML格式,随后呈imzML格式(REF)输入MATLAB(马萨诸塞州内蒂克的迈斯沃克(Mathworks,Natick,MA);<http://www.mathworks.co.uk/>)以进行数据预处理。所有REIMS谱线性内插到0.01Da的常用取样间隔。接着递归逐段峰对齐用于跨越谱分布图去除峰位置的小质量位移。对齐的数据经受总离子计数(total ion count;TIC)数据标准化和基于对数的变换。在Matlab或RStudio(美国马萨诸塞州波士顿(Boston,MA,USA),也参见www.r-project.com)中进行图案识别分析和可视化。仅仅m/z 150-1000的质量范围用于数据分析。对于自我鉴别实验,对数据集进行过滤以保留减小的m/z值集合:如果基于克鲁斯卡尔-沃利斯检验(Kruskal-Wallis test),可用样品之间的差异在 $\alpha=0.01$ 阈值水平下显著不同,那么保留m/z值。

[1116] 基于精确质量测量(质量偏差 <3 ppm)和MS/MS碎片化图案鉴别质谱中的离子种类。

[1117] 使用REIMS分析粪便

- [1118] 1. 取样, 例如10 μ I环管新鲜粪便或冷冻情况下解冻的粪便样品。
- [1119] 2. 如果使用基于钳子的REIMS, 那么在钳子之间取少量并将探针一起抽取。
- [1120] 3. 例如使用先前针对REIMS描述的参数执行REIMS分析。
- [1121] 图45示出了当使用REIMS分析粪便样品时观测到的谱图。
- [1122] 血培养球粒的REIMS分析
- [1123] 目标: 此方案描述了使用REIMS分析对血培养样品进行分析的程序的一特定实例。
- [1124] 最初, 将10mI去纤维蛋白的马血用单个微生物菌落接种。在37 $^{\circ}$ C下有氧生长24小时。然后, 将11马血用1mI隔夜培养物接种。在37 $^{\circ}$ C下和在时间0下有氧生长, 并且此后每小时移出25mI以用以下方式分析:
- [1125] a. 将10mI转移到50法尔康管 (faIcon tube) 并在3,2000g下样品离心10分钟。如下所述使用REIMS分析球粒。
- [1126] b. 使用HPLC水制备2.5%微生物学级别琼脂溶液并加热直到溶液达到50 $^{\circ}$ C。使之静置1分钟以去除气泡。然后, 添加2mI到8mI上述血液培养物并通过移液轻缓地混合。倾注到小的琼脂板中并使之静置15分钟。使用此进行REIMS分析。
- [1127] c. 利用1mI此溶液, 使用分子级水连续稀释到10 $^{-6}$, 并且各100 μ I涂铺到血琼脂板上。培育24小时, 接着计数菌落数目以确定CFU。
- [1128] d. 使用另外2mI血液培养物并在-80 $^{\circ}$ C下冷冻供LC-MS分析。
- [1129] 可以在离心球粒和/或琼脂糖块上进行REIMS分析。
- [1130] 尽管已经参考优选实施例描述了本发明, 但所属领域的技术人员应了解, 可以在不脱离所附权利要求书中所阐述的本发明的范围的情况下对形式和细节作出各种改变。
- [1131] 表1: 生物标记物: 磷脂和其质谱信号的表
- [1132] 若干分析的微生物物种在质量范围m/z=600-900内检测到的鉴别的磷脂。仅包括具有>5%的相对丰度和最丰富的酰基链组合的磷脂。细菌生长的固体生长培养基以圆括号给出。当脂质组合物以总碳数而不是个别酰基链形式给出时, ID仅基于精确质量。

[1133]

标称质量	克氏柠檬酸杆菌	大肠杆菌	肺炎克雷伯氏菌	奇异变形杆菌	绿脓杆菌	粘质沙雷氏菌	金黄色葡萄球菌	无乳链球菌	酿脓链球菌
<i>m/z</i>	(CBA)	(CBA)	(LB)	(MCC)	(LB)	(MCC)	(CBA)	(CBA)	(CBA)
645									PA(32:1)*
659			PA(16:0/17:1)	PA(16:0/17:1)		PA(16:0/17:1)			
661							PA(33:0)*		
665									PG(12:0/16:0)
671									PA(34:2)*
673				PA(16:0/18:1)	PA(16:0/18:1)				PA(16:0/18:1)*
675							PG(15:0/15:0-H ₂ O)		PG(30:0-H ₂ O)*
688	PE(16:1/16:0)			PE(16:1/16:0)					
691									PG(14:0/16:1)
693	PG(16:0/14:0)		PG(16:0/14:0)				PG(15:0/15:0)	PG(15:0/15:0)	PG(14:0/16:0)
697									PA(36:3)*

[1134]

699									PA(18:1/18:1)*
701								PG(32:1)-H ₂ O*	PG(32:1)-H ₂ O*
702	PE(16:0/ 17:1)	PE(16:0/ 17:1)	PE(16:0/ 17:1)	PE(16:0/ 17:1)		PE(16:0/ 17:1)			
707							PG(15:0/ 16:0)		
716	PE(18:1/ 16:0)			PE(18:1/ 16:0)	PE(18:1/ 16:0)	PE(17:0/ 17:1)			
717								PG(32:2)*	PG(16:1/16:1)
719	PG(16:1/ 16:0)	PG(16:1/ 16:0)	PG(16:0/ 16:1)	PG(16:0/ 16:1)	PG(16:0/ 16:1)	PG(16:0/ 16:1)		PG(16:0/16:1)	PG(16:0/16:1)
721							PG(15:0/ 17:0)	PG(15:0/17:0)	PG(16:0/16:0)
725									PA(16:1/18:2)
727									PG(16:1/ 18:1)-H ₂ O
729								PG(16:0/ 18:1)-H ₂ O*	PG(16:0/ 18:1)-H ₂ O
730				PE(16:0/ 19:1)					
733	PG(16:0/ 17:1)	PG(16:0/ 17:1)	PG(16:0/ 17:1)	PG(16:0/ 17:1)	PG(16:0/ 17:1)	PG(16:0/ 17:1)			
735							PG(15:0/ 18:0)		
743								PG(16:0/18:3)	PG(16:1/18:2)
745	PG(16:1/ 18:1)	PG(16:1/ 18:1)	PG(16:1/ 18:1)		PG(16:1/ 18:1)	PG(16:1/ 18:1)		PG(16:0/18:2)*	PG(16:1/18:1)
747	PG(16:0/ 18:1)	PG(16:0/ 18:1)	PG(16:0/ 18:1)	PG(16:0/ 18:1)	PG(16:0/ 18:1)	PG(16:0/ 18:1)		PG(16:0/18:1)	PG(16:0/18:1)
749							PG(15:0/ 19:0)	PG(15:0/19:0)	PG(16:0/18:1)*
752									
759		PG(17:1/ 18:1)	PG(17:1/ 18:1)		PG(17:1/ 18:1)	PG(17:1/ 18:1)			
761		PG(16:0/ 19:1)	PG(16:0/ 19:1)	PG(16:0/ 19:1)	PG(16:0/ 19:1)	PG(16:0/ 19:1)			
763							PG(15:0/ 20:0)		
770									PE(38:2)*
771								PG(36:3)*	PG(18:1/18:1)*
773	PG(18:1/ 18:1)	PG(18:1/ 18:1)	PG(17:1/ 19:1)		PG(17:1/ 19:1)	PG(18:1/ 18:1)		PG(36:2)*	PG(18:1/18:1)
775								PG(36:1)*	PG(18:0/18:1)
787			PG(18:1/ 19:1)						
801			PG(19:1/ 19:1)						

[1135] *信号强度不足以获得有意义的MS/MS数据;缩写:PG=磷脂酰甘油,PE=磷脂酰乙醇胺,CBA=哥伦比亚血琼脂,LB=溶源性肉汤琼脂,MCC=McConkey琼脂。

[1136] 表2:生物标记物:磷脂和其质谱信号的表

[1137] 针对表皮葡萄球菌ATCC 12228鉴别的心磷脂物质。

[1138]

化合物	总式	精确质量 [M-H]-	实验质量	质量偏差
CL(62:0)	C ₇₁ H ₁₃₈ O ₁₇ P ₂	1323.9335	1323.9268	5.0 ppm
CL(63:0)	C ₇₂ H ₁₄₀ O ₁₇ P ₂	1337.9492	1337.9426	4.9 ppm
CL(64:0)	C ₇₃ H ₁₄₂ O ₁₇ P ₂	1351.9649	1351.9601	3.6 ppm
CL(65:0)	C ₇₄ H ₁₄₄ O ₁₇ P ₂	1365.9806	1365.9758	3.5 ppm
CL(66:0)	C ₇₅ H ₁₄₆ O ₁₇ P ₂	1379.9962	1379.9913	3.5 ppm
CL(67:0)	C ₇₆ H ₁₄₈ O ₁₇ P ₂	1394.0119	1394.0070	3.5 ppm
CL(68:0)	C ₇₇ H ₁₅₀ O ₁₇ P ₂	1408.0275	1408.0238	2.6 ppm
CL(69:0)	C ₇₈ H ₁₅₂ O ₁₇ P ₂	1422.0432	1422.0400	2.3 ppm
CL(70:0)	C ₇₉ H ₁₅₄ O ₁₇ P ₂	1436.0588	1436.0561	1.9 ppm
CL(71:0)	C ₈₀ H ₁₅₆ O ₁₇ P ₂	1450.0745	1450.0748	0.2 ppm
CL(72:0)	C ₈₁ H ₁₅₈ O ₁₇ P ₂	1464.0900	1464.0970	4.8 ppm

[1139] 表3:生物标记物:分枝菌酸和其质谱信号的表如在不同棒状杆菌物种中检测的鉴别的分枝菌酸。

[1140]

化合物	总式	精确质量 [M-H]-	实验质量	质量偏差	MS/MS 碎片
α-分枝菌酸 C28:0	C ₂₈ H ₅₅ O ₃	439.415669	439.4159	0.5 ppm	-
α-分枝菌酸 C30:0	C ₃₀ H ₅₉ O ₃	467.446969	467.4473	0.7 ppm	227 (C14:0)、255 (C16:0)
α-分枝菌酸 C32:1	C ₃₂ H ₆₁ O ₃	493.462619	493.4634	1.6 ppm	-
α-分枝菌酸 C32:0	C ₃₂ H ₆₃ O ₃	495.478269	495.4786	0.7 ppm	255 (C16:0)
α-分枝菌酸 C34:2	C ₃₄ H ₆₃ O ₃	519.478269	519.4788	1.0 ppm	-
α-分枝菌酸 C34:1	C ₃₄ H ₆₅ O ₃	521.493919	521.4942	0.5 ppm	255 (C16:0)、281 (C18:1)
α-分枝菌酸 C36:2	C ₃₆ H ₆₇ O ₃	547.509569	547.5102	1.2 ppm	281 (C18:1)

[1141] 表4:生物标记物:分枝菌酸和其质谱信号的表如在红球菌属物种中检测到的鉴别的分枝菌酸。

[1142]

化合物	总式	精确质量 [M-H]-	实验质量	质量偏差
α-分枝菌酸 C28:0	C ₂₈ H ₅₆ O ₃	439.4157	439.4159	0.5 ppm
α-分枝菌酸 C30:1	C ₃₀ H ₅₈ O ₃	465.4313	465.4315	0.4 ppm
α-分枝菌酸 C30:0	C ₃₀ H ₆₀ O ₃	467.4470	467.4472	0.4 ppm
α-分枝菌酸 C31:1	C ₃₁ H ₆₀ O ₃	479.4470	479.4473	0.6 ppm
α-分枝菌酸 C31:0	C ₃₁ H ₆₂ O ₃	481.4626	481.4630	0.8 ppm
α-分枝菌酸 C32:2	C ₃₂ H ₆₀ O ₃	491.4470	491.4475	1.0 ppm
α-分枝菌酸 C32:1	C ₃₂ H ₆₂ O ₃	493.4626	493.4634	1.6 ppm
α-分枝菌酸 C32:0	C ₃₂ H ₆₄ O ₃	495.4783	495.4786	0.6 ppm
α-分枝菌酸 C33:2	C ₃₃ H ₆₂ O ₃	505.4626	505.4630	0.8 ppm
α-分枝菌酸 C33:1	C ₃₃ H ₆₄ O ₃	507.4783	507.4785	0.4 ppm
α-分枝菌酸 C33:0	C ₃₃ H ₆₆ O ₃	509.4939	509.4943	0.8 ppm
α-分枝菌酸 C34:3	C ₃₄ H ₆₂ O ₃	517.4626	517.4632	1.2 ppm
α-分枝菌酸 C34:2	C ₃₄ H ₆₄ O ₃	519.4783	519.4788	1.0 ppm

[1143]

α -分枝菌酸 C34:1	$C_{34}H_{66}O_3$	521.4939	521.4944	1.0 ppm
α -分枝菌酸 C34:0	$C_{34}H_{68}O_3$	523.5096	523.5100	0.8 ppm
α -分枝菌酸 C35:3	$C_{35}H_{64}O_3$	531.4783	531.4784	0.2 ppm
α -分枝菌酸 C35:2	$C_{35}H_{66}O_3$	533.4939	533.4946	1.3 ppm
α -分枝菌酸 C35:1	$C_{35}H_{68}O_3$	535.5096	535.5100	0.7 ppm
α -分枝菌酸 C35:0	$C_{35}H_{70}O_3$	537.5252	537.5259	1.3 ppm
α -分枝菌酸 C36:3	$C_{36}H_{66}O_3$	545.4939	545.4944	0.9 ppm
α -分枝菌酸 C36:2	$C_{36}H_{68}O_3$	547.5096	547.5102	1.1 ppm
α -分枝菌酸 C36:1	$C_{36}H_{70}O_3$	549.5252	549.5260	1.5 ppm
α -分枝菌酸 C36:0	$C_{36}H_{72}O_3$	551.5409	551.5424	2.7 ppm
α -分枝菌酸 C37:3	$C_{37}H_{68}O_3$	559.5096	559.5102	1.1 ppm
α -分枝菌酸 C37:2	$C_{37}H_{70}O_3$	561.5252	561.5257	0.9 ppm
α -分枝菌酸 C37:1	$C_{37}H_{72}O_3$	563.5409	563.5418	1.6 ppm
α -分枝菌酸 C37:0	$C_{37}H_{74}O_3$	565.5565	565.5573	1.4 ppm
α -分枝菌酸 C38:4	$C_{38}H_{74}O_3$	571.5096	571.5098	0.3 ppm
α -分枝菌酸 C38:3	$C_{38}H_{74}O_3$	573.5252	573.5261	1.6 ppm
α -分枝菌酸 C38:2	$C_{38}H_{74}O_3$	575.5409	575.5415	1.0 ppm
α -分枝菌酸 C38:1	$C_{38}H_{74}O_3$	577.5565	577.5579	2.4 ppm
α -分枝菌酸 C39:2	$C_{38}H_{76}O_3$	589.5565	589.5578	2.2 ppm

[1144] 表5:生物标记物:分枝菌酸和其质谱信号的表如在诺卡氏菌属物种中检测到的鉴别的分枝菌酸。

[1145]

化合物	总式	精确质量 [M-H]-	实验质量	质量偏差
α -分枝菌酸 C48:3	$C_{48}H_{90}O_3$	713.6817	713.6797	2.8 ppm
α -分枝菌酸 C48:2	$C_{48}H_{92}O_3$	715.6974	715.6959	2.1 ppm
α -分枝菌酸 C50:3	$C_{50}H_{94}O_3$	741.7130	741.7114	2.2 ppm
α -分枝菌酸 C50:2	$C_{50}H_{96}O_3$	743.7287	743.7285	0.3 ppm
α -分枝菌酸 C52:3	$C_{52}H_{94}O_3$	769.7443	769.7430	1.7 ppm
α -分枝菌酸 C52:2	$C_{52}H_{96}O_3$	771.7600	771.7588	1.6 ppm
α -分枝菌酸 C53:3	$C_{53}H_{96}O_3$	783.7600	783.7596	0.5 ppm
α -分枝菌酸 C53:2	$C_{53}H_{94}O_3$	785.7756	785.7754	0.3 ppm
α -分枝菌酸 C54:4	$C_{54}H_{96}O_3$	795.7600	795.7594	0.8 ppm
α -分枝菌酸 C54:3	$C_{54}H_{98}O_3$	797.7756	797.7739	2.1 ppm
α -分枝菌酸 C54:2	$C_{54}H_{100}O_3$	799.7913	799.7902	1.4 ppm
α -分枝菌酸 C55:4	$C_{54}H_{102}O_3$	809.7756	809.7748	1.0 ppm
α -分枝菌酸 C55:3	$C_{54}H_{104}O_3$	811.7913	811.7907	0.7 ppm
α -分枝菌酸 C55:2	$C_{54}H_{106}O_3$	813.8069	813.8061	1.0 ppm
α -分枝菌酸 C56:5	$C_{56}H_{102}O_3$	821.7756	821.7748	1.0 ppm
α -分枝菌酸 C56:4	$C_{56}H_{104}O_3$	823.7913	823.7907	0.7 ppm
α -分枝菌酸 C56:3	$C_{56}H_{106}O_3$	825.8069	825.8053	1.9 ppm
α -分枝菌酸 C56:2	$C_{56}H_{108}O_3$	827.8226	827.8213	1.6 ppm
α -分枝菌酸 C57:4	$C_{57}H_{106}O_3$	837.8069	837.8050	2.3 ppm
α -分枝菌酸 C57:3	$C_{57}H_{108}O_3$	839.8226	839.8215	1.3 ppm

