



陕西师范大学  
SHAANXI NORMAL UNIVERSITY

研究生教育教学改革研究项目  
(研究生优质课程项目)

生物实验室安全及大型仪器应用

气相色谱-微生物自动鉴定

主讲教师 刘清梅

生命科学学院实验教学中心



# 气相色谱-微生物自动鉴定

1

气相色谱

2

微生物自动鉴定

---

# 一、气相色谱

## 1. 色谱法的定义和特点

1903年，茨维特做了一个植物色素分离实验。在一玻璃管中放入碳酸钙，将含有植物色素（植物叶的提取液）的石油醚倒入管中。此时，玻璃管的上端立即出现几种颜色的混合谱带。然后用纯石油醚冲洗，随着石油醚的加入，谱带不断地向下移动，并逐渐分开成几个不同颜色的谱带，继续冲洗就可分别接得各种颜色的色素，并可分别进行鉴定。色谱法也由此而得名。



# 一、气相色谱

## 1. 色谱法的定义和特点

- ❖ 1931年德国的Kuhn和Lederer用氧化铝和碳酸钙分离了胡萝卜素等
  - ❖ 1941年英国的Martin和Synge提出用气体代替液体作流动相的可能性，11年之后James和Martin发表了从理论到实践比较完整的气液色谱方法因而获得了1952年的诺贝尔化学奖
  - ❖ 1957年瑞士的Golay开创了开管柱气相色谱法 ( Open-Tubular Column Chromatography ) 习惯上称为毛细管柱气相色谱法(Capillary Column Chromatography)
-

# 一、气相色谱

## 1. 色谱法的定义和特点

- ❖ 定义：利用混合物中的不同组分在**固定相**和**流动相**中分配系数(或吸附系数、渗透性等)的差异，使不同组分在作相对运动的两相中进行反复分配，实现分离的分析方法
  - ❖ 混合物最有效的分离分析方法
-

# 一、气相色谱

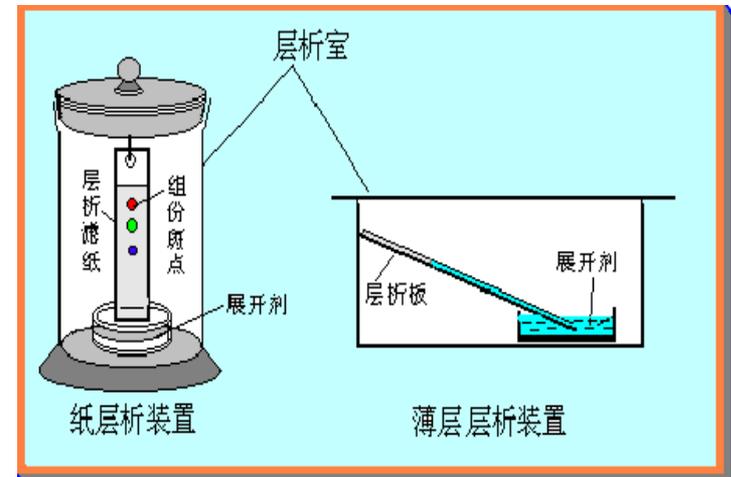
## 2. 色谱法的分类

根据流动相的  
物态可分为

- 气相色谱(GC)
- 液相色谱(LC)
- 超临界流体色谱(SFC)

根据固定相的  
外形可分为

- 柱色谱
- 平板色谱
- 纸层析



# 一、气相色谱

## 2. 色谱法的分类

根据分离机理  
可分为

吸附色谱

分配色谱

离子交换色谱

排阻色谱

生物亲和色谱

# 一、气相色谱

## 3. 气相色谱理论

- ❖ 气相色谱可分析的有机物占目前发现总有机物的**15~20%**。
  - ❖ 应用范围：  
挥发温度  $< 500^{\circ}\text{C}$   
热稳定性好  
相对分子量  $< 400$
-

# 一、气相色谱

## 3. 气相色谱理论

❖ **定义：**气相色谱法是以惰性气体（载气）为流动相，以固定液或固体吸附剂作为固定相的色谱法。

按固定相分类： 气-固色谱      气-液色谱

按分离原理分： 吸附色谱      分配色谱

按柱子粗细分： 填充柱色谱      毛细管柱色谱

❖ **气相色谱过程：**待测物样品被蒸发为气体并注入到色谱分离柱柱顶，以惰性气体（指不与待测物反应的气体，只起运载蒸汽样品的作用，也称载气）将待测物样品蒸汽带入柱内分离。

❖ **分离原理：**基于待测物在气相和固定相之间的吸附-脱附（气固色谱）和分配（气液色谱）来实现的。因此可将气相色谱分为气固色谱和气液色谱。

# 一、气相色谱

## 3. 气相色谱理论

❖ 气相色谱法的特点：“三高” “一快” “一广”