[1146]

α -分枝菌酸 C58:5	$C_{58}H_{106}O_3$	849.8069	849.8068	0.1 ppm
α -分枝菌酸 C58:4	$C_{58}H_{108}O_3$	851.8226	851.8218	0.9 ppm
α -分枝菌酸 C58:3	$C_{58}H_{110}O_3$	853.8382	853.8375	0.8 ppm
α -分枝菌酸 C59:3	$C_{59}H_{112}O_3$	867.8539	867.8537	0.2 ppm
α -分枝菌酸 C60:4	$C_{60}H_{112}O_3$	879.8539	879.8537	0.2 ppm
α -分枝菌酸 C60:3	$C_{60}H_{114}O_3$	881.8695	881.8683	1.4 ppm

[1147] 表6:生物标记物:分枝菌酸和其质谱信号的表

[1148] 如在不同分枝杆菌属物种中检测的鉴别的分枝菌酸。

[1149]

化合物	总式	精确质量 [M-H] ⁻	实验质量	质量偏差
α -分枝菌酸 C77:2	C ₇₇ H ₁₅₀ O ₃	1122.1512	1122.1525	1.2 ppm
α -分枝菌酸 C78:2	C ₇₈ H ₁₅₂ O ₃	1136.1669	1136.1684	1.3 ppm
α -分枝菌酸 C79:2	C ₇₉ H ₁₅₄ O ₃	1150.1825	1150.1833	0.7 ppm
环氧基/酮基-分枝杆菌 C79:1 或 甲氧基-分枝杆菌 C79:2	C ₇₉ H ₁₅₄ O ₄	1166.1774	1166.1769	0.4 ppm
环氧基/酮基-分枝杆菌 C80:1 或 甲氧基-分枝杆菌 C80:2	C ₈₀ H ₁₅₆ O ₄	1180.1931	1180.1897	2.9 ppm
环氧基/酮基-分枝杆菌 C81:1 或 甲氧基-分枝杆菌 C81:2	C ₈₁ H ₁₅₈ O ₃	1194.2087	1194.2102	1.3 ppm

[1150] 表7:生物标记物:鞘脂和其质谱信号的表

[1151] 拟杆菌门的成员中的鉴别的鞘脂物种。

[1152]

式	实验质量	精确质量	质量偏差	观测的物种
神经酰胺磷酸乙醇胺/磷酸乙醇胺二氢神经酰胺 (PE-DHC)				
C ₃₆ H ₇₄ N ₂ O ₇ P ⁻	677.5253	677.5239	2.0	脆弱拟杆菌、卵形拟杆菌、多形拟杆菌、单形拟杆菌、普通拟杆菌、二路普雷沃氏菌、扭曲副拟杆菌
C ₃₇ H ₇₆ N ₂ O ₇ P ⁻	691.5411	691.5396	2.2	
C ₃₈ H ₇₈ N ₂ O ₇ P ⁻	705.5569	705.5552	2.4	
神经酰胺				
C ₃₄ H ₆₉ NO ₄ Cl ⁻	590.4934 ^a	590.4921	2.2	脆弱拟杆菌、卵形拟杆菌、多形拟杆菌、单形拟杆菌、普通拟杆菌、二路普雷沃氏菌、扭曲副拟杆菌
C ₃₅ H ₇₁ NO ₄ Cl ⁻	604.5090	604.5077	2.1	
C ₃₆ H ₇₃ NO ₄ Cl ⁻	618.5246	618.5234	1.9	
脆弱拟杆菌 α-半乳糖神经酰胺				
C ₄₀ H ₇₉ NO ₉ Cl ⁻	752.5465	752.5449	2.1	脆弱拟杆菌
C ₄₁ H ₈₁ NO ₉ Cl ⁻	766.5623	766.5605	2.3	
C ₄₂ H ₈₃ NO ₉ Cl ⁻	780.5781	780.5762	2.4	
C15:0 取代的磷酸甘油二氢神经酰胺 (subPG-DHC)				
C ₅₀ H ₁₀₀ O ₁₀ NP	904.7007	904.7028	2.3	脆弱拟杆菌、卵形拟杆菌、多形拟杆菌、单形拟杆菌、普通拟杆菌、扭曲副拟杆菌
C ₅₁ H ₁₀₂ O ₁₀ NP	918.7163	918.7185	2.4	
C ₅₂ H ₁₀₄ O ₁₀ NP	932.7324 ^b	932.7337	1.4	
C ₅₃ H ₁₀₆ O ₁₀ NP	946.7481 ^b	946.7484	0.3	
C ₅₄ H ₁₀₈ O ₁₀ NP	960.7637 ^b	960.7624	1.3	
未经取代的磷酸甘油二氢神经酰胺 (unPG-DHC)				
C ₃₇ H ₇₆ O ₉ NP	708.5184	708.5199	2.1	扭曲副拟杆菌
C ₃₉ H ₈₀ O ₉ NP	736.5497	736.5484	1.8	

[1153] 表8:生物标记物:群体感应分子和其质谱信号的表

[1154] 绿脓杆菌中的鉴别的群体感应分子。

[1155]

化合物	总式	精确质量	实验质量	质量偏差
2-庚基喹啉-4(1H)-酮	C ₁₆ H ₂₁ N ₀	[M-H] ⁻ =242.1550	242.1552	-0.8ppm
2-庚基-3-羟基-4(1H)-喹诺酮 (PQS)	C ₁₆ H ₂₁ N ₀ O ₂	[M-H] ⁻ =258.1499	258.1502	-1.2ppm
羟基壬烯基喹啉	C ₁₈ H ₂₃ N ₀	[M-H] ⁻ =268.1707	268.1711	-1.5ppm

羟基壬基喹啉	C ₁₈ H ₂₅ N ₀	[M-H] ⁻ =270.1863	270.1868	-1.9ppm
羟基十一碳烯基喹啉	C ₂₀ H ₂₆ N ₀	[M-H] ⁻ =296.2020	296.2023	-1.0ppm

[1156] 表9:生物标记物:鼠李糖脂和其质谱信号的表

[1157] 通常由绿脓杆菌菌株产生的鼠李糖脂物质。

[1158]

化合物	总式	精确质量 [M-H] ⁻	实验质量	质量偏差
Rha-C ₂₀	C ₂₆ H ₄₈ O ₉	503.3225	503.3224	0.2 ppm
Rha-C _{22:1}	C ₂₈ H ₅₀ O ₉	529.3382	529.3384	-0.4 ppm
Rha-C ₂₂	C ₂₈ H ₅₂ O ₉	531.3539	531.3538	0.2 ppm
Rha-Rha-C ₂₀	C ₃₂ H ₅₈ O ₁₃	649.3805	649.3804	0.2 ppm
Rha-Rha-C ₂₂	C ₃₄ H ₆₂ O ₁₃	677.4118	677.4116	-0.3 ppm
Rha-Rha-C _{22:1}	C ₃₄ H ₆₀ O ₁₃	675.3961	675.3965	-0.6 ppm

[1159] 表10:生物标记物:表面活性素和其质谱信号的表

[1160] 针对枯草芽孢杆菌以正离子和负离子模式检测到的表面活性素物质。

[1161]

化合物	负离子模式			正离子模式		
	实验质量	精确质量 [M-H] ⁻	Δppm	实验质量	精确质量 [M+Na] ⁺	Δppm
表面活性素 (C13)	1006.6453	1006.6440	1.3	1030.6389	1030.6416	2.6
表面活性素 (C14)	1020.6604	1020.6597	0.7	1044.6545	1044.6573	2.7
表面活性素 (C15)	1034.6754	1034.6753	0.1	1058.6702	1058.6729	2.6

[1162] 表11:生物标记物:地衣素和其质谱信号的表

[1163] 地衣芽孢杆菌中检测到的地衣素化合物。

[1164]

化合物	实验质量	精确质量 [M-H] ⁻	Δ ppm
地衣素 (C13)	1005.6594	1005.6600	0.6
地衣素 (C14)	1019.6748	1019.6756	0.8
地衣素 (C15)	1033.6906	1033.6913	0.7
地衣素 (C16)	1047.7055	1047.7070	1.4

[1165] 表12:生物标记物的表

[1166] 对于细胞系 (NCI60) 数据集显示与ugcg基因表达的强正相关的质谱信号。

[1167]

实验质量	精确质量	Δppm	假设 ID	式	加合物	相关系数
734.5355	734.5343	0.2	GlyCer(d18:1/16:0)	C ₄₀ H ₇₇ NO ₈	[M+Cl] ⁻	0.552
818.6295	818.6282	0.2	GlyCer(d18:1/22:0)	C ₄₆ H ₈₉ NO ₈	[M+Cl] ⁻	0.662
842.6312	842.6332	-0.2	GlyCer(d18:1/24:2)	C ₄₈ H ₈₉ NO ₈	[M+Cl] ⁻	0.602
844.6451	844.6439	0.1	GlyCer(d18:1/24:1)	C ₄₈ H ₉₁ NO ₈	[M+Cl] ⁻	0.668
846.6627	846.6595	0.4	GlyCer(d18:1/24:0)	C ₄₈ H ₉₃ NO ₈	[M+Cl] ⁻	0.688

[1168]

872.6733	872.6752	-0.2	GlyCer(d18:1/26:1)	C ₅₀ H ₉₅ NO ₈	[M+Cl] ⁻	0.707
----------	----------	------	--------------------	---	---------------------	-------

[1169] 表13:支原体的生物标记物的表

[1170] 在HEK和海拉细胞系两者中,相比于无支原体样品,在支原体感染样品中显著较高的m/z峰的列表。第2栏显示对应分仓峰,第2栏突出显示假定的同位素峰,而第4栏显示分仓峰的临时注解。作为主要支原体成分的磷脂酰甘油和鞘磷脂物质以粗体书写。

[1171]

显著不同的分仓m/z	对应m/z信号	注解
687.54	687.5468	
722.51	722.5156	PE (P-36:4)
733.53	733.5231	PE (P-38:4)
747.52	747.5193	PG (34:1)
748.53	748.5243	m/z的同位素=747.52
753.51	753.5090	PG (P-36:4)
764.52	764.5264	PE (38:5)
764.53	764.5262	PE (38:5)
766.53	766.5412	PE (38:4)
773.54	773.5359	PG (36:2)
774.54	774.5391	PG (36:2), m/z的同位素=773.54
774.55	774.5391	PG (36:2), m/z的同位素=773.54
775.56	775.5520	PG (36:1)
776.56	776.5564	PG (36:1), m/z的同位素=775.56
776.57	776.5564	PG (36:1), m/z的同位素=775.56
819.52	819.5189	PG (40:7)
820.53	820.5268	PG (40:7), m/z的同位素=819.52
820.54	820.5268	PG (40:7), m/z的同位素=819.52

[1172] 表14. 分类单元特异性生物标记物

[1173] 在样品集的大小不足的情况下不计算标记物。

[1174]

门	纲	目	科	属	种	No.
革兰氏阴性	拟杆菌门	拟杆菌纲	拟杆菌目	拟杆菌科	拟杆菌属	产酸拟杆菌 (<i>Bacteroides acidifaciens</i>)
		616.5094		576.4764		2
	381.2765	617.5124		820.7522		2
	393.2764	618.5233			粪拟杆菌 (<i>Bacteroides caccae</i>)	2
	590.4923	619.5273			埃氏拟杆菌 (<i>Bacteroides eggerthii</i>)	5
	591.4963	620.5184			脆弱拟杆菌	1
	592.4883	627.4883			溃疡拟杆菌 (<i>Bacteroides helcogenes</i>)	3
	604.5083	628.4913				1
	605.5113	635.5004			卵形拟杆菌 (<i>Bacteroides ovatus</i>)	3
	606.5033	636.5044			酿脓拟杆菌 (<i>Bacteroides pyogenes</i>)	3
	616.4724	637.5044			多形拟杆菌 (<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>)	3
	623.5024	644.5033			单形拟杆菌 (<i>Bacteroides uniformis</i>)	
	624.5054	648.5003			普通拟杆菌 (<i>Bacteroides vulgatus</i>)	
	637.5044	697.5743				
	639.4954	698.5763				
	640.4993	711.5902				
	653.5113	712.5933				
	654.5143					
	677.5238		紫单胞菌科	副拟杆菌属	狄氏副拟杆菌 (<i>Parabacteroides distasonis</i>)	5
	691.5395		814.7063			2
	705.5562		815.7112		约氏副拟杆菌 (<i>Parabacteroides distasonis</i>)	
			828.7232			

[1175]

				829.7262 840.6842 841.6942 843.7432 854.7022 858.6972 872.7072 908.7401 909.7431 910.7471 918.7191 921.7912 932.7332 933.7362 934.7422 944.7342 945.7372 946.7472 947.7502 948.7562 949.7592 958.7461 959.7501 960.7611 961.7661 962.7691			
				普雷沃氏菌 科 661.5283 675.5453 676.5503 870.8002 908.7401 922.7552 923.7612 953.5113	普雷沃氏菌 属	二路普雷沃氏菌 (<i>Prevotella bivia</i>)	7
				理研菌科	阿里氏菌属	奥德阿里氏菌 (<i>Alistipes onderdonkii</i>)	1
		黄杆菌纲 324.2545 333.2084 390.2324 392.2484 393.2504 552.4643 553.4674 553.4674 554.4714 556.4034 565.4654 566.4794 567.4834 568.4864 600.4664 601.4723 618.4773 619.4813 620.4883 651.4953 651.4953 891.7411	黄杆菌目	黄杆菌科	金黄杆菌属	产吡啶金黄杆菌 (<i>Chryseobacterium indologenes</i>) 金黄杆菌属 (<i>Chryseobacterium sp</i>)	3 1
					伊丽莎白菌 属	脑膜炎毒性伊丽莎白菌 (<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>)	4
					香味菌属	拟香味类香味菌 (<i>Myroides odoratimimus</i>)	2

[1176]

梭杆菌门 227.2015 644.4652 645.4633 646.4833 647.4812 648.4832 673.4443 696.4953 714.5492 856.6782 865.6632 884.7083	梭杆菌纲	梭杆菌目	梭杆菌科	梭杆菌属	微生子梭杆菌 (<i>Fusobacterium gonidiaformans</i>) 坏死梭杆菌 (<i>Fusobacterium necrophorum</i>) 牙周梭杆菌 (<i>Fusobacterium periodontiam</i>) 梭杆菌属 (<i>Fusobacterium sp</i>)	3 7 4 1
变形菌门 768.5182 782.5342 783.5293	α-变形菌纲	柄杆菌目 769.5502 770.5562 771.5582 795.5572 797.5723 818.5673 957.6261	柄杆菌科	短波单胞杆菌属	缺陷短波单胞菌 (<i>Brevundimonas diminuta</i>)	2
		根瘤菌目 439.4155 440.4195 739.5313 784.5902 785.5932 799.5132	根瘤菌科	根瘤菌属	放射型根瘤菌 (<i>Rhizobium radiobacter</i>)	5
		红螺菌目 662.5393 722.5753 729.5813 733.5752 733.6173 734.5753 747.6283 757.6173	醋杆菌科	玫瑰单胞菌属	粘膜玫瑰单胞菌 (<i>Roseomonas mucosa</i>) 玫瑰单胞菌属 (<i>Roseomonas sp</i>)	6 1
		伯克氏菌目	产碱杆菌科	无色杆菌属	无色杆菌属 (<i>Achromobacter sp</i>) 氧化木糖无色杆菌	3 3
	β-变形菌门	伯克氏菌目	产碱杆菌科	产碱杆菌属	粪产碱杆菌 (<i>Alcaligenes faecalis</i>)	3
				伯克氏菌属	洋葱伯克氏菌群	7
			伯克氏菌科 589.4013 590.4083 591.4184 592.4214	伯克氏菌属		
			丛毛单胞菌科 520.3044	食酸菌属	温和食酸菌 (<i>Acidovorax temperans</i>)	2
			丛毛单胞菌属	丛毛单胞菌属	柯氏丛毛单胞菌 (<i>Comamonas kerstersii</i>) 丛毛单胞菌属 (<i>Comamonas sp</i>)	2 1
				代尔夫特菌属	食酸代尔夫特菌 (<i>Delftia acidovorans</i>) 齧齿代尔夫特菌 (<i>Delftia dentocariosa</i>) 代尔夫特菌属 (<i>Delftia sp</i>)	4 1 2
			萨特氏菌科	萨特氏菌属	华德萨特氏菌 (<i>Sutterella wadsworthensis</i>)	2
		奈瑟菌目	奈瑟菌科	艾肯菌属	嗜蚀艾肯菌 (<i>Eikenella corrodens</i>)	1

[1177]

			494.3855 502.3674 526.3673 527.3704 528.3653 544.3774		金氏菌属	金氏金菌 (<i>Kingella kingae</i>) 金氏菌属 (<i>Kingella sp</i>)	3 1		
			奈瑟菌属		灰色奈瑟菌 (<i>Neisseria cineria</i>)	1			
					延长奈瑟菌 (<i>Neisseria elongata</i>)	2			
					浅黄奈瑟菌 (<i>Neisseria flavescens</i>)	3			
					淋病奈瑟菌 (<i>Neisseria gonorrhoea</i>)	4			
					丙氨奈瑟菌 (<i>Neisseria lactamica</i>)	3			
					脑膜炎奈瑟菌 (<i>Neisseria meningitidis</i>)	4			
					粘膜奈瑟菌 (<i>Neisseria mucosa</i>)	2			
	ε-变形菌门 730.5422 731.5452 867.6582 993.8381	弯曲菌目	弯曲菌科 867.6582 993.8381	弯曲菌属	大肠弯曲杆菌 (<i>Campylobacter coli</i>)	1			
					胎儿弯曲杆菌 (<i>Campylobacter fetus</i>)	3			
		螺杆菌科 271.2284 272.2305 299.2595 300.2625 400.2644 543.4623 544.4634	螺杆菌属	空肠弯曲杆菌 (<i>Campylobacter jejuni</i>)	3				
				弯曲菌属 (<i>Campylobacter sp</i>)	6				
				幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>)	3				
				γ-变形菌门	气单胞菌目	气单胞菌科	气单胞菌属	嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	1
								人心杆菌 (<i>Cardiobacterium hominis</i>)	4
					肠杆菌目 702.5083 703.5092 993.7282 994.7272	肠内菌科	柠檬酸杆菌属	无丙二酸柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter amalonaticus</i>)	1
								布氏柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter braakii</i>)	3
							肠杆菌属	弗氏柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter freundii</i>)	4
	克氏柠檬酸杆菌	4							
	阿氏肠杆菌 (<i>Enterobacter absuriae</i>)	2							
	产气肠杆菌	3							
	河生肠杆菌 (<i>Enterobacter amnigenus</i>)	1							
	阴沟肠杆菌	3							
					日沟维肠杆菌 (<i>Enterobacter gergoviae</i>)	1			
					埃希氏杆菌属	大肠杆菌	7		
					哈夫尼菌属	蜂房哈夫尼菌 (<i>Hafnia alvei</i>)	3		
						副蜂房哈夫尼菌 (<i>Hafnia paralvei</i>) 哈夫尼菌属	2 1		
克雷伯氏菌					产酸克雷伯氏菌 肺炎克雷伯氏菌	5 5			

[1178]

				摩根氏菌属	摩氏摩根菌	7
				泛菌属 (<i>Pantthoea</i>)	泛菌属	1
				变形杆菌属	奇异变形杆菌 普通变形杆菌 (<i>Proteus vulgaris</i>)	5 5
				普罗维登斯菌属 (<i>Providencia</i>)	雷氏普罗威登斯菌 (<i>Providencia rettgeri</i>) 斯氏普罗威登斯菌 (<i>Providencia stuartii</i>)	2 2
				拉乌尔菌属 (<i>Raoultella</i>)	解鸟氨酸拉乌尔菌 (<i>Raoultella ornitholytica</i>) 植生拉乌尔菌 (<i>Raoultella planticola</i>)	1 1
				沙门氏菌	浦那沙门氏菌 (<i>Salmonella poona</i>)	1
				沙雷氏菌属	液化沙雷氏菌 (<i>Serratia liquifaciens</i>) 粘质沙雷氏菌	3 5
				志贺杆菌属	索氏志贺杆菌	1
		巴斯德氏菌目 690.4983 746.4503 823.5453 898.6921 915.6902 977.7282	巴斯德氏菌科	凝聚杆菌属	嗜沫凝聚杆菌 (<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>)	5
				嗜血杆菌属	流感嗜血杆菌 副溶血嗜血杆菌 (<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>) 副流感嗜血杆菌 (<i>Haemophilus parainfluenzae</i>)	5 2 1
				巴斯德氏菌属	出血败血性巴斯德氏菌 (<i>Pasteurella multocida</i>)	2
		假单胞菌目	莫拉氏菌科	不动杆菌属	鲍氏不动杆菌 (<i>Acinetobacter baumannii</i>) 鲁氏不动杆菌 (<i>Acinetobacter iwoffii</i>) 约氏不动杆菌 (<i>Acinetobacter johnsonii</i>) 琼氏不动杆菌 (<i>Acinetobacter junii</i>)	5 5 2 1
				莫拉菌属	卡他莫拉菌 奥斯陆莫拉菌 (<i>Moraxella osloensis</i>)	5 2
			假单胞菌科 286.1805 490.3304 514.3294	假单胞菌属	绿脓杆菌 浅黄假单胞菌 (<i>Pseudomonas luteola</i>) 蒙氏假单胞菌 (<i>Pseudomonas monteilii</i>) 稻皮假单胞菌 (<i>Pseudomonas oryzae</i>) 恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>) 斯氏假单胞菌 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	7 1 2 2 1 5
		弧菌目 605.3823 607.3983 608.4013 633.4134	弧菌科	弧菌属	溶藻弧菌 (<i>Vibrio alginolyticus</i>) 霍乱弧菌 弗氏弧菌 (<i>Vibrio furnissii</i>)	1 1 1
		黄单胞菌目	黄单胞菌科	寡养单胞菌	嗜麦芽窄食单胞菌	7

[1179]

			377.2105 562.3504 619.4353 620.4384 705.4713 706.4743 929.6852 930.6892 942.6912 943.7012 944.7052		属						
革兰氏阳性	放线菌门	放线菌纲	放线菌目	放线菌科 757.5403 879.6112	放线棒菌属	沙氏放线棒菌 (<i>Actinobaculum schaalii</i>)	2				
					放线菌属	格雷放线菌 (<i>Actinomyces graevenitzi</i>) 衣氏放线菌 (<i>Actinomyces israelii</i>) 溶齿放线菌 (<i>Actinomyces odontolyticus</i>) 口放线菌 (<i>Actinomyces oris</i>) 放线菌属 (<i>Actinomyces sp</i>) 图列茨放线菌 (<i>Actinomyces turicensis</i>) 粘放线菌 (<i>Actinomyces viscosus</i>)	1 1 2 5 1 1 2				
				棒状杆菌科 493.4624 495.4784 497.4845 521.4934 535.4734 537.4904 538.4934	棒状杆菌属	非发酵棒状杆菌 (<i>Corynebacterium afermentans</i>) 无枝菌酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium amycolatum</i>) 白喉棒状杆菌 模拟棒状杆菌 微细棒状杆菌 棒状杆菌属 纹带棒状杆菌	2 3 2 3 1 5 3				
						微杆菌属	微杆菌属	1			
						分枝杆菌科 391.3684 427.0965 724.8873 817.4152 850.5592 851.5662 852.5672	分枝杆菌属	鸟分枝杆菌 (<i>Mycobacterium avium</i>) 偶发分枝杆菌 (<i>Mycobacterium fortuitum</i>) 派瑞分枝杆菌 (<i>Mycobacterium peregrinum</i>)	2 1 1		
								诺卡氏菌科 321.2915 743.7273 771.7592 797.7762 798.7762 800.7962 827.8162 828.8222 970.7871	诺卡氏菌属	诺卡氏菌属 (<i>Nocardia sp</i>)	1
									红球菌属	马红球菌 (<i>Rhodococcus equi</i>) 红球菌属 (<i>Rhodococcus sp</i>)	1 2
										丙酸杆菌科 361.2155 617.4564 713.4752 714.4812 779.5072 877.5592 906.5872	丙酸杆菌属

[1180]

厚壁菌门	杆菌纲	双歧杆菌目 789.5293 792.5502 819.5783 830.5622 855.5272 884.6092 885.6142	双歧杆菌科	双歧杆菌属	青春双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium adolescentis</i>) 两歧双歧杆菌 短双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium breve</i>) 婴儿双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium infantis</i>) 长双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium longum</i>) 假小链双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>)	1 2 3 1 3 2		
		微球菌目 913.5682	微球菌科 913.5682 914.5711 915.5671	加德纳菌属	阴道加德纳菌 (<i>Gardnerella vaginalis</i>)	2		
				节杆菌属	溶肌节杆菌 (<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>) 节杆菌属 (<i>Arthrobacter sp</i>)	1 1		
				国领虫属	克瑞斯国领虫 (<i>Kokuria kristina</i>) 瑞兹国领虫 (<i>Kokuria rhizophila</i>) 多变国领虫 (<i>Kokuria varians</i>)	2 2 1		
				微球菌属	黄色微球菌 里拉微球菌 (<i>Micrococcus lylae</i>)	5 2		
			罗思氏菌属	天线罗思氏菌 (<i>Rothia aeria</i>) 阿曼罗思氏菌 (<i>Rothia amarne</i>) 龋齿罗思氏菌 (<i>Rothia dentocariosa</i>) 粘滑罗斯氏菌 (<i>Rothia mucilaginoso</i>) 罗思氏菌属 (<i>Rothia sp</i>)	3 1 5 5 1			
			微球菌亚目	短杆菌属	少食短杆菌 (<i>Brevibacterium paucivorans</i>) 短杆菌属 (<i>Brevibacterium sp</i>)	1 3		
				皮杆菌属	人皮杆菌 (<i>Dermabacter hominis</i>) 皮杆菌属 (<i>Dermobacter sp</i>)	2 1		
			杆菌目	芽孢杆菌科	芽孢杆菌属	蜡样芽孢杆菌 克劳氏芽孢杆菌 (<i>Bacillus clausii</i>) 地衣芽孢杆菌 (<i>Bacillus licheniformis</i>) 短小芽孢杆菌 (<i>Bacillus pumilus</i>) 沙诺氏芽孢杆菌 (<i>Bacillus sonorensis</i>) 芽孢杆菌属 (<i>Bacillus sp</i>) 枯草芽孢杆菌	3 3 3 1 1 3 3	
		李斯特氏菌科 675.9793 832.5352				李斯特氏菌属	单核细胞增多性李斯特氏菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	7
		类芽孢杆菌科 871.5892 903.7221 914.7282 915.7282 916.7282				类芽孢杆菌属	类芽孢杆菌属 (<i>Paenibacillus sp</i>) 优纳类芽孢杆菌 (<i>Paenibacillus unalis</i>)	5 1
		葡萄球菌科 763.5512 765.5482				葡萄球菌属	金黄色葡萄球菌 头状葡萄球菌 (<i>Staphylococcus</i>	3 3 1

[illegible]

[1182]

						格氏链球菌 (<i>Streptococcus gordonii</i>) 中间链球菌 (<i>Streptococcus intermedius</i>) 巴黎链球菌 (<i>Streptococcus lutetiensis</i>) 米勒链球菌 (<i>Streptococcus milleri</i>) 轻型链球菌 (<i>Streptococcus mitis</i>) 变形链球菌 (<i>Streptococcus mutans</i>) 口腔链球菌 (<i>Streptococcus oralis</i>) 副溶血链球菌 (<i>Streptococcus parasanguinus</i>) 肺炎链球菌 珀瓦链球菌 (<i>Streptococcus povas</i>) 假豕链球菌 (<i>Streptococcus pseudoporcinus</i>) 酿脓链球菌 唾液链球菌 (<i>Streptococcus salivarius</i>) 血链球菌 (<i>Streptococcus sanguinis</i>) 前庭链球菌 (<i>Streptococcus vestibularis</i>) 绿色链球菌 (<i>Streptococcus viridans</i>)	3 3 3 3 1 2 3 3 3 1 3
		梭菌纲 449.2685 703.4923 704.4953 731.5253 732.5283 925.7262	梭菌目	梭菌科 649.4453 731.5253 897.6951 925.7262 969.7481 970.7541	梭菌属	赛莱梭菌 (<i>Clostridium celerecrescens</i>) 艰难梭菌 溶组织梭菌 (<i>Clostridium histolyticum</i>) 无害梭菌 (<i>Clostridium innocuum</i>) 副腐败梭菌 (<i>Clostridium paraputrificum</i>) 产气荚膜梭菌 多枝梭菌 (<i>Clostridium ramosum</i>) 败毒梭菌 (<i>Clostridium septicum</i>) 产芽胞梭菌 (<i>Clostridium sporogenes</i>) 第三梭菌 (<i>Clostridium tertium</i>)	1 4 2 3 2 3 3 2 2 3
				消化链球菌科 496.4124 497.4214 498.4244 635.3944 645.4133 646.4173 681.3923	微单胞菌属	微米微单胞菌 (<i>Parvinomas micra</i>)	1
					嗜脲菌属	海瑞嗜脲菌 (<i>Peptoniphilus harei</i>)	5
		奈加菌纲 (Negativicutes) 423.3505 425.3644 426.3674	赛莱菌目 (Selenomonadales)	氨基酸球菌科 627.4403 643.4343 644.4383 730.4652 734.5933	氨基酸球菌属	发酵氨基酸球菌 (<i>Acidaminococcus fermentans</i>)	2

[1183]

		461.3394 560.4194 851.7352		831.5902 977.6971 978.6931			
				韦荣氏球菌 科	小杆菌属	小杆菌属 (<i>Dialister sp.</i>)	1
				218.1855 229.1815 358.2145 364.2495 655.4713	韦荣氏球菌 属	非典型韦荣氏菌 (<i>Veillonella atypica</i>) 殊异韦荣氏菌 (<i>Veillonella dispar</i>) 小韦荣氏菌 (<i>Veillonella parvula</i>) 大鼠韦荣氏菌 (<i>Veillonella ratti</i>)	1 1 1 1

[1184] 表16. 如在门层级上测定的分类单元特异性标记物。

[1185]

系统发生信息	分类层级	m/z 值	化合物 ID
革兰氏阴性	拟杆菌门 (门)	381.2765	鞘脂 同位素 $m/z=653$
		653.5113	
		654.5143	
		623.5024	
		640.4993	
		639.4954	CerP(d34:1)) 同位素 $m/z=623$ 同位素 $m/z=635$ 同位素 $m/z=590$ Cer(d18:0/h17:0) 同位素 $m/z=604$ 同位素 $m/z=604$ Cer(d34:0(2OH)) 同位素 $m/z=590$ PE-DHC PE-DHC PE-DHC
		393.2764	
		616.4724	
		624.5054	
		637.5044	
		592.4883	
		604.5083	
		605.5113	
		606.5033	
		590.4923	
		591.4963	
		705.5562	
		691.5395	
		677.5238	
	梭杆菌门 (门)	646.4833	PE 缩醛磷脂
		227.2015	
		648.4832	PE 缩醛磷脂
		856.6782	
		865.6632	
		696.4953	
		714.5492	
		673.4443	
		644.4652	
		884.7083	
		645.4633	$m/z=227$ 的组合标记物
		647.4812	
	变形菌门	768.5182	
		782.5342	
		783.5293	
革兰氏阳性	放线菌门	-	
	厚壁菌门	-	

[1186] 表17. 如在纲层级上测定的分类单元特异性标记物。

[1187]

系统发生信息	分类层级	m/z 值	化合物 ID
革兰氏阴性 └─拟杆菌门	拟杆菌纲	635.5004 616.5094 628.4913 636.5044 627.4883 644.5033 711.5902 618.5233 712.5933 619.5273 697.5743 620.5184 698.5763 648.5003 637.5044 617.5124	鞘脂 Cer(d36:1(2OH)) PE-Cer(33:1) CerP(d36:1) Cer(d36:0(2OH)) 同位素 618 DG(42:5) 同位素 m/z=616
	黄杆菌纲	333.2084 390.2324 566.4794 567.4834 568.4864 556.4034 600.4664 565.4654 553.4674 392.2484 651.4953 618.4773 619.4813 324.2545 620.4883 393.2504 891.7411 554.4714 552.4643 553.4674 651.4953 601.4723	
革兰氏阴性 └─梭杆菌门	梭杆菌纲(纲)		
革兰氏阴性 └─梭杆菌门	α-梭杆菌纲		
	β-梭杆菌纲	-	
	ε-梭杆菌纲	993.8381 867.6582 731.5452 730.5422	
	γ-梭杆菌纲	-	
革兰氏阳性 └─放线菌门	放线菌纲(纲)	-	

[1188]

革兰氏阳性 └厚壁菌门	杆菌纲	-	
	梭菌纲	731.5253 732.5283 449.2685 703.4923 925.7262 704.4953	PG 缩醛磷脂 同位素 $m/z=731$ PG 缩醛磷脂 同位素 $m/z=703$
	奈加菌纲	560.4194 426.3674 425.3644 423.3505 461.3394 851.7352	同位素 $m/z=425$

[1189] 表18. 如在目层级上测定的分类单元特异性标记物。

[1190]

系统发生信息	分类层级	m/z 值	化合物 ID
革兰氏阴性 └拟杆菌门 └拟杆菌门	拟杆菌目		
革兰氏阴性 └拟杆菌门 └黄杆菌纲	黄杆菌目		
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └梭杆菌纲	梭杆菌目		
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └ α -梭杆菌纲	柄杆菌目	795.5572 797.5723 769.5502 770.5562 957.6261 771.5582 818.5673	
	根瘤菌目	739.5313 784.5902 785.5932 439.4155 440.4195 799.5132	同位素 $m/z=784$ 同位素 $m/z=439$
	红螺菌目	733.5752 734.5753 729.5813 733.6173 722.5753 662.5393 747.6283 757.6173	
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └ β -梭杆菌纲	伯克氏菌目	-	
	奈瑟菌目	526.3673 527.3704	同位素 $m/z=526$

[1191]