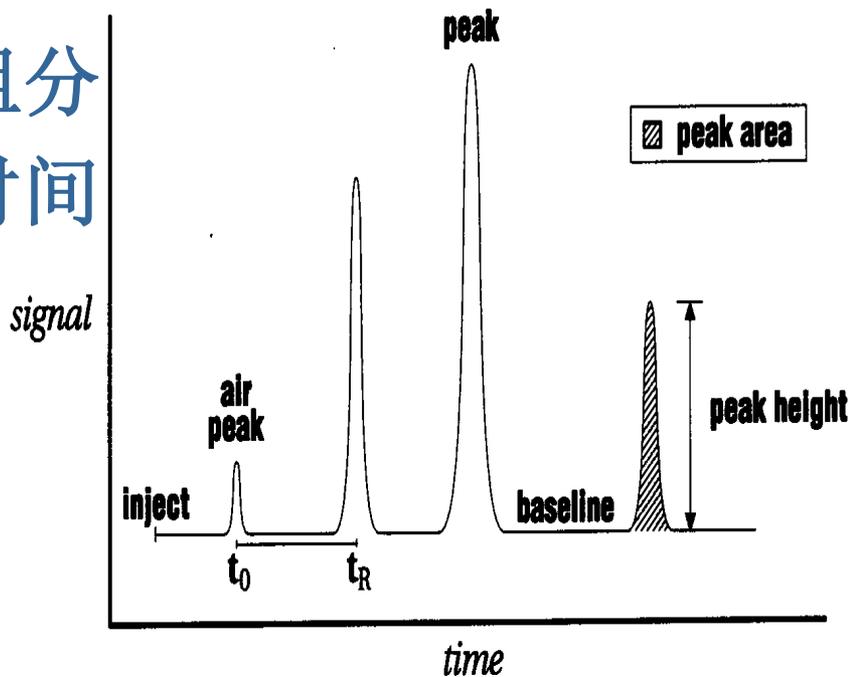
1. **高效能**：一般填充柱的理论塔板数可达数千，毛细管柱可达一百多万。
2. **高选择性**：可以使一些分配系数很接近的以及极为复杂、难以分离的物质，获得满意的分离。
3. **高灵敏度**：可以检测 $10^{-11} \sim 10^{-13}$ g物质，适合于痕量分析
4. **分析速度快**：一个试样的分析可在几分钟到几十分钟内完成。
5. **应用广泛**：可以分析气体试样，也可分析易挥发或可衍生转化为易挥发的液体和固体。  
分析的有机物，约占全部有机物(约300万种)的20%。
6. **不足之处**：对被分离组分的定性能力较差。

# 一、气相色谱

## 3. 气相色谱理论

### ❖ 色谱图

- ❖ 检测信号和时间的关系图
- ❖ 不同的色谱峰对应相应的组分
- ❖ 可以得到相应组分的保留时间和峰面积信息
- ❖ 保留时间 - 定性分析
- 峰面积 - 定量分析



# 一、气相色谱

## 基本术语

**保留时间 (Retention time):**

组份从进样到出现最大值所需要的时间,  $t_R$

**死时间(dead time):**

不被固定相滞留的组份, 从进样到出峰最大值所需要的时间,  $t_0$

**峰高 (Peak Heigh)**

从峰最大值到峰底的距离,

**峰面积 (Peak Area)**

峰与峰底之间的面积

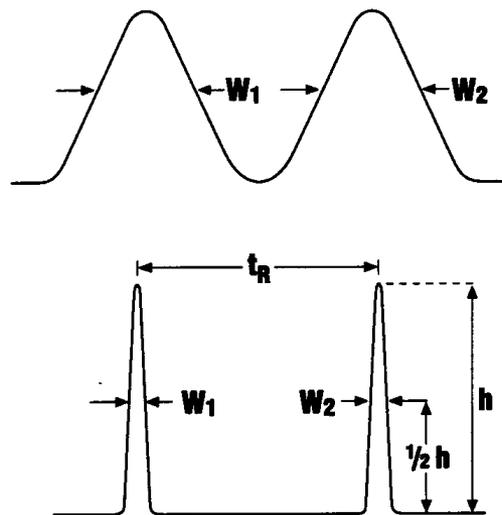
---

# 一、气相色谱

## 分离度 (Resolution)

两个相邻峰的分离程度。以两个组份保留值之差与其平均半峰宽值的比来表示：

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_2 + W_1}$$

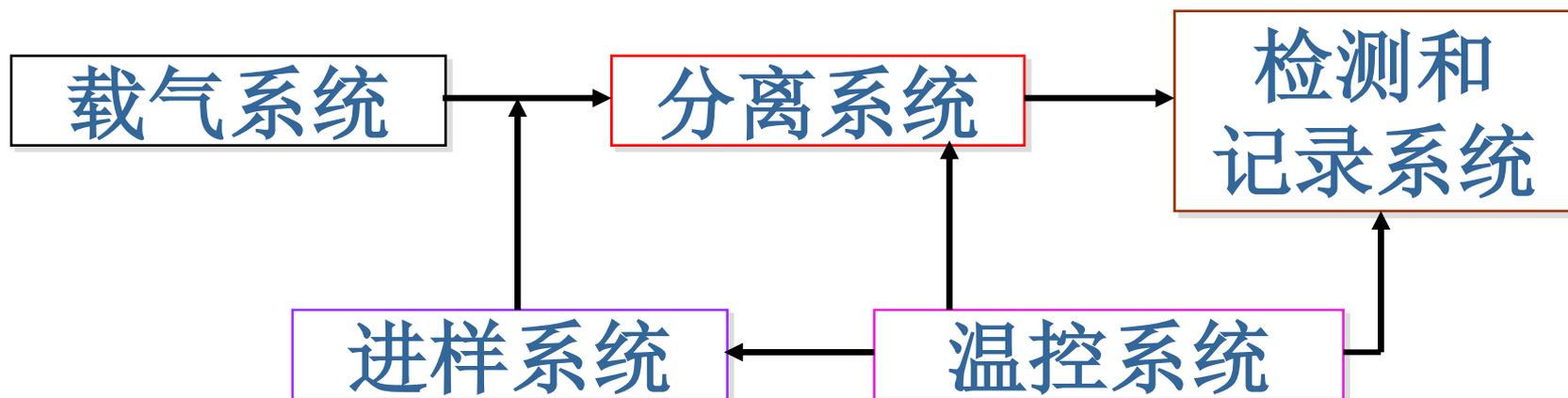
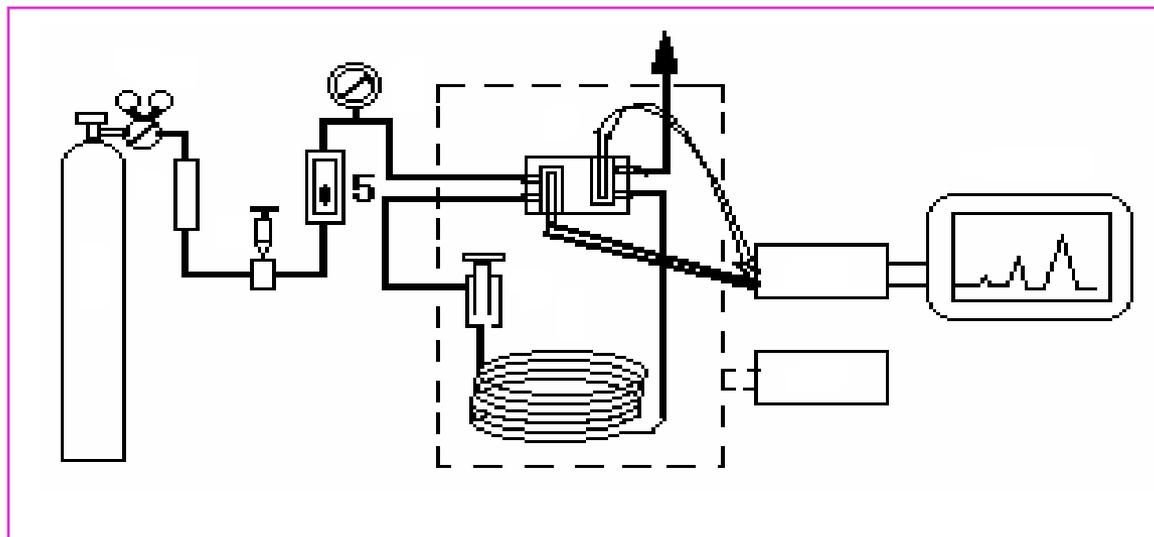