		502.3674 544.3774 494.3855 528.3653	
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └└梭杆菌纲	弯曲菌目	-	
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └└梭杆菌纲	气单胞菌目		
	心杆菌目	648.4603 649.4623 793.4792 650.4653 794.4802	同位素 $m/z=648$
	肠杆菌目	703.5092 702.5083 993.7282 994.7272	同位素 $m/z=702$
	巴斯德氏菌目	746.4503 915.6902 823.5453 898.6921 690.4983 977.7282	
	假单胞菌目	-	
	弧菌目	607.3983 608.4013 633.4134 605.3823	同位素 $m/z=607$
	黄单胞菌目	562.3504 377.2105 619.4353 620.4384 930.6892 929.6852 944.7052 943.7012 942.6912 706.4743 705.4713	同位素 $m/z=619$ 同位素 $m/z=629$ 同位素 $m/z=643$ 同位素 $m/z=705$ PG(31:1)
革兰氏阳性 └放线菌门 └└放线菌纲	放线菌目	-	
	双歧杆菌目	792.5502 819.5783 884.6092 885.6142 789.5293 830.5622 855.5272	

[1192]

	微球菌目	913.5682	
革兰氏阳性 └厚壁菌门 └杆菌纲	杆菌目		
	乳杆菌目		
		951.5832	
		954.6011	
		952.5861	
		953.5981	
		925.5671	
		956.5971	
		955.5971	
		926.5701	
		950.5692	
		949.5672	
		928.5952	
		990.6001	
	梭菌目		
	月形单胞菌目		

[1193] 表19. 如在科层级上测定的分类单元特异性标记物。

[1194]

系统发生信息	分类层级	m/z 值	化合物 ID
革兰氏阴性 └拟杆菌门 └拟杆菌纲 └拟杆菌目	拟杆菌科	820.7522	
	紫单胞菌科	841.6942	同位素 $m/z=840$
		840.6842	
		948.7562	同位素 $m/z=946$
		949.7592	同位素 $m/z=946$
		947.7502	同位素 $m/z=946$
		946.7472	SubPG DHC
		945.7372	同位素 $m/z=944$
		944.7342	SubPG DHC
		933.7362	同位素 $m/z=932$
		932.7332	SubPG DHC
		872.7072	
		815.7112	同位素 $m/z=814$
		814.7063	
		858.6972	
		934.7422	同位素 $m/z=960$
		962.7691	SubPG DHC
		960.7611	同位素 $m/z=960$
		961.7661	
		828.7232	同位素 $m/z=828$
		829.7262	
		854.7022	同位素 $m/z=958$
		959.7501	
		958.7461	
		921.7912	
		918.7191	
		843.7432	
		910.7471	

[1195]

		908.7401 909.7431	
	普雷沃氏菌科	661.5283 908.7401 675.5453 922.7552 923.7612 676.5503 870.8002	
	理研菌科		
革兰氏阴性 └拟杆菌门 └黄杆菌纲 └黄杆菌目	黄杆菌科		
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └梭杆菌纲 └梭杆菌目	梭杆菌科		
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └ α -梭杆菌纲 └柄杆菌目	柄杆菌科		
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └ α -梭杆菌纲 └根瘤菌目	根瘤菌科		
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └ α -梭杆菌纲 └红螺菌目	醋杆菌科		
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └ β -梭杆菌纲 └伯克氏菌目	产碱杆菌科	-	
	伯克氏菌科	589.4013 591.4184 590.4083 592.4214	同位素 $m/z=589$ 同位素 $m/z=591$
	丛毛单胞菌科	520.3044	
	萨特氏菌科	-	
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └ β -梭杆菌纲 └奈瑟菌目	奈瑟菌科		
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └ ϵ -梭杆菌纲 └弯曲菌目	弯曲菌科	993.8381 867.6582	
	螺杆菌科	299.2595 300.2625 272.2305 271.2284 543.4623 400.2644 544.4634	C18:0(+O) 同位素 $m/z=299$ 同位素 $m/z=271$ C16:0(+O)

[1196]

革兰氏阴性 └梭杆菌门 └ γ -梭杆菌纲 └心杆菌目	心杆菌科		
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └ γ -梭杆菌纲 └肠杆菌目	肠内菌科		
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └ γ -梭杆菌纲 └巴斯德氏菌目	巴斯德氏菌科		
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └ γ -梭杆菌纲 └假单胞菌目	莫拉氏菌科	-	
	假单胞菌科	514.3294 490.3304 286.1805	
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └ γ -梭杆菌纲 └弧菌目	弧菌科		
革兰氏阴性 └梭杆菌门 └ γ -梭杆菌纲 └黄单胞菌目	黄单胞菌科		
革兰氏阳性 └放线菌门 └放线菌纲 └放线菌目	放线菌科	757.5403 879.6112	组合标记物
	棒状杆菌科	537.4904 538.4934 535.4734 493.4624 495.4784 497.4845 521.4934	分枝杆菌 C35:0 同位素 $m/z=537$ 分枝杆菌 C35:1 分枝杆菌 C32:1 分枝杆菌 C32:0 同位素 $m/z=495$ 分枝杆菌 C34:1
	微杆菌科		
	分枝杆菌科	851.5662 852.5672 850.5592 391.3684 724.8873 427.0965 817.4152	PI(35:0) 同位素 $m/z=851$
	诺卡氏菌科	798.7762 797.7762 828.8222 970.7871 321.2915 827.8162 800.7962	同位素 $m/z=797$ 分枝杆菌 C54:3 同位素 $m/z=827$ 组合 分枝杆菌 C56:2 同位素分枝菌酸 C54:2 分枝杆菌 C50:2 分枝杆菌 C52:2

[1197]

		743.7273 771.7592	
	丙酸杆菌科	617.4564 906.5872 779.5072 714.4812 361.2155 713.4752 877.5592	
革兰氏阳性 └放线菌门 └放线菌纲 └双歧杆菌目	双歧杆菌科	792.5502 819.5783	
革兰氏阳性 └放线菌门 └放线菌门 └微球菌目	微球菌科	913.5682 914.5711 915.5671	同位素 $m/z=913$
	微球菌亚目		
革兰氏阳性 └厚壁菌门 └杆菌纲 └杆菌目	芽孢杆菌科		
	李斯特氏菌科	675.9793 832.5352	
	类芽孢杆菌科	915.7282 916.7282 914.7282 871.5892 903.7221	
	葡萄球菌科	765.5482 763.5512	同位素 $m/z=763$ PG(35:0)
革兰氏阳性 └厚壁菌门 └杆菌纲 └乳杆菌目	气球菌科	163.0506	
	肉杆菌科		
	肠球菌科	-	
	乳杆菌科	-	
	明串珠菌科		
	链球菌科	897.5351	
革兰氏阳性 └厚壁菌门 └梭菌纲 └梭菌目	梭菌科	731.5253 970.7541 649.4453 897.6951 969.7481 925.7262	
	消化链球菌科	497.4214 498.4244 681.3923 635.3944	同位素 $m/z=497$

[1198]

		496.4124 645.4133 646.4173	同位素 $m/z=645$
革兰氏阳性 └厚壁菌门 └奈加菌纲 └月形单胞菌目	氨基酸球菌科	730.4652 627.4403 831.5902 977.6971 978.6931 643.4343 644.4383 734.5933	
	韦荣氏球菌科	229.1815 218.1855 364.2495 655.4713 358.2145	

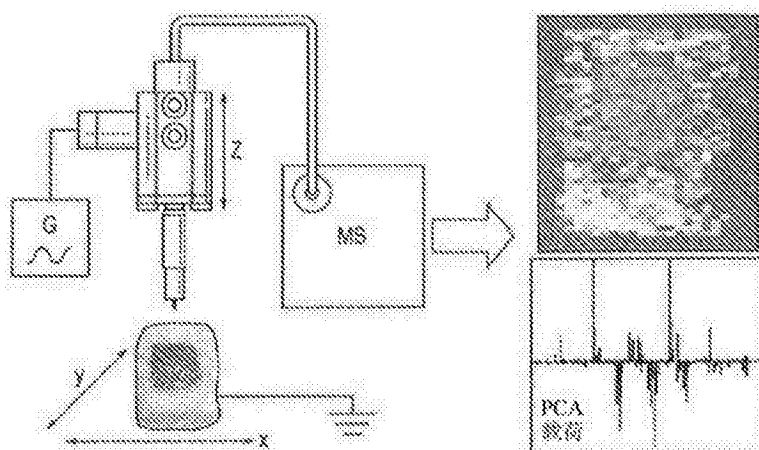


图1

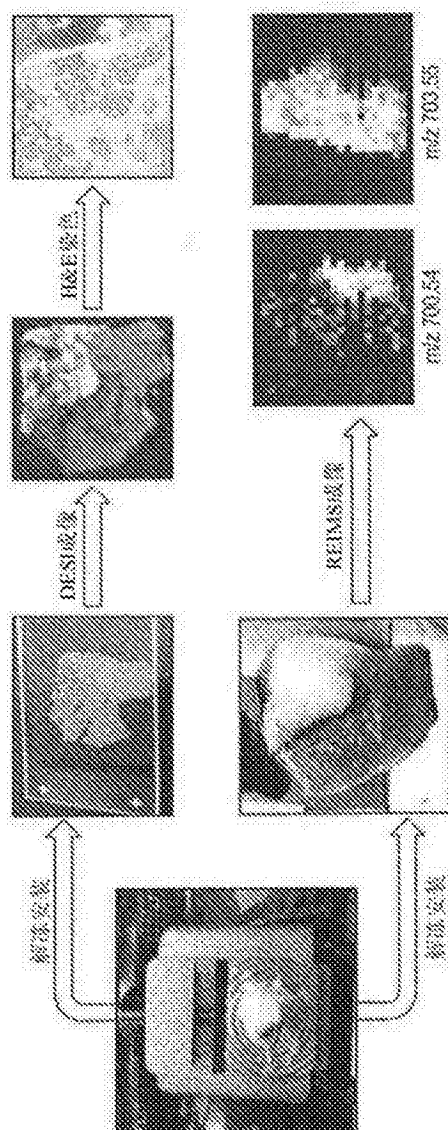


图2

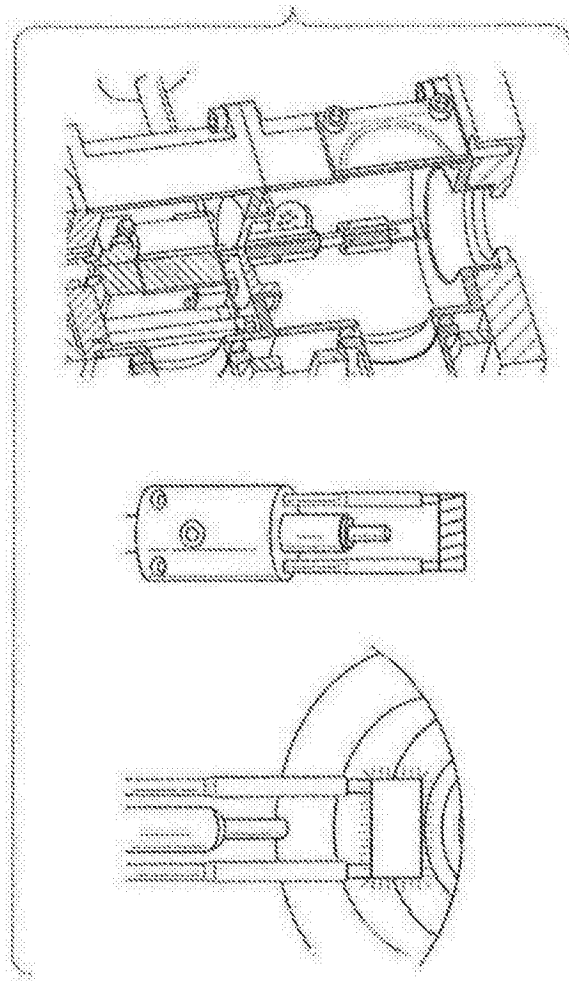


图3

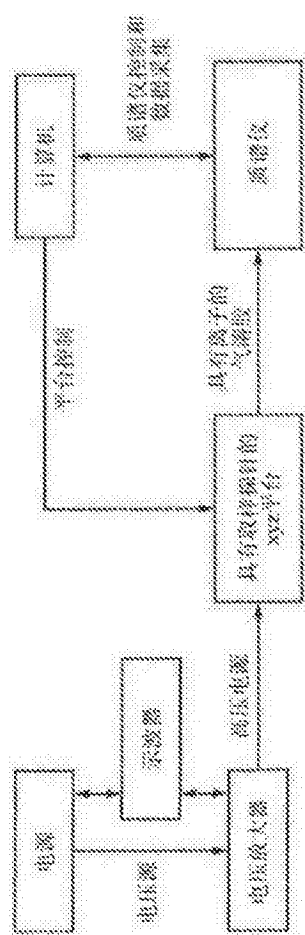


图4

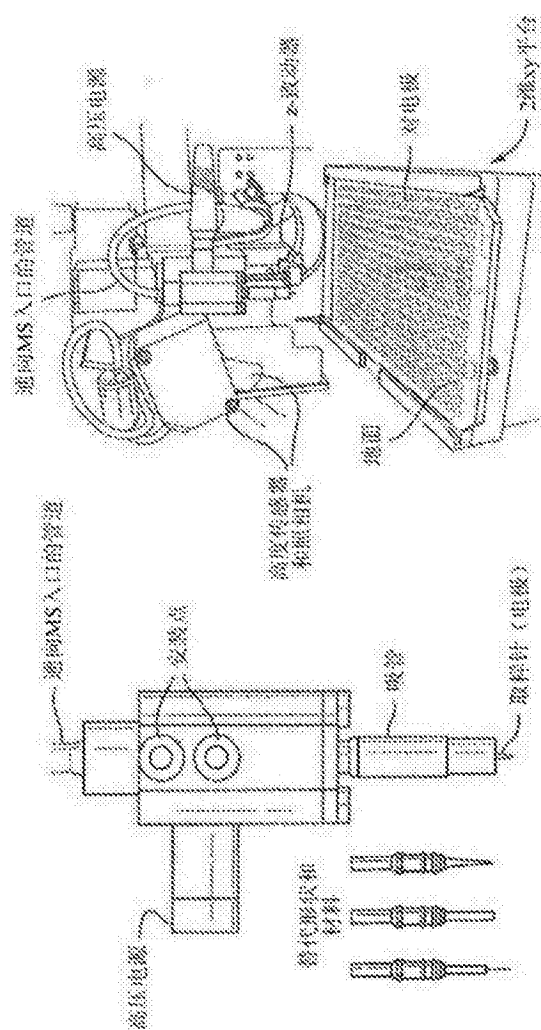


图5

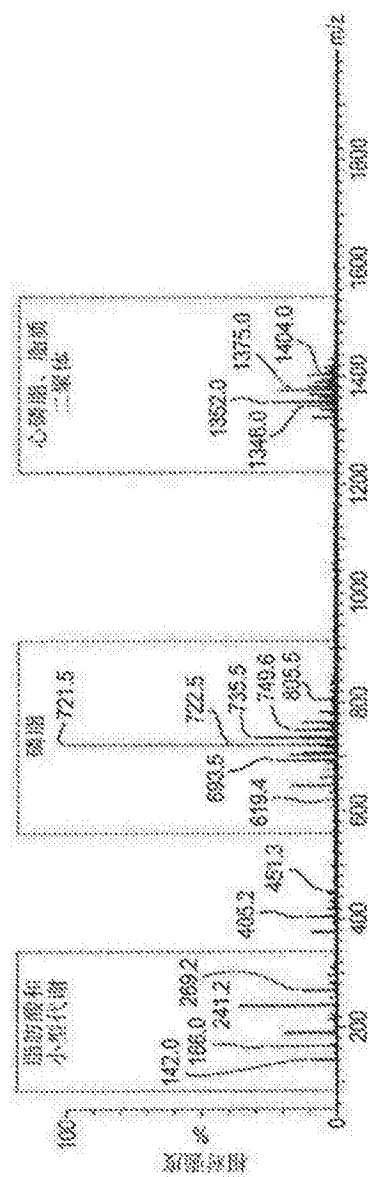


图6

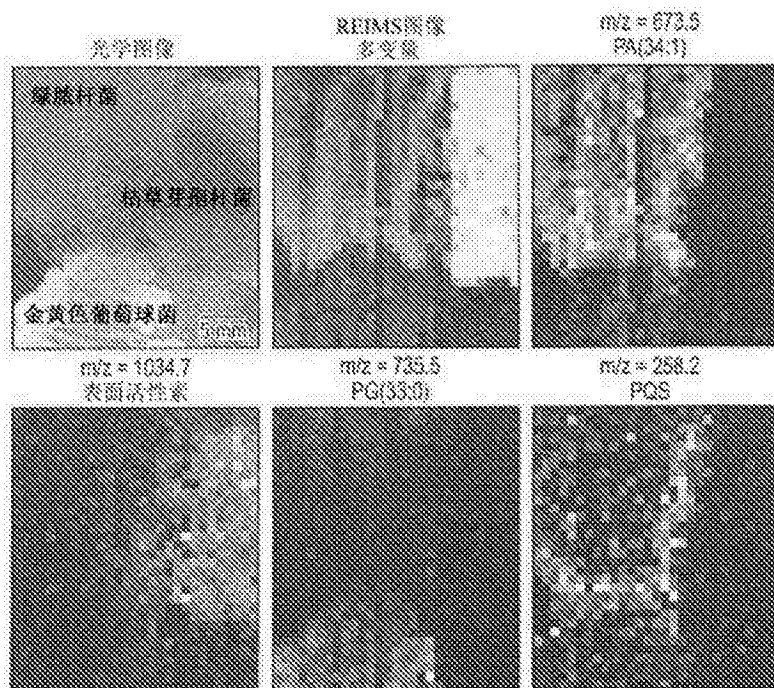


图7

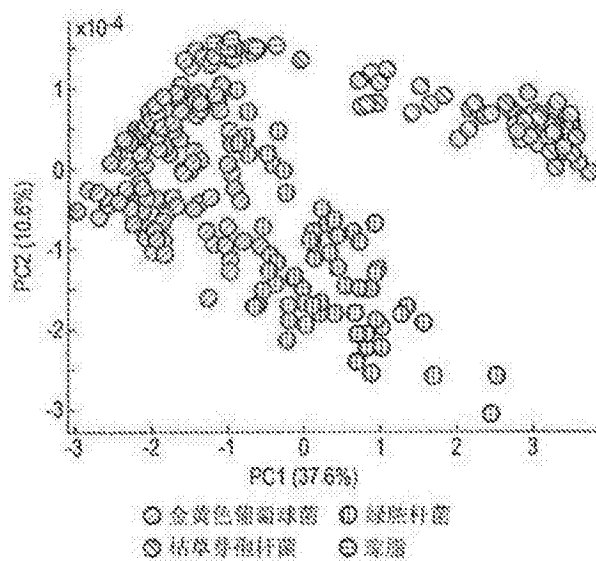


图8

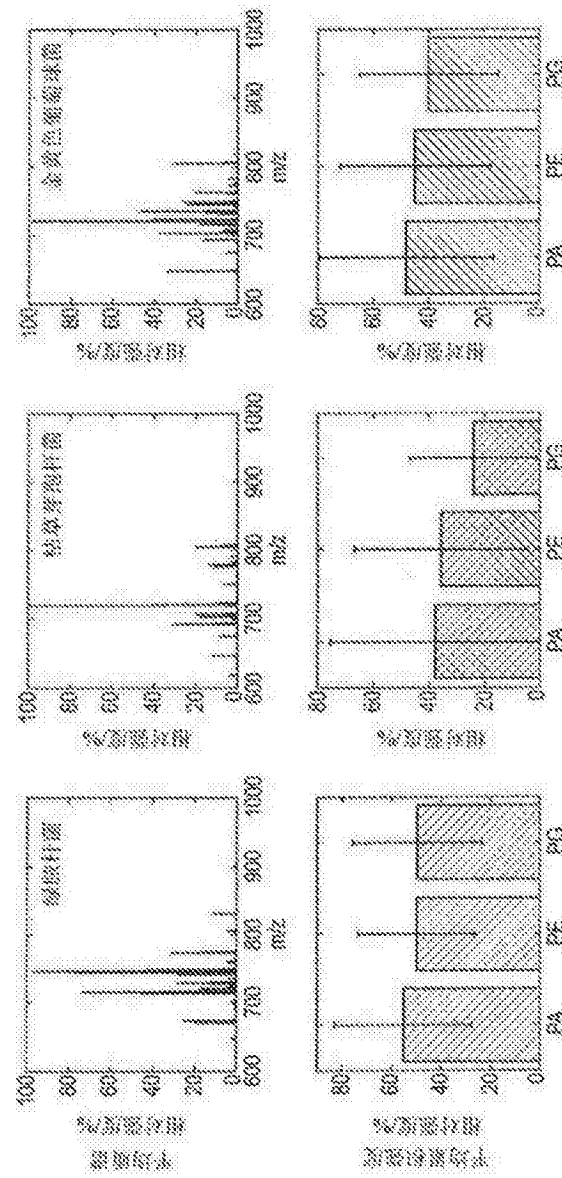


图9

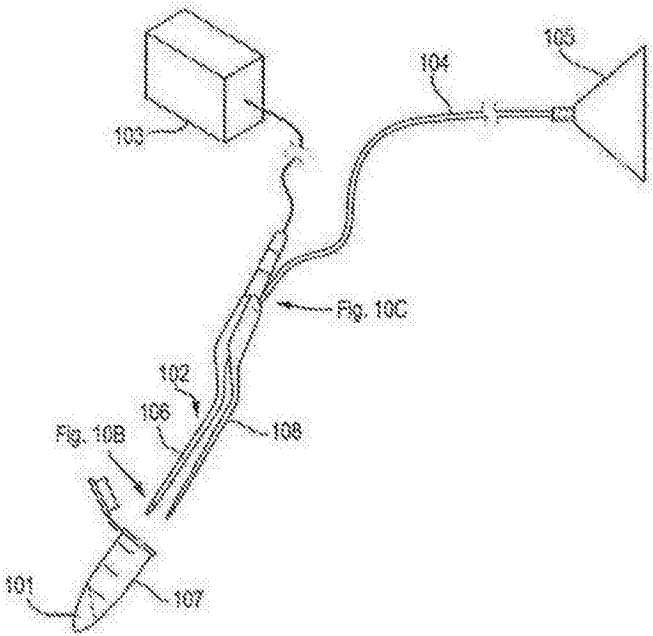


图10A

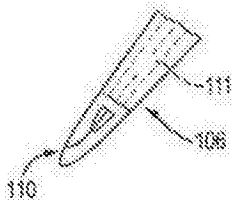


图10B

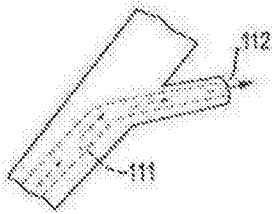


图10C

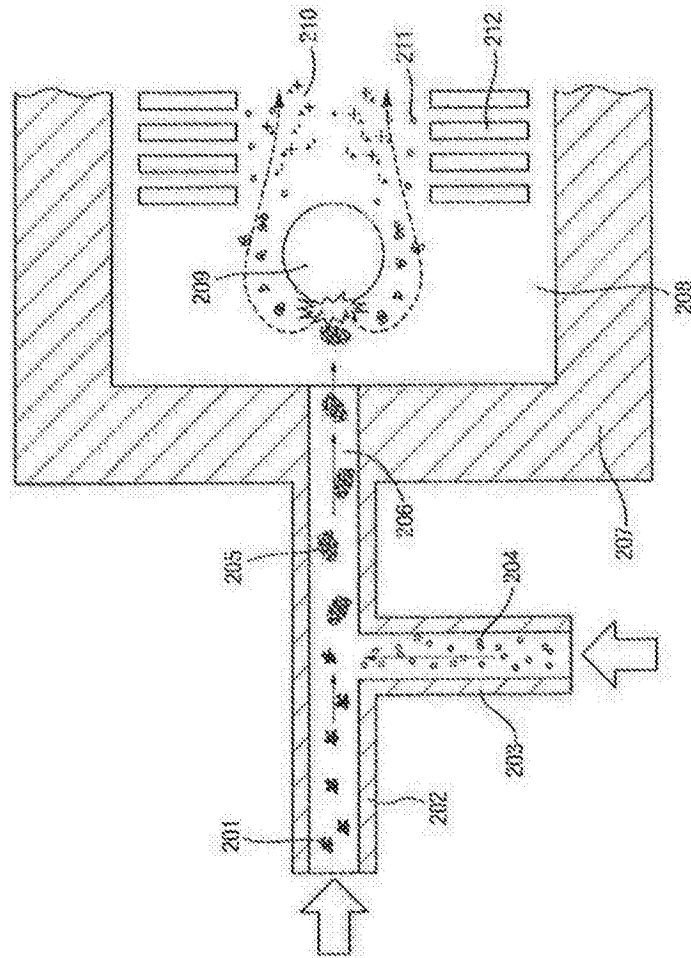


图11

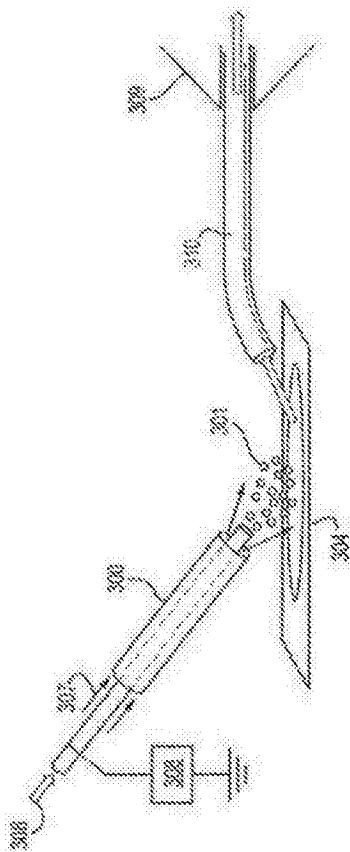


图12A

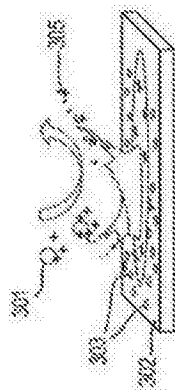


图12B

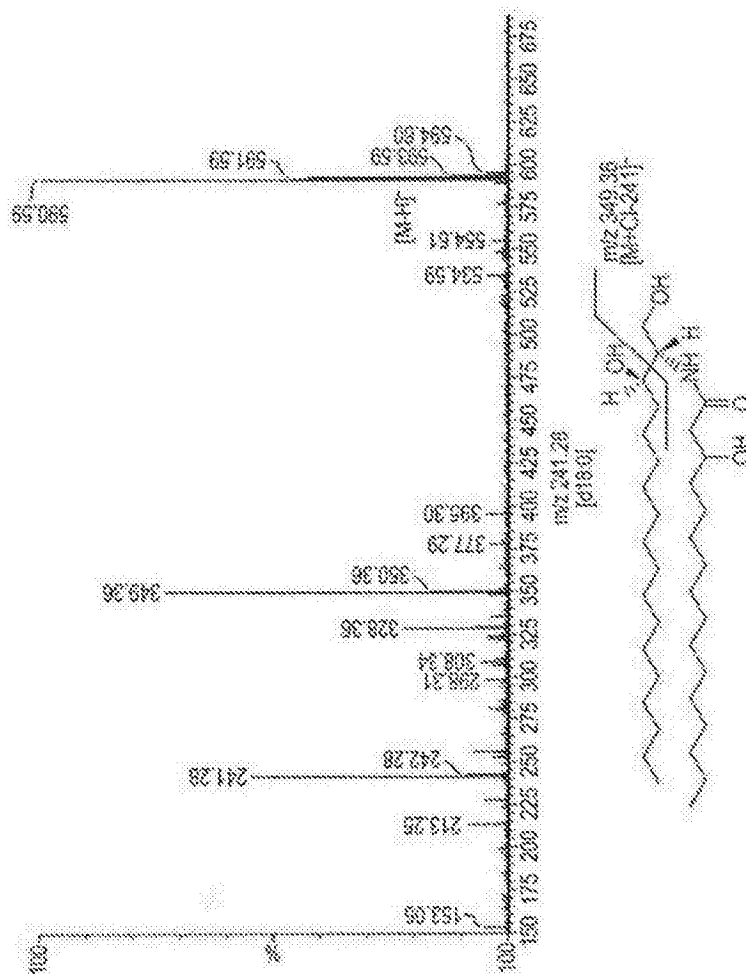


图13

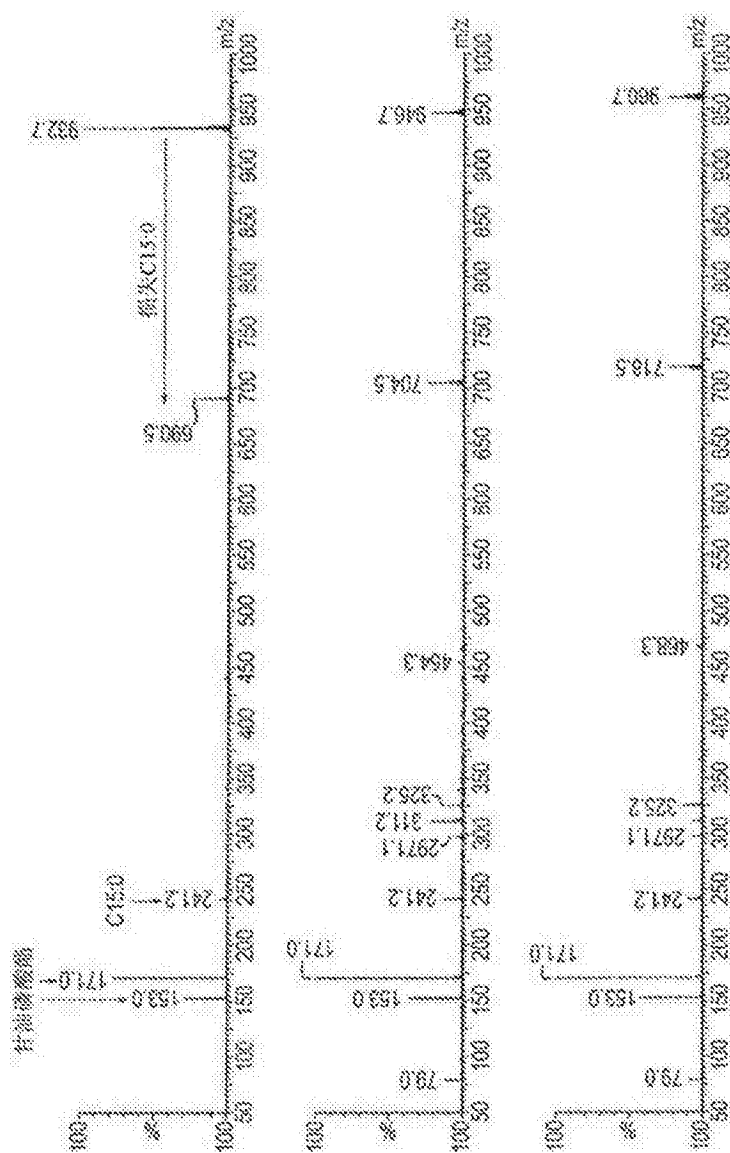