Resolution of packed (*top*) and capillary (*bottom*) columns

- 当  $R=1$  时，有 5% 的重叠；
- 当  $R=1.5$  时，分离程度为 99.7%，可视为基线分离
- 毛细管色谱柱比填充柱有更高的分辨率。

# 一、气相色谱

## 3. 气相色谱系统



# 一、气相色谱

## (1) 载气系统

载气系统 { 气源  
净化干燥管  
载气流速控制装置

常用载气：氮气、氦气、氢气及氩气

载气选择依据 { 检测器  
柱效

# 一、气相色谱

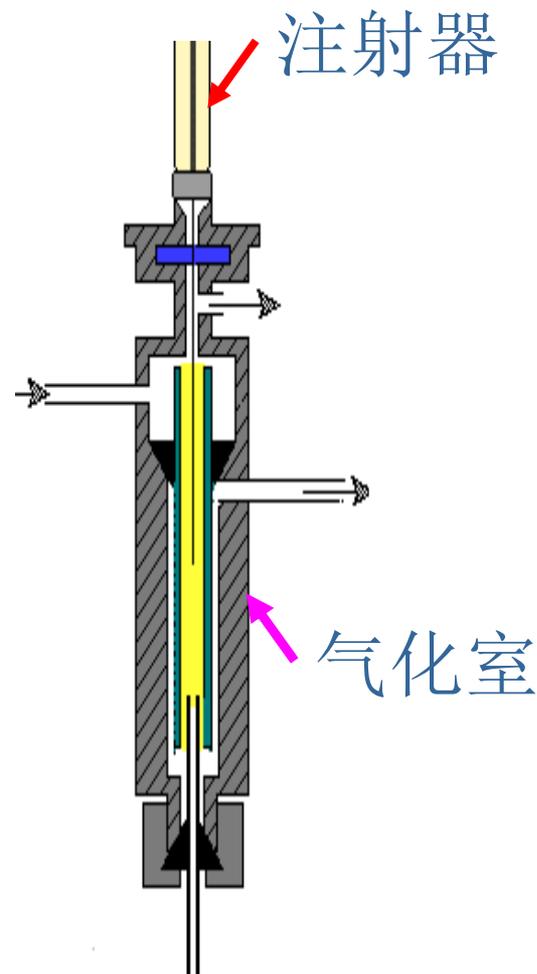
## (2) 进样系统

进样系统

进样器

气化室

温度比柱温高出10~50°C



# 一、气相色谱

## (3) 分离系统（色谱柱）

色谱柱	填充柱	毛细管柱
柱内径	2-4 mm	0.05-0.8 mm
柱长度	2-3 m	10-150 m
总塔板数	$\sim 10^3$	$\sim 10^6$
样品容量	10-1000ug	0.1-50ug



# 一、气相色谱

## (4) 温控系统

- **柱温**：是影响分离的最重要的因素。其变化应小 $\pm 0. x^{\circ}\text{C}$ 。选择柱温主要考虑样品待测物沸点和分离的要求。柱温通常要等于或略高于样品的平均沸点(分析时间20-30min)；对宽沸程的样品，应使用程序升温方法。
  - **柱温分为恒温 and 程序升温两种**
    - 恒温**：对于沸程不太宽的简单样品，可采用恒温模式。一般的气体分析和简单液体样品分析都采用恒温模式
    - 程序升温**：对于沸程较宽的复杂样品，如果在一恒温下分很难达到好的分离效果。
-

# 一、气相色谱

## (5) 检测系统

### ❖ 通用型检测器

热导检测器 (**TCD**)

氢火焰检测器 (**FID**)

### ❖ 选择性检测器

电子捕获 (**ECD**)

脉冲火焰光度检测器 (**PFPD**)

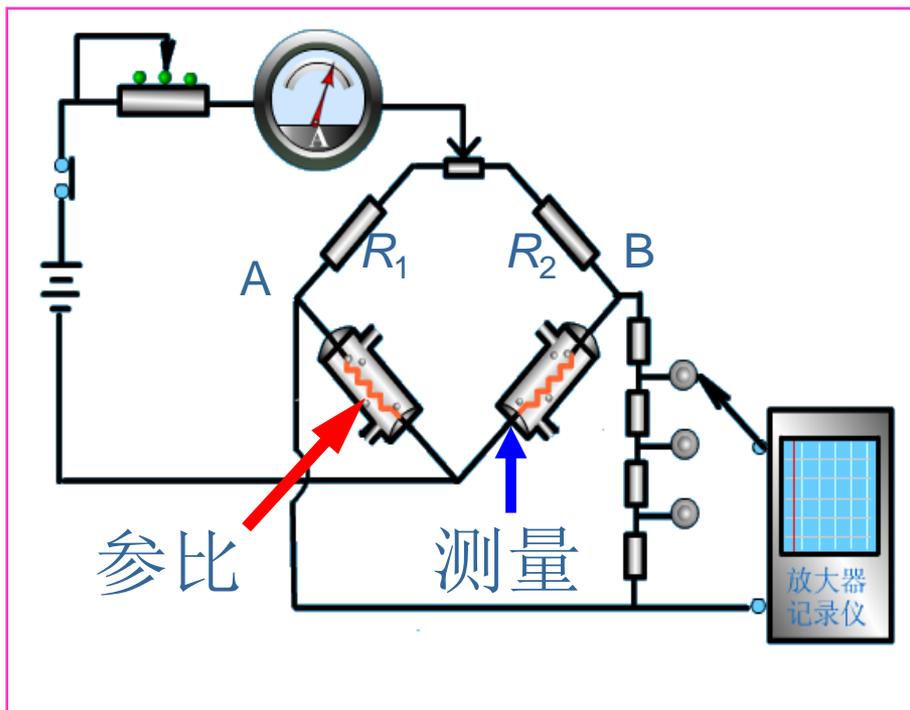
氮磷检测器 (**TSD**)

---

# 一、气相色谱

## (5) 检测系统

### 热导池检测器 (TCD)



只有载气通过时

$$R_1 * R_{参比} = R_2 * R_{测量}$$

载气+组分

$$R_1 * R_{参比} \neq R_2 * R_{测量}$$

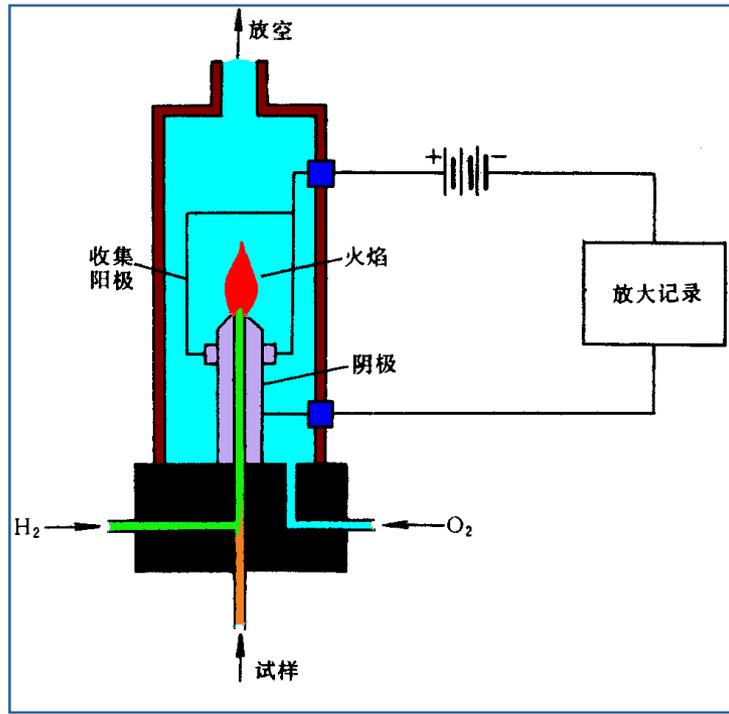
利用载气与组分热导系数的差异进行测量

# 一、气相色谱

## (5) 检测系统

### 氢火焰离子化检测器 (FID)

- 在火焰头和收集极（电极）上加一电压；有机物都在火焰中燃烧(2000°F)
- 在电极之间产生离子化介质和电子
- 带电粒子被收集极吸引和捕获；离子流被放大和记录



# 一、气相色谱

## 氢火焰离子化检测器 (FID)

### 响应

- 离子数目正比于碳原子数目(C-H键)。
- 一些官能团如羰基(CO=)、羟基(-OH)、卤素(-X)、胺(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)则很少或根本不会离子化。
- 对无机气体如H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, 和NO<sub>x</sub>不灵敏。

### 火焰

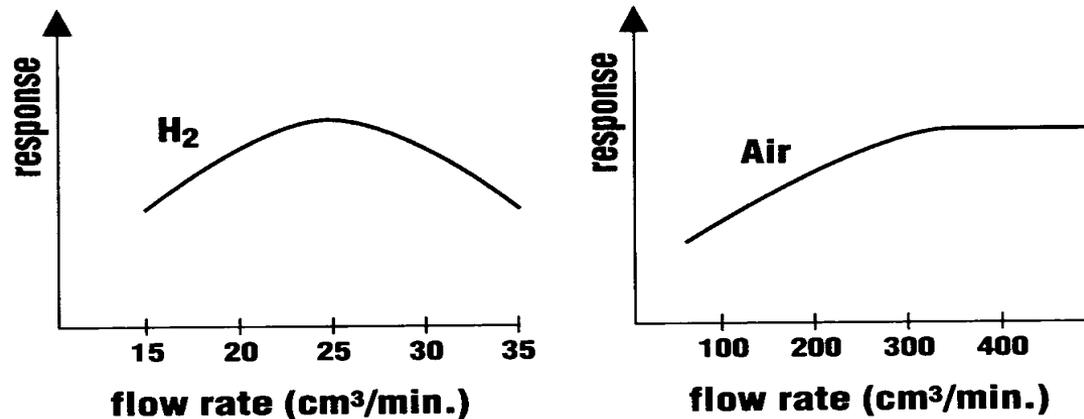
- 以氢气和空气作为燃气。
  - 在控制的流速下进行电子点火。
  - 火焰无色—除非受到污染。
-

# 一、气相色谱

## 氢火焰离子化检测器 (FID)

### 燃烧气

- H<sub>2</sub>与载气（或载气+尾吹气）的流速一般为**1:1**。
- 空气一般为氢气的**10**倍。
- 大的空气流速和热检测器可以赶走大量的水蒸气。



FID燃烧气流速对信号的影响

# 一、气相色谱

## 氢火焰离子化检测器 (FID)

### 注意事项

- ❖ 正确设置氢气、空气和尾吹气的流量
  - ❖ 检测器温度应比柱温箱设定的最高温度高30°C，且大于150°C以防止水凝结在检测器上
  - ❖ FID在电路打开后，会自动点火。在系统报告熄火以前，最多会连续点火三次
  - ❖ 如果报告了熄火，要查找熄火的原因。然后再按系统上的“Ignite”功能键，或在工作站上关闭FID的电路，再打开
  - ❖ 当色谱柱拆下或不使用检测器时，一定要关闭氢气。以防止氢气积累。
-