图14

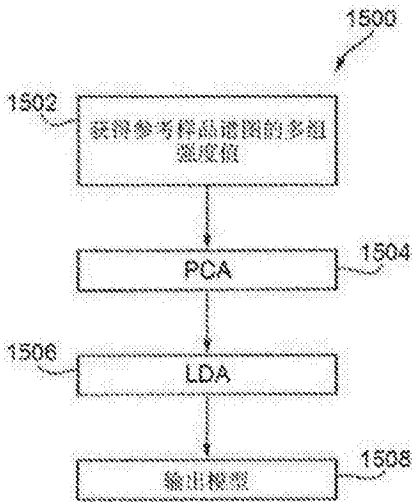


图15

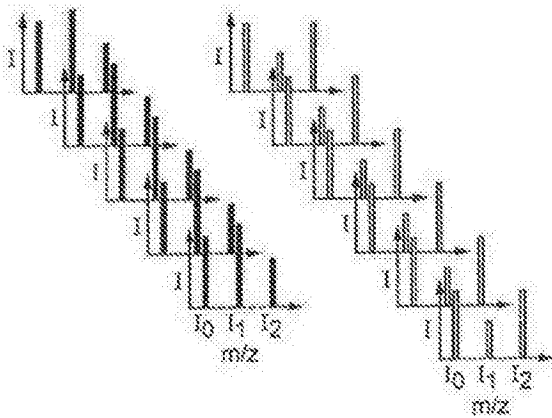


图16

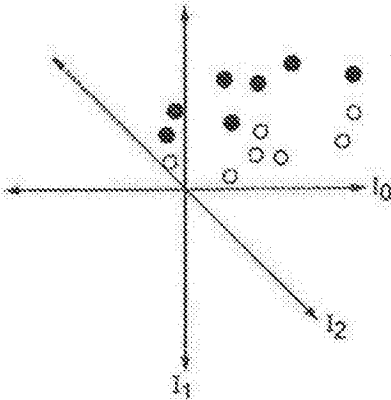


图17

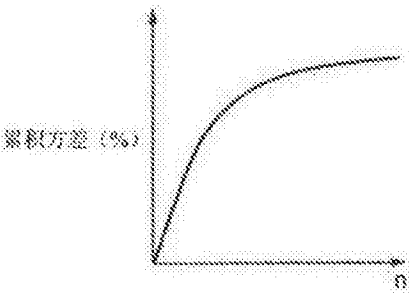


图18

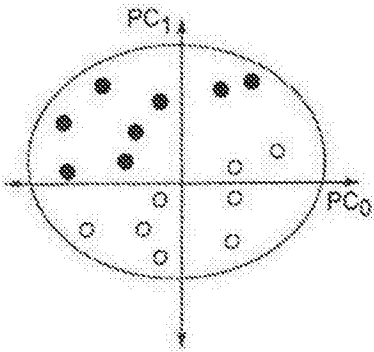


图19



图20

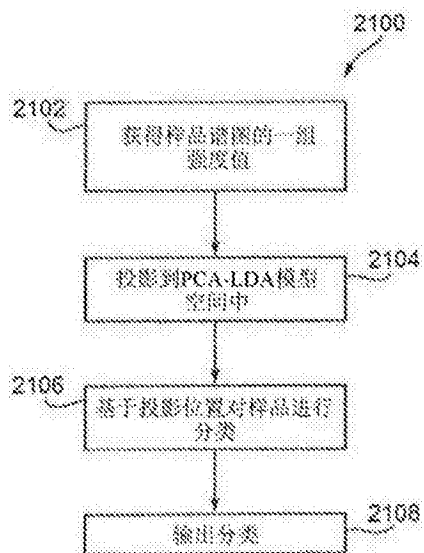


图21

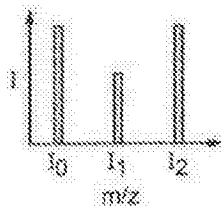


图22



图23

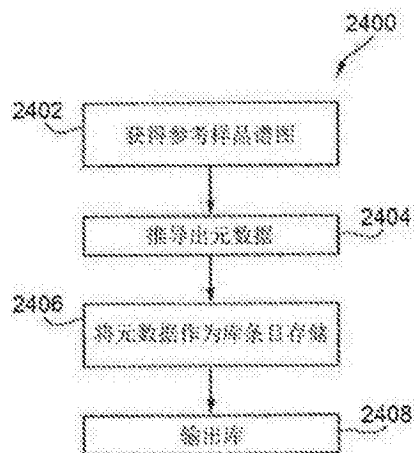


图24

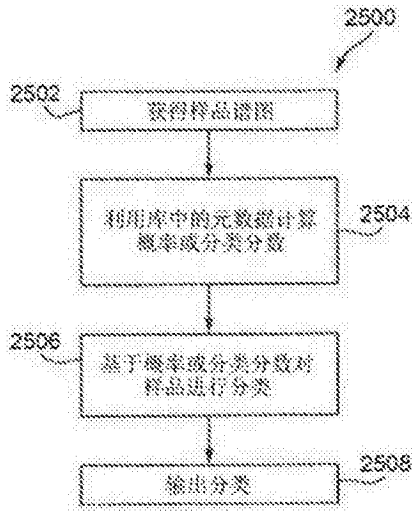


图25

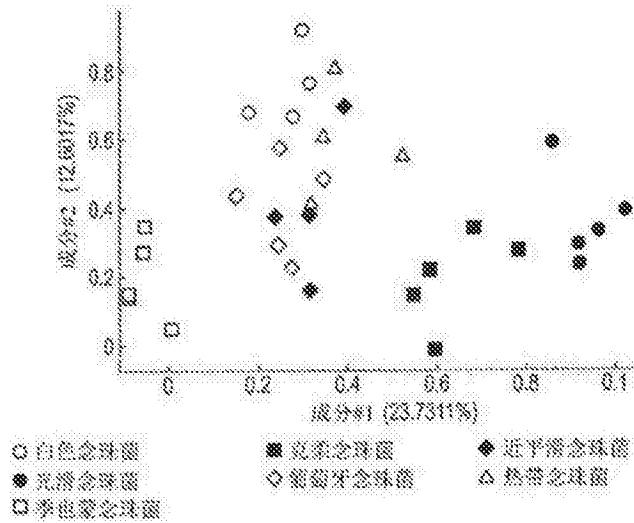


图26A

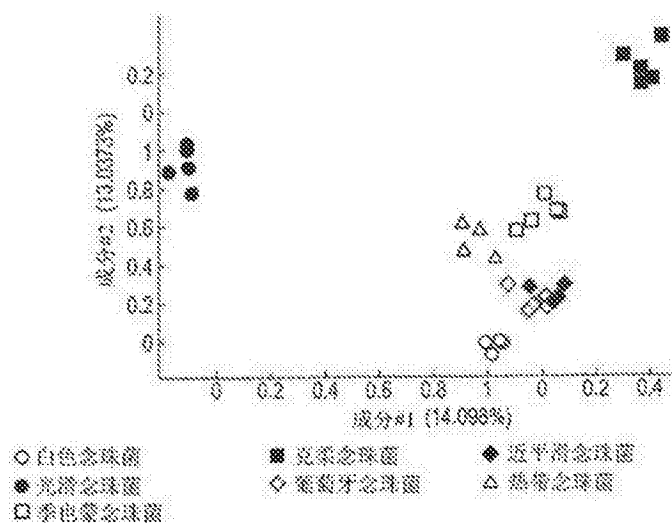


图 26B

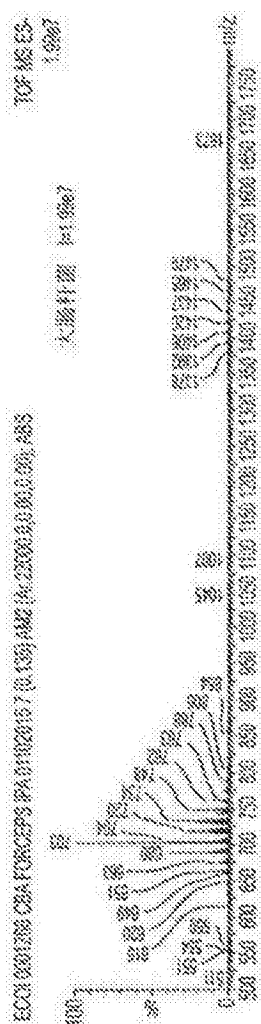


图 27A

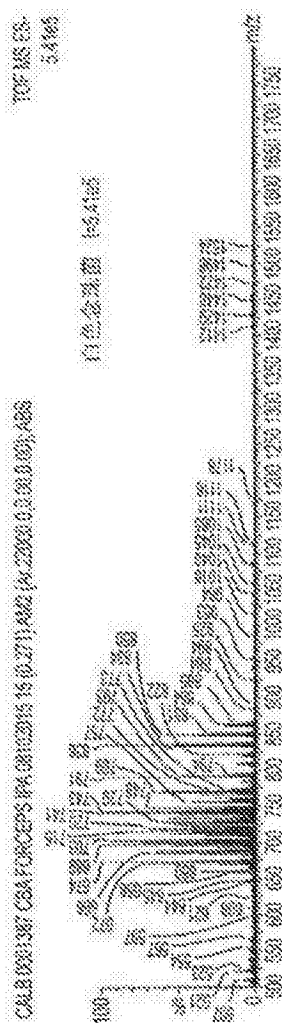


图27B

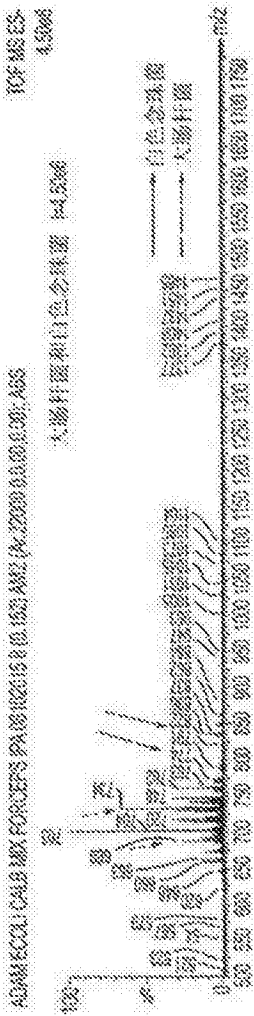


图27C

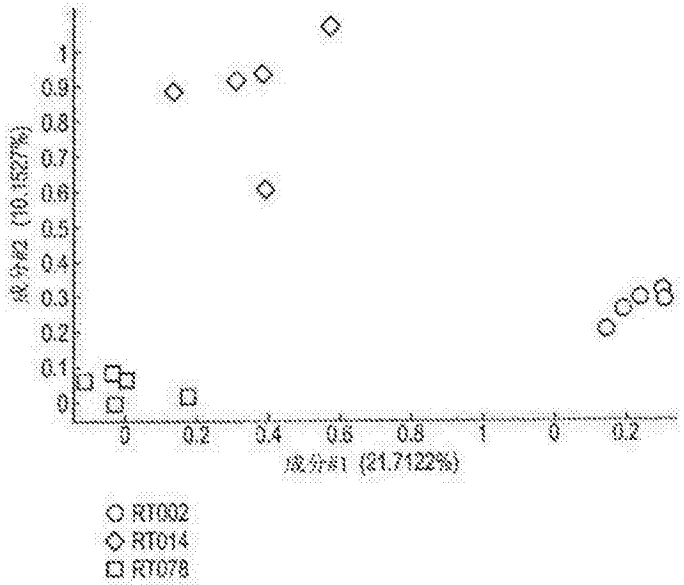


图28

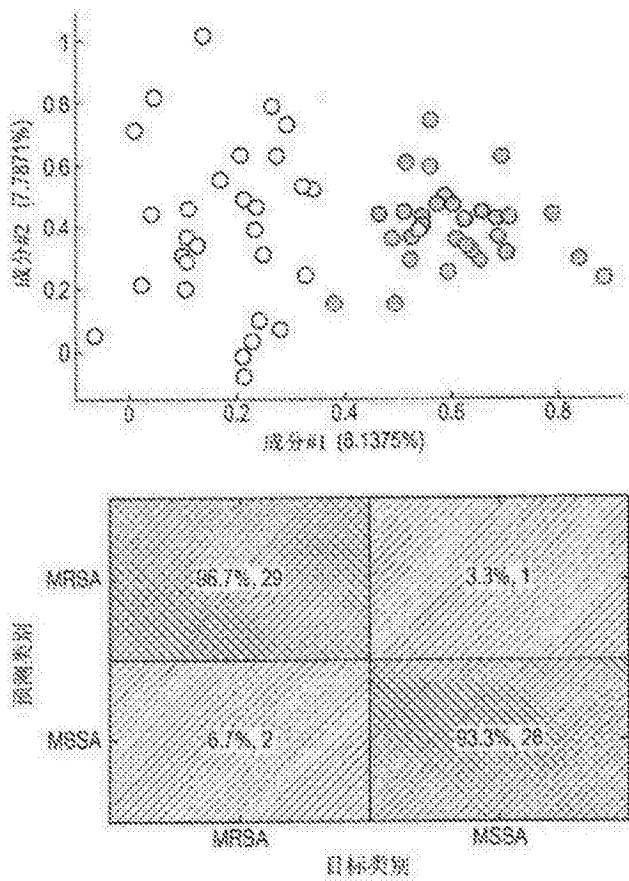