# 一、气相色谱

## GC消耗品更换时间表



每6-12个月或当指示型捕集阱颜色改变时  
更换时间取决于捕集阱的容量与气体纯度



每60针样品裂口, 进样口衬管内有碎屑, 保留时间偏移, 柱压降低等等



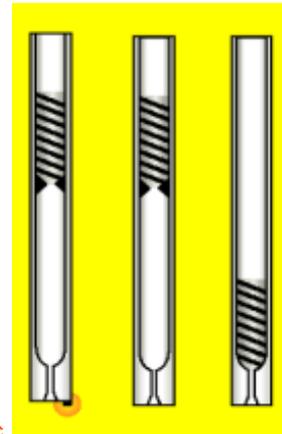
每1-2年校准一次



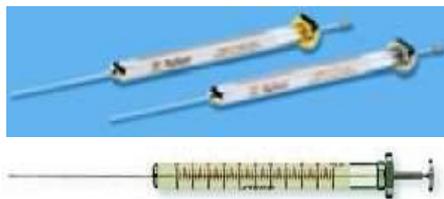
每月与衬管一起更换, 或视磨损情况更换



样品瓶及隔垫应当一次性使用  
重复使用通常导致定量误差较大, 活性待测组份易被吸附, 导致峰形拖尾或峰高变小



每周经常检查, 当衬管内有可见的污染物或色谱性能下降时更换



每3个月当发现注射器中有明显的清洗不掉的污染物, 或推杆难以抽动, 或当推杆粘连时, 或进样口隔垫穿刺出现异常, 或当针头被堵塞时



每月经常检查, 当有划痕, 腐蚀或非挥发性组分造成堵塞, 污染时更换

# 一、气相色谱

## GC消耗品—样品瓶

- ❖ 玻璃—通用型和耐酸型
- ❖ 棕色瓶- 用于光敏感样品
- ❖ 硅烷化/去活—用于会与玻璃瓶壁粘合的样品或痕量分析
- ❖ 聚丙烯—用于醇类样品或水溶性溶剂
- ❖ 微量内衬管—用于极少进样量
- ❖ 高收率—用于有限的样品量



# 一、气相色谱

## GC消耗品—样品瓶垫

瓶垫材料	溶剂兼容	溶剂不兼容	再次密封性	最高使用温度
橡胶	乙腈,丙酮,二甲基甲酰胺(DMF),醇类,二乙胺,二甲亚砷(DMSO),苯酚类	含氯溶剂,芳香烃,烷烃,二硫化碳	优	< 260°C
氟聚膜Teflon/ 橡胶			好	< 100°C
硅树脂/ 硅橡胶	醇类,丙酮,醚类,DMF, DMSO	乙腈,四氢呋喃,苯,三氯甲烷(氯仿),吡啶,甲苯,己烷,庚烷	优	< 200°C
氟聚膜Teflon/ 硅树脂 或氟聚膜Teflon/ 硅树脂 或氟聚膜Teflon			平均	< 200°C
维通橡胶	含氯溶剂,苯,甲苯,醇类,己烷,庚烷	二甲基甲酰胺,二甲亚砷,乙腈,四氢呋喃,吡啶,二氧六环,甲醇,丙酮	好	< 260°C

# 一、气相色谱

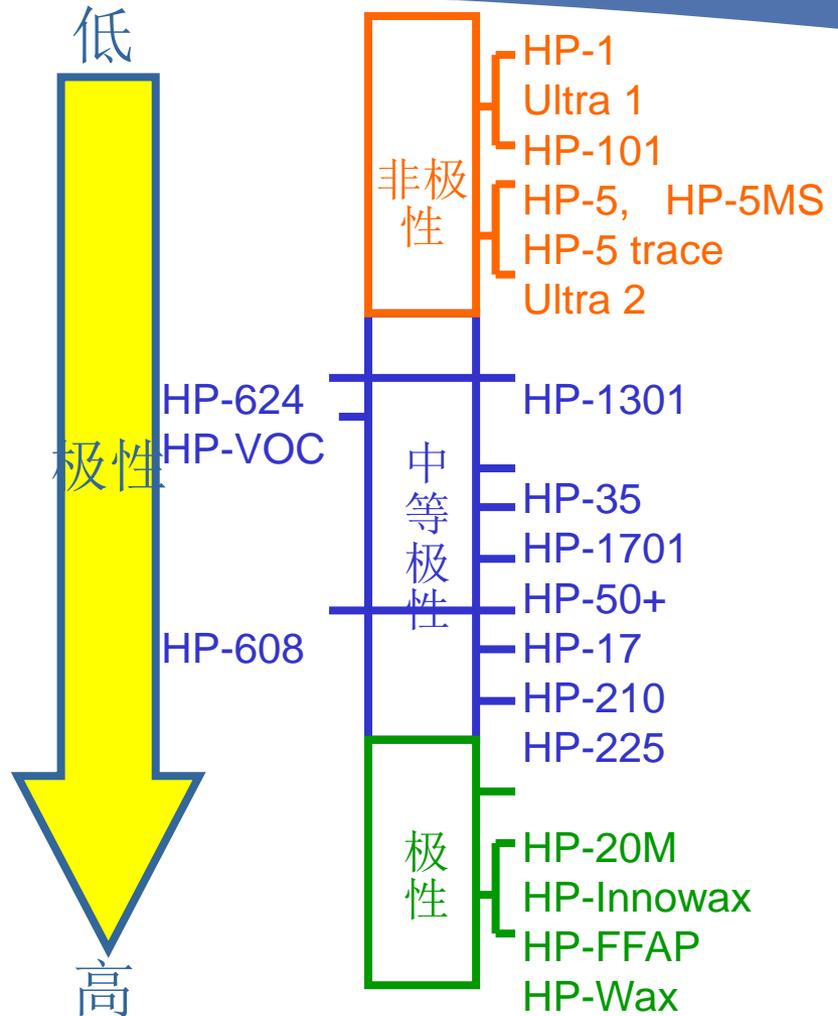
## 色谱柱的选择

色谱柱类型	固定相性质	色谱分离过程	固定相
WCOT壁涂开管柱	液体或树脂	气/液分配	聚硅氧烷 (PEG)
PLOT多孔层开管柱	固体	气/固吸附	多孔聚合物, $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 沸石

# 一、气相色谱

## 色谱柱的选择

R-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	Methylene	亚甲基
R-Ph	Phenyl	苯基
R-F,Cl,Br,I	Halide	卤代物
R-O-R	Ether	醚
R-NO <sub>2</sub>	Nitro	硝基
R-COOR	Ester	酯
R-CO-H	Aldehyde	醛
R-CO-R	Ketone	酮
R-NH <sub>2</sub>	Amino	氨基
R-OH	Hydroxyl	羟基
R-COOH	Carboxylic acid	羧基



## 样品与色谱柱极性

# 一、气相色谱

## 色谱柱的选择

填充柱柱效比毛细管柱低, 因此需要针对不同的样品的分析需要配备许多不同的填充柱。如果使用毛细管柱, 则4支毛细管柱足以覆盖所有的分离需要。

3支毛细管柱分析>90%以上的GC样品

- ❖ 1支弱极性 (例, DB-1或DB-5)
- ❖ 1支中等极性 (例, DB-17或DB-624)
- ❖ 1支强极性 (例, DB-Wax或HP-Innowax)

另加: 1支PLOT 色谱柱 (分析永久气体和轻烃)

一堆填充柱 = **3支**毛细管柱



四支色谱柱可分析  
几乎所有GC样品

# 一、气相色谱

## 色谱柱的选择

### 近100种色谱柱

固定相	极性	Agilent-DB	Agilent-HP
100%二甲基聚硅氧烷	非极性	DB-1, DB-1ms, DB-1ht	HP-1, HP-1ms, Ultra 1, HP-101
5%苯基甲基聚硅氧烷	非极性	DB-5, DB-5ms, DB-5ht, DB-5.625	HP-5, HP-5ms, Ultra 2
35%苯基甲基聚硅氧烷	中等极性	DB-35, DB-35ms	HP-35
50%苯基甲基聚硅氧烷	中等极性	DB-17, DB-17ms, DB-17ht	HP-17, HP-50+
14%氰丙基苯基二甲基聚硅氧烷	中等极性	DB-1701, DB-1701P	
35%三氟丙基甲基聚硅氧烷	中等极性	DB-200	
6%氰丙基苯基甲基聚硅氧烷	中等极性	DB-1301, DB-624	
50%三氟丙基甲基聚硅氧烷	极性	DB-210	
50%氰丙基甲基聚硅氧烷	极性	DB-23	
50%氰丙基苯基二甲基聚硅氧烷	极性	DB-225, DB-225ms	HP-225
聚乙二醇	极性	DB-Wax, DB-Waxetr	HP-Innowax, HP-20M
硝基对苯二酸 + 聚乙二醇	极性	DB-FFAP	HP-FFAP

NPD检测器应避免使用含氮固定相例氰丙基色谱柱：DB-23, DB-225, DB-1701, DB-1301

ECD检测器应避免使用含卤素固定相例三氟乙基色谱柱：DB-210, DB-200

# 一、气相色谱

## Agilent Ultra 2 毛细管气相色谱柱

- (5%-苯基)-甲基聚硅氧烷
- 非极性
- 等同于HP-5，对保留指数和容量因子有更严格的质控规范
- 键合交联
- 可用溶剂冲洗

相似的固定相： SPB-5, Rtx-5, BP-5, CB-5, 007-5, 2B-5

内径 (mm)	长度(m)	膜厚( $\mu\text{m}$ )	温度范围 ( $^{\circ}\text{C}$ )	7 英寸柱 架	5 英寸柱 架
0.20	25	0.33	-60 至 325/350	19091B- 102	19091B- 102E