图29

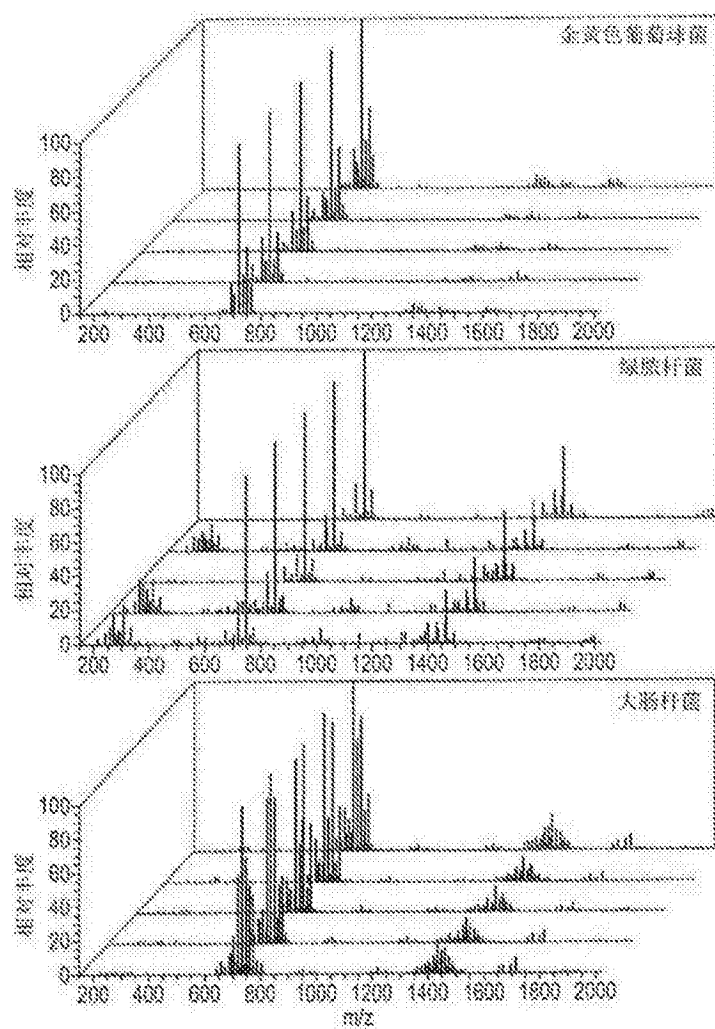


图30

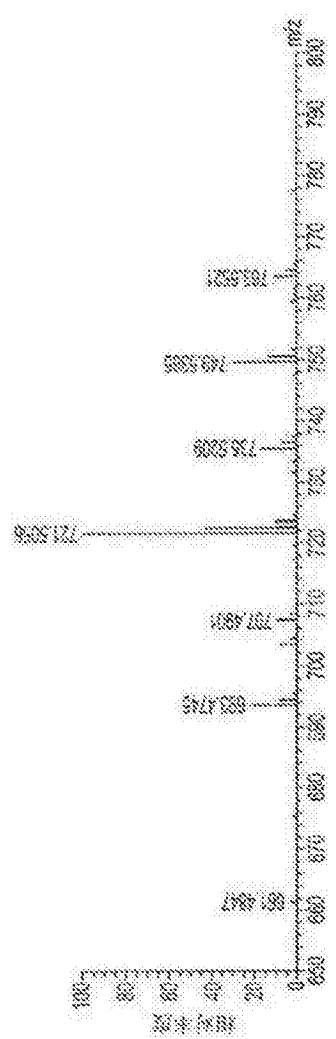


图31A

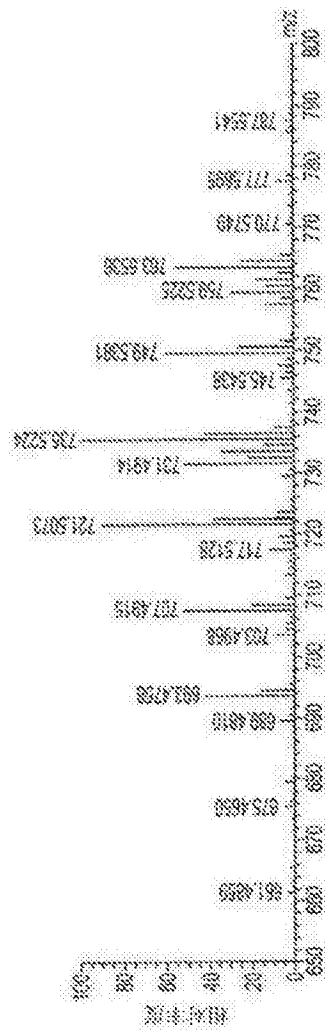


图31B

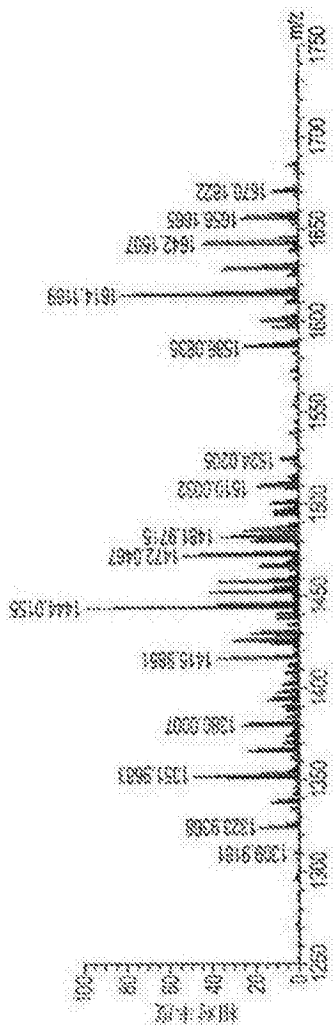


图31C

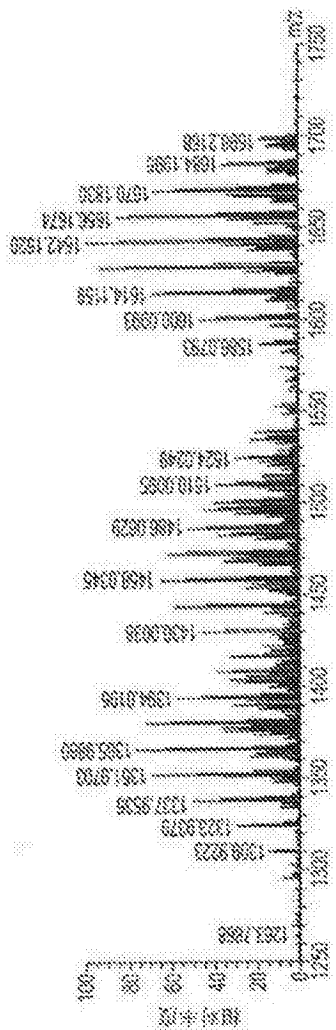


图31D

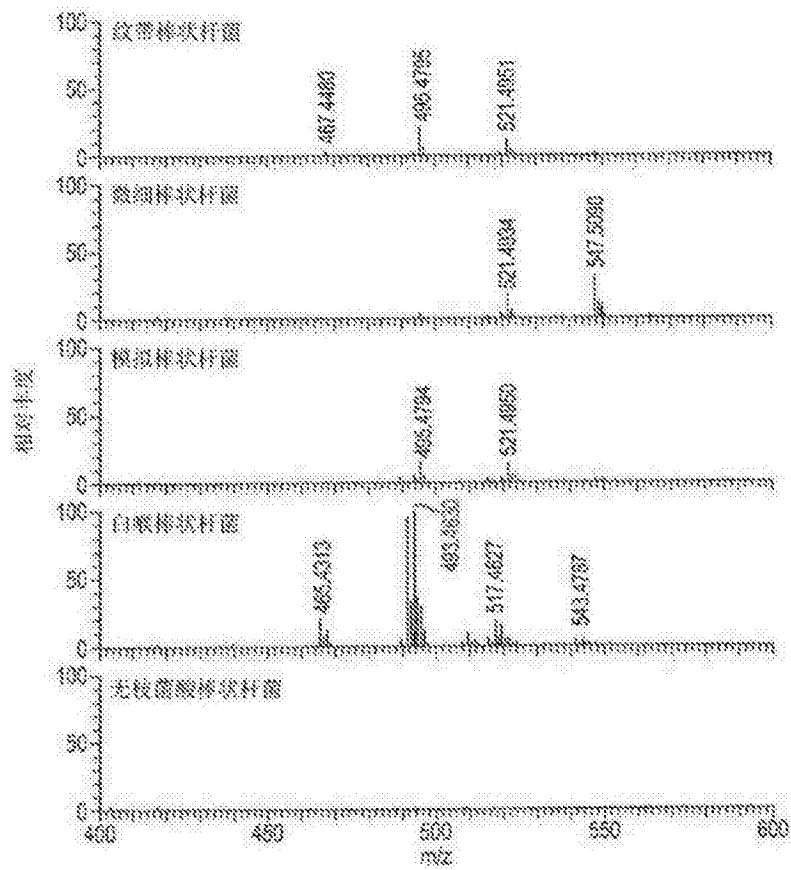


图32

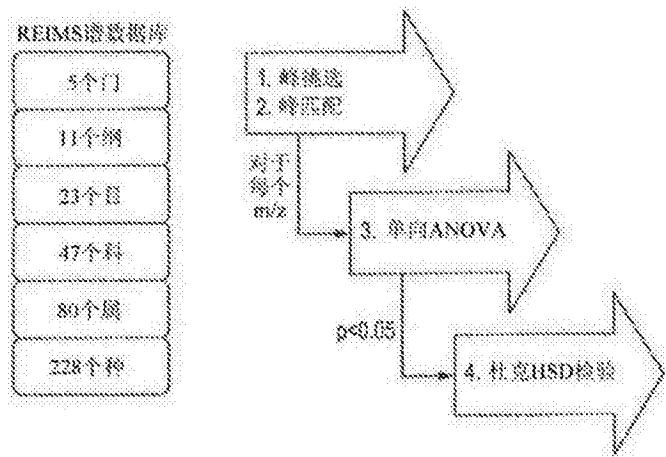


图33

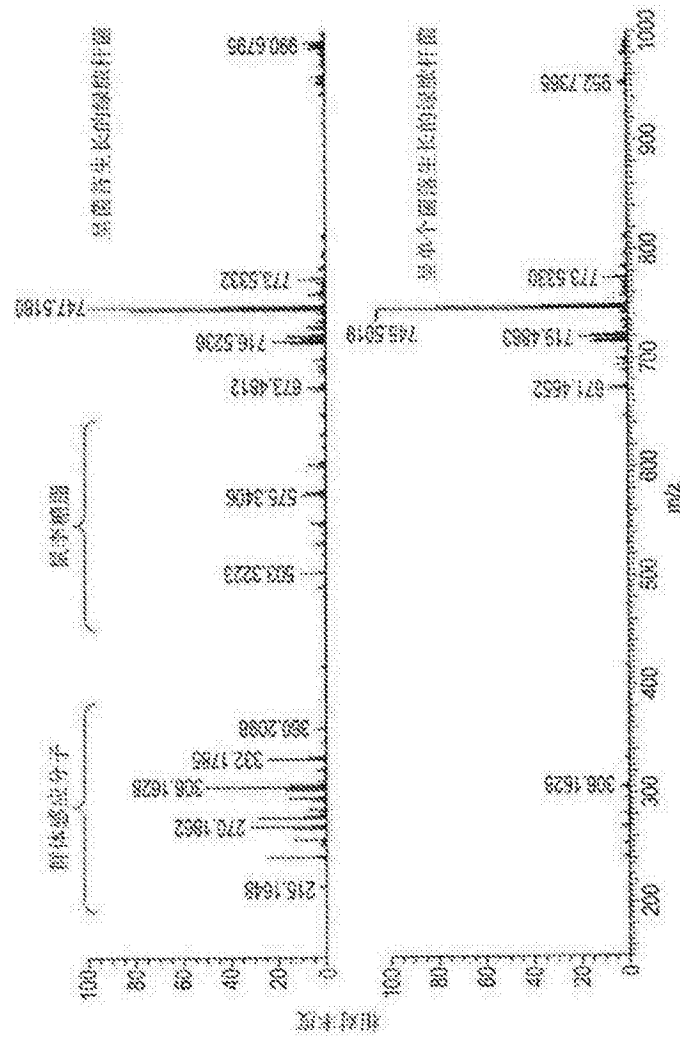


图34

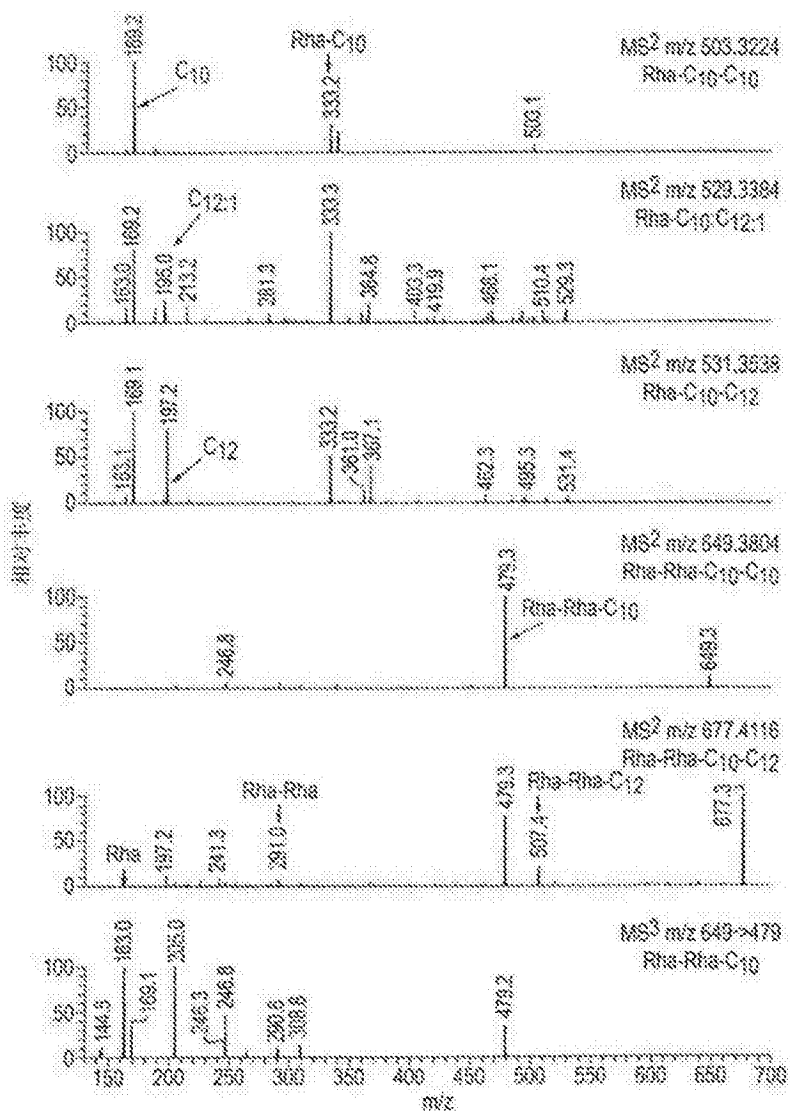


图35

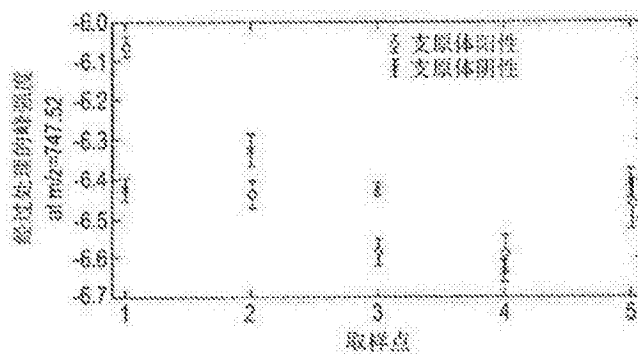


图36

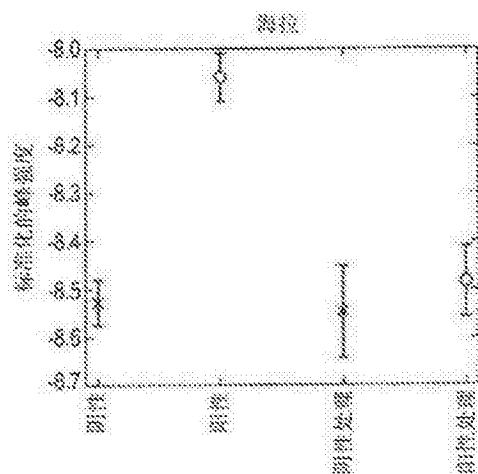


图38B

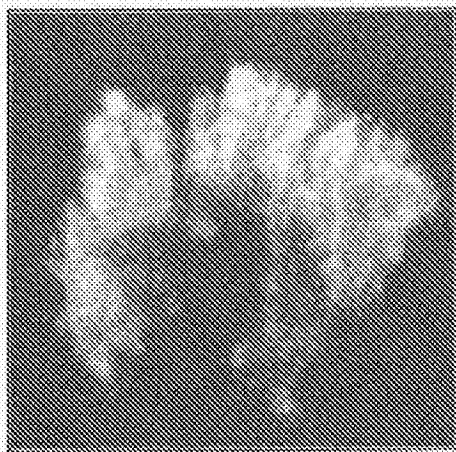


图39A

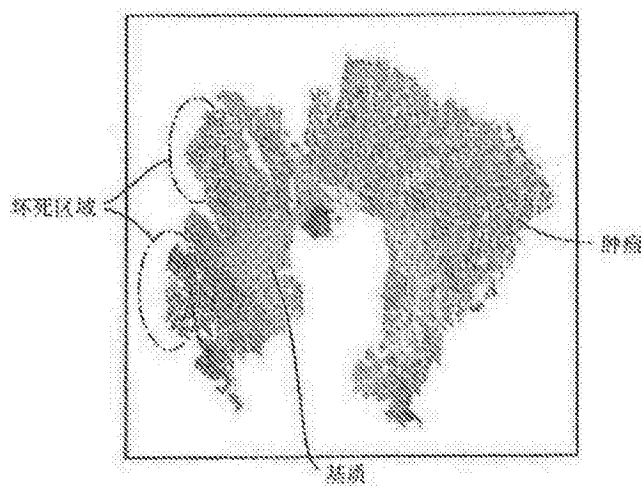


图39B

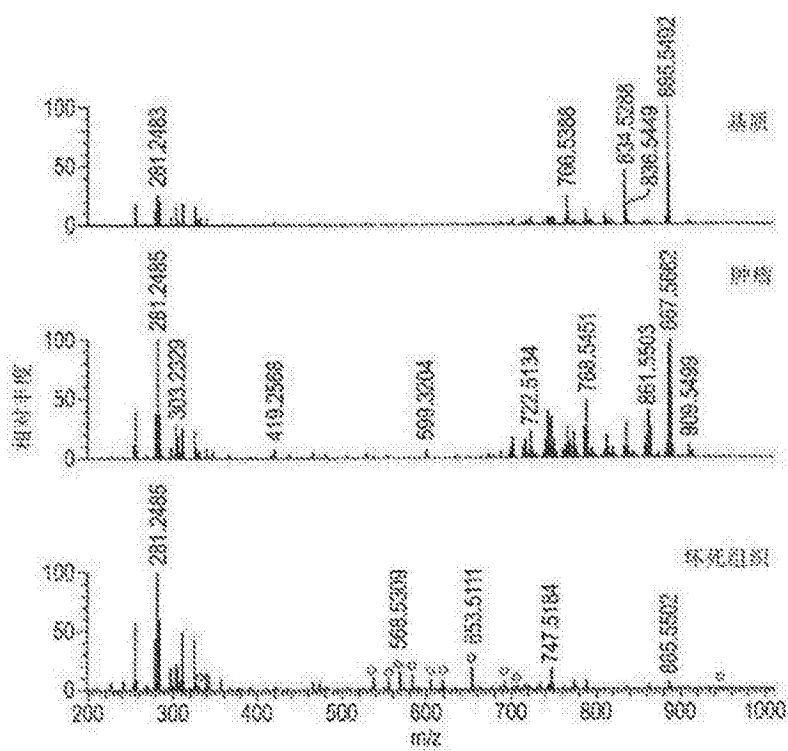


图40

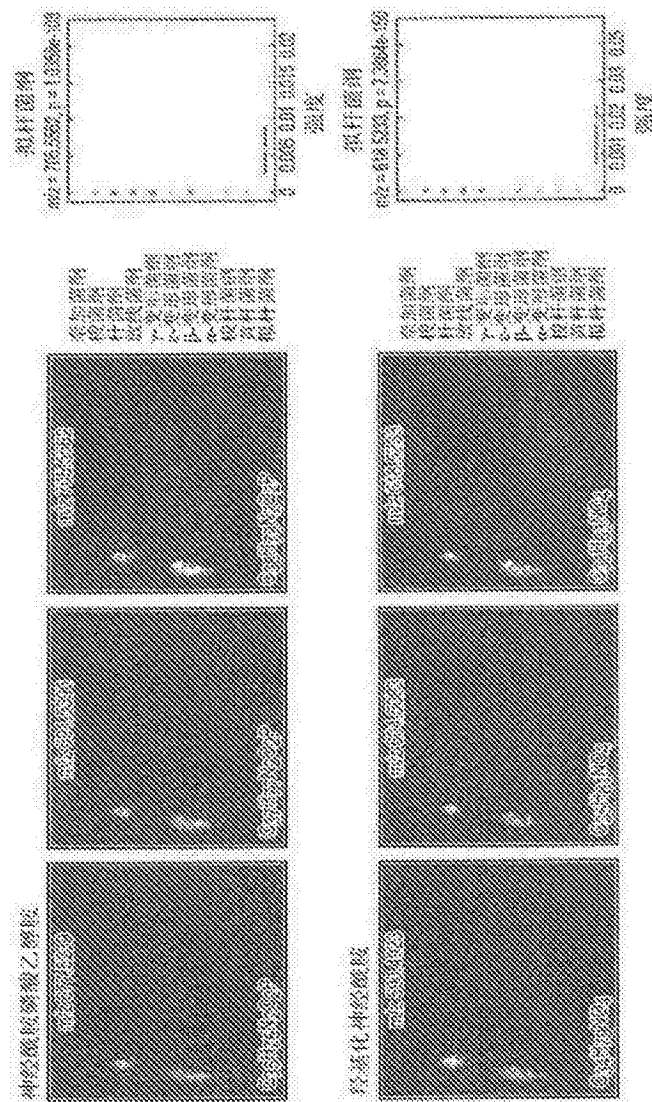


图41

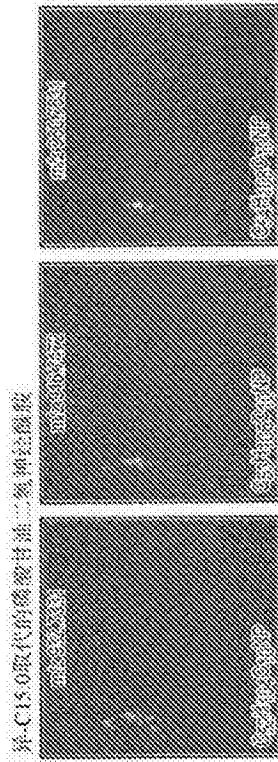


图41 (续)

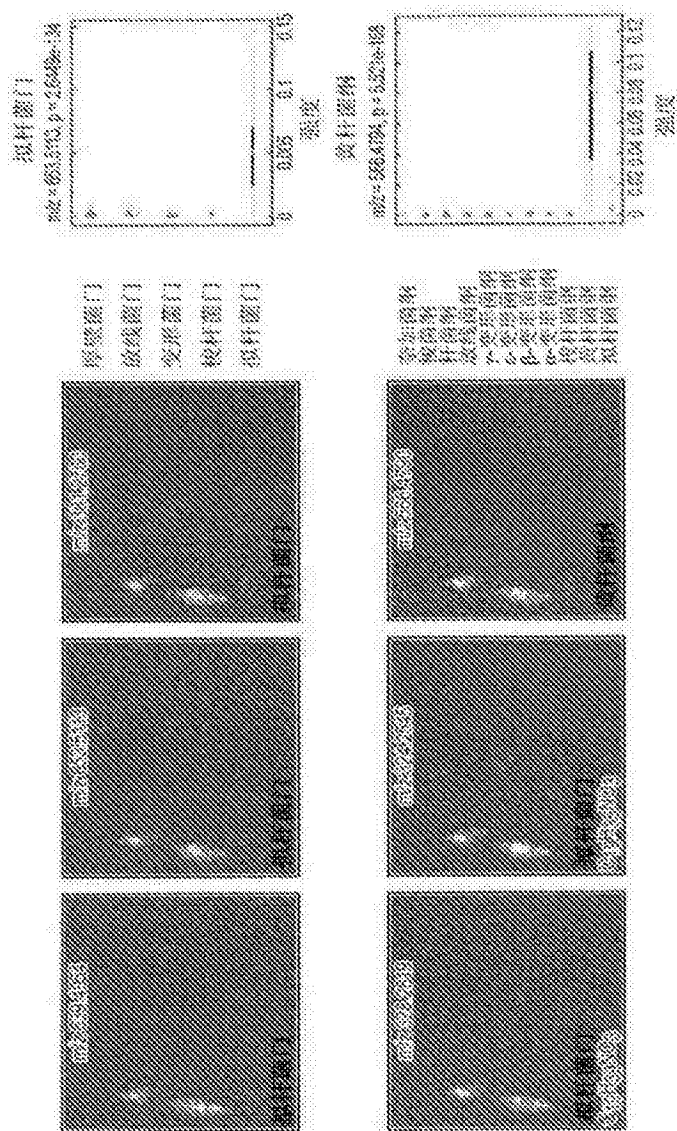


图42

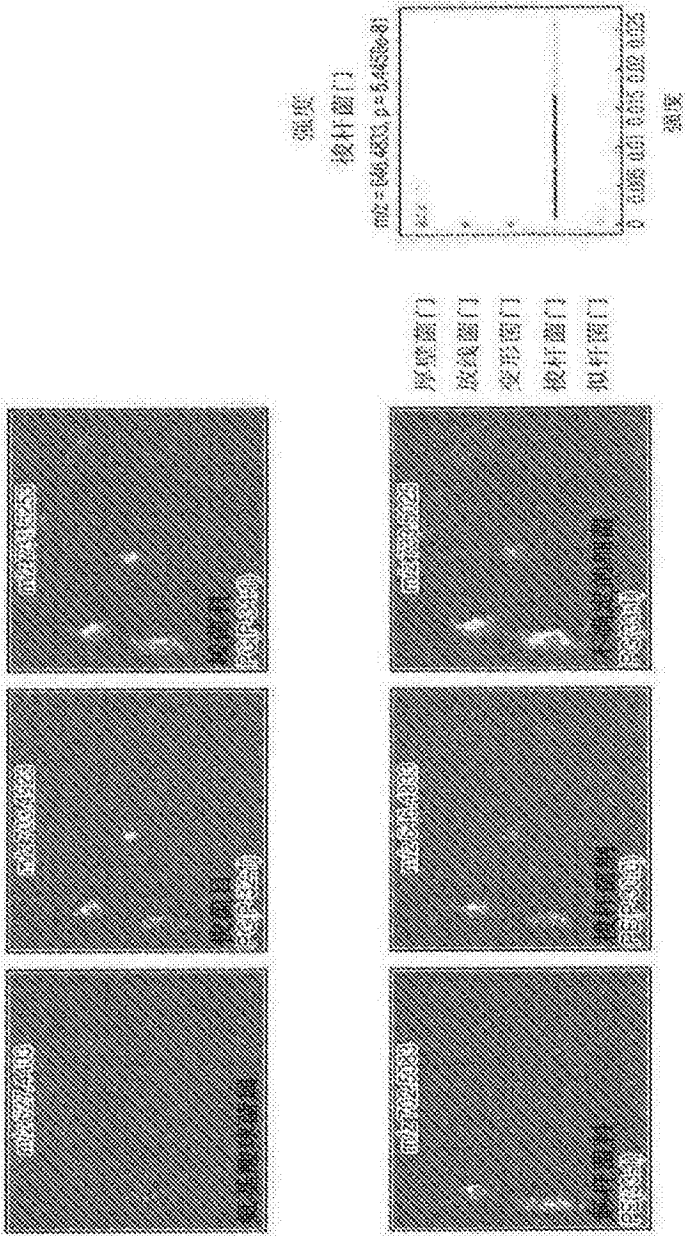


图42 (续)

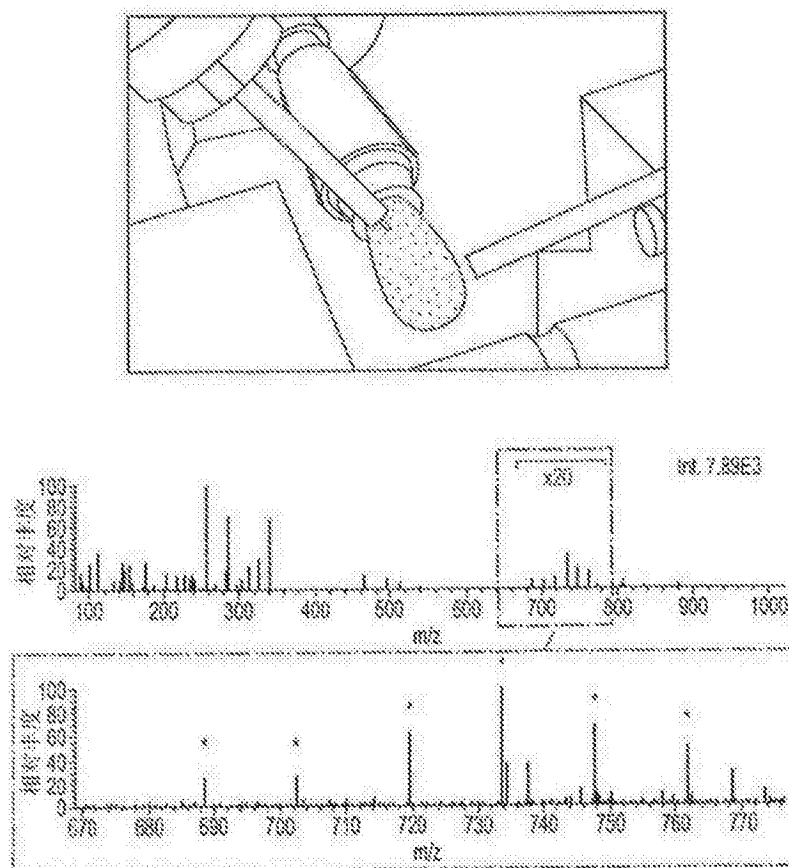


图43A

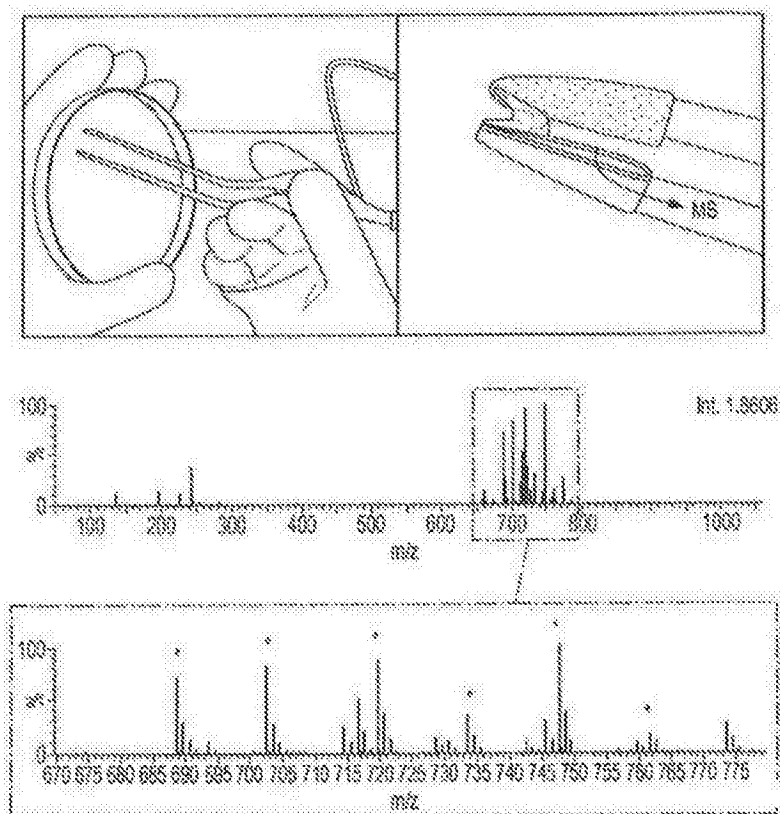


图43B

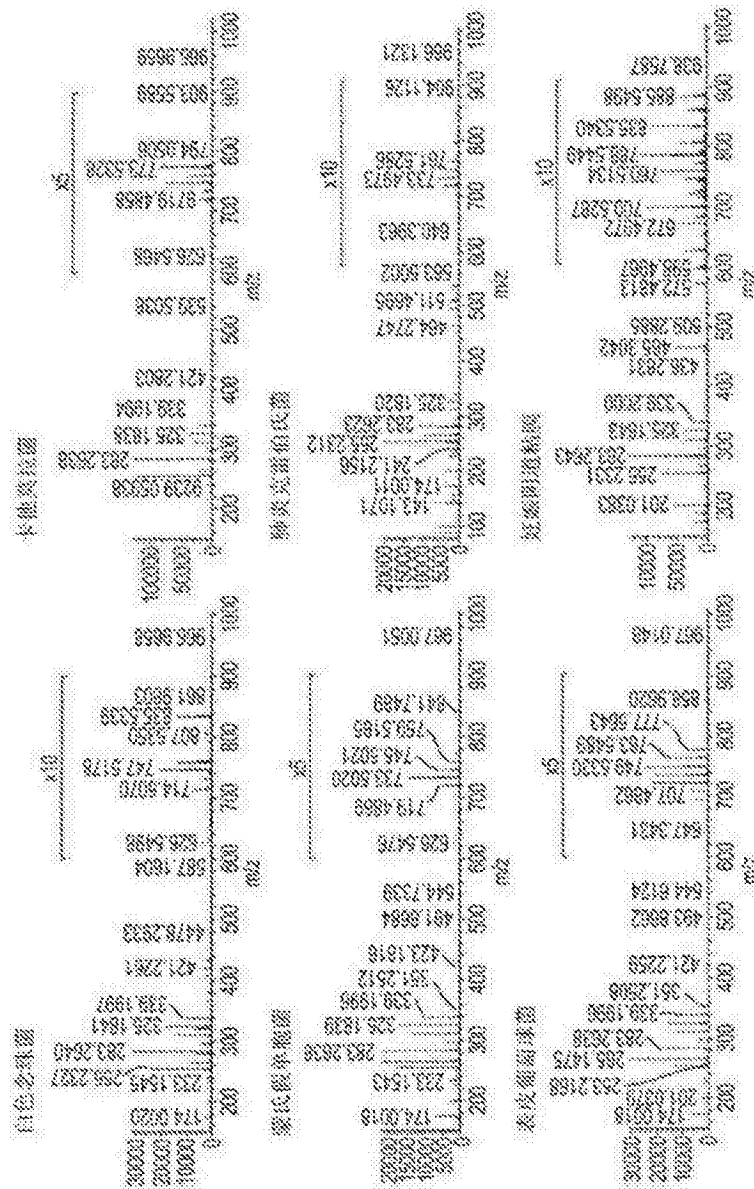


图44A

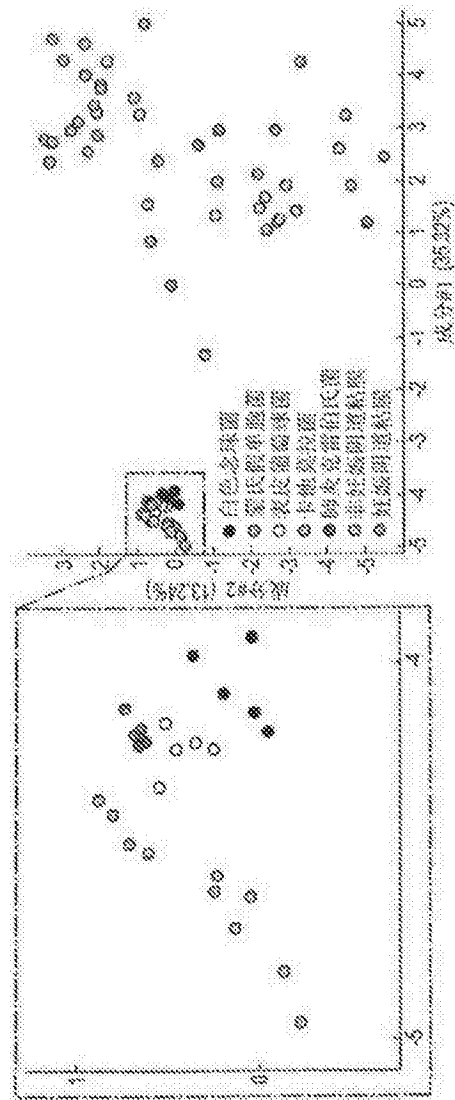


图44B

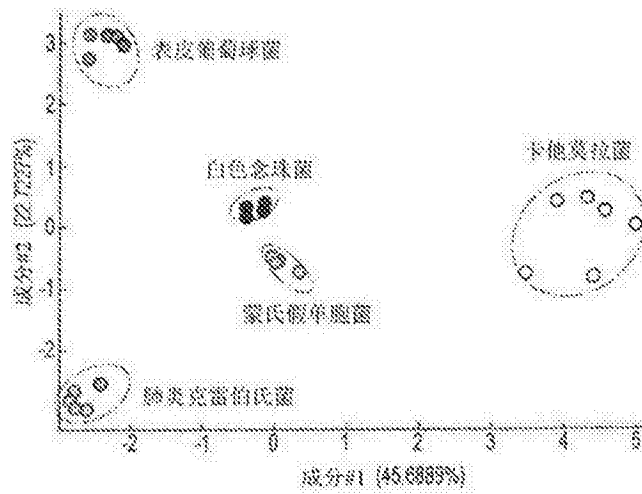


图44C

专利名称(译)	微生物的谱分析		
公开(公告)号	CN107667288A	公开(公告)日	2018-02-06
申请号	CN201680026939.2	申请日	2016-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	英国质谱公司		
申请(专利权)人(译)	英国质谱公司		
当前申请(专利权)人(译)	英国质谱公司		
[标]发明人	佐尔坦塔卡茨 弗朗西丝博尔特 塔马斯卡兰斯 埃姆斯琼斯 基思理查森 拉约什高迪尔海兹 丹尼尔绍洛伊 茱莉亚巴洛格 史蒂文德里克普林格尔 丹尼尔西蒙		
发明人	佐尔坦·塔卡茨 弗朗西丝·博尔特 塔马斯·卡兰斯 埃姆斯·琼斯 基思·理查森 拉约什·高迪尔海兹 丹尼尔·绍洛伊 茱莉亚·巴洛格 史蒂文·德里克·普林格尔 丹尼尔·西蒙		
IPC分类号	G01N27/62 A61B10/02		
CPC分类号	H01J49/049 A61B1/00013 A61B1/041 A61B1/2736 A61B1/31 A61B5/0066 A61B5/0075 A61B5/015 A61B5/0507 A61B5/055 A61B5/14542 A61B6/032 A61B6/037 A61B8/13 A61B10/00 A61B10/0041 A61B10/0233 A61B10/0283 A61B17/00 A61B17/320068 A61B18/00 A61B18/04 A61B18/042 A61B18 /14 A61B18/1445 A61B18/1815 A61B18/20 A61B90/13 A61B2010/0083 A61B2017/320069 A61B2018 /00577 A61B2018/00589 A61B2018/00994 A61B2218/002 A61B2218/008 A61F13/38 C12Q1/025 C12Q1/04 C12Q1/18 C12Q1/24 G01N1/2202 G01N3/00 G01N9/00 G01N27/622 G01N27/624 G01N30 /724 G01N33/487 G01N33/48735 G01N33/6848 G01N33/6851 G01N33/92 G01N2001/2223 G01N2333 /195 G01N2405/00 G01N2405/04 G01N2405/08 G01N2570/00 G01N2800/26 G06F19/324 G06F19 /3481 G16B20/00 G16H10/40 G16H15/00 G16H50/20 H01J49/0004 H01J49/0027 H01J49/0031 H01J49/0036 H01J49/025 H01J49/0404 H01J49/0409 H01J49/0422 H01J49/044 H01J49/0445 H01J49 /0459 H01J49/0463 H01J49/0468 H01J49/061 H01J49/068 H01J49/10 H01J49/14 H01J49/16 H01J49 /164 H01J49/24 H01J49/26 G01N27/62		
优先权	2015003863 2015-03-06 GB 2015018369 2015-10-16 GB 2015003864 2015-03-06 GB 2015003867 2015-03-06 GB 2015003878 2015-03-06 GB 2015016003 2015-09-09 GB 2015003879 2015-03-06 GB		

外部链接

[Espacenet](#) [SIPO](#)

摘要(译)

本申请公开一种使用质谱法和/或离子迁移谱法进行分析的方法。所述方法包含：使用第一装置从包含微生物群体或由其组成的目标产生烟雾、气溶胶或蒸气；对所述烟雾、气溶胶或蒸气或者由此衍生的离子进行质量分析和/或离子迁移率分析，以获得谱数据；以及分析所述谱数据以分析所述微生物群体。