# 一、气相色谱

## 色谱柱的选择

### 色谱柱尺寸？

1. “相似相溶原则” ---即待测组份与固定相**极性匹配**原则
  2. 通常用**30m**长的色谱柱,尽量用合适长度的色谱柱,色谱柱越长意味着分析时间越长和费用越高
  3. 首先考虑**0.25mm**或**0.32mm**内径的色谱柱,再根据样品情况决定选用更粗或更细内径的色谱柱
  4. 首先考虑**0.25um**膜厚,再根据样品的挥发性选择更厚或更薄的液膜
-

## 二、微生物自动鉴定

**MIDI Sherlock<sup>®</sup> —— 广泛应用于  
菌种鉴定和群落分析的  
全自动微生物鉴定系统**

## 二、微生物自动鉴定

### ➤ Sherlock® Microbial Identification System

Sherlock® 全自动微生物鉴定系统为 **唯一** 利用GC-FAME技术鉴定细菌的商业系统（技术专利）。

**独一无二**

### ➤ 获美国CDC、AOAC和FDA认可；

**权威**

受到中国合格评定国家认可委员会CNAS对MIDI的认可（中国环境科学研究院-北京）

### ➤ 35个国家的广泛市场，世界前10制药公司

有9家为MIDI Sherlock® Microbial Identification System 用户。

**客户优势**



## 二、微生物自动鉴定

### Sherlock®微生物鉴定系统 MIS —细胞脂肪酸图谱的鉴定



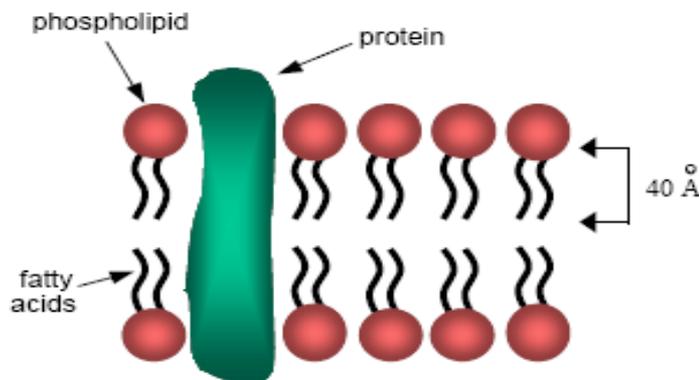
MIDI公司依据20世纪60年代以来对微生物细胞脂肪酸的研究经验，开发的一套的根据微生物中特定短链脂肪酸（C9—C20）的种类和含量（定性和定量）对微生物进行鉴定和分析的软件。

## 二、微生物自动鉴定

# Sherlock微生物鉴定原理

### 生物标记物—脂肪酸

- 共性：细菌细胞内有300多种脂肪酸成分
- 稳定性：细菌脂肪酸成分相对稳定
- 差异性：不同细菌菌株具有不同的脂肪酸图谱（指纹图谱）
- 可操作性：细菌脂肪酸易于提取、定性和定量，全自动分析减少技术上误差



生物细胞膜框架-磷脂双分子层

## 二、微生物自动鉴定

### MIS的系统优势

#### 与生化方法鉴定系统相比

- ◆ 脂肪酸成分在细菌中结构、含量十分稳定
- ◆ 实验周期短，获取结果快
- ◆ 成本低
- ◆ 库容量大
- ◆ 无需革兰氏染色或其他生化预实验

#### 与DNA测序鉴定系统相比

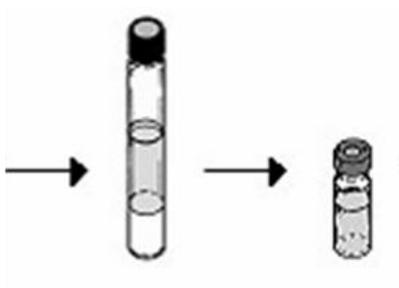
- ◆ 鉴定到株型水平
- ◆ 成本低
- ◆ 技术要求低

## 二、微生物自动鉴定

### 系统操作流程



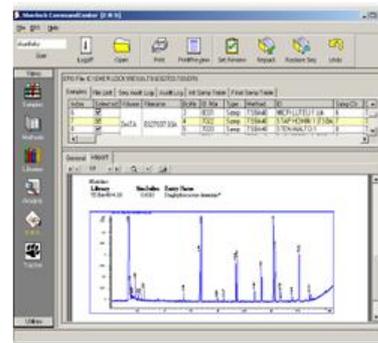
培养



皂化和甲基化 萃取



气相检测



鉴定报告

传统的脂肪酸提取过程：制备1.5 h /sample

标准GC分析过程：22 min

快速脂肪酸提取过程：制备3 min/sample

快速GC分析过程：9 min

## 二、微生物自动鉴定

### Sherlock 全自动微生物系统的构成

系统由硬件GC和软件MIDI构成：

- ◆ **Agilent Technologies**  
gas chromatographs(GC)
- ◆ **MIDI (细菌脂肪酸数据库)**  
microbial databases

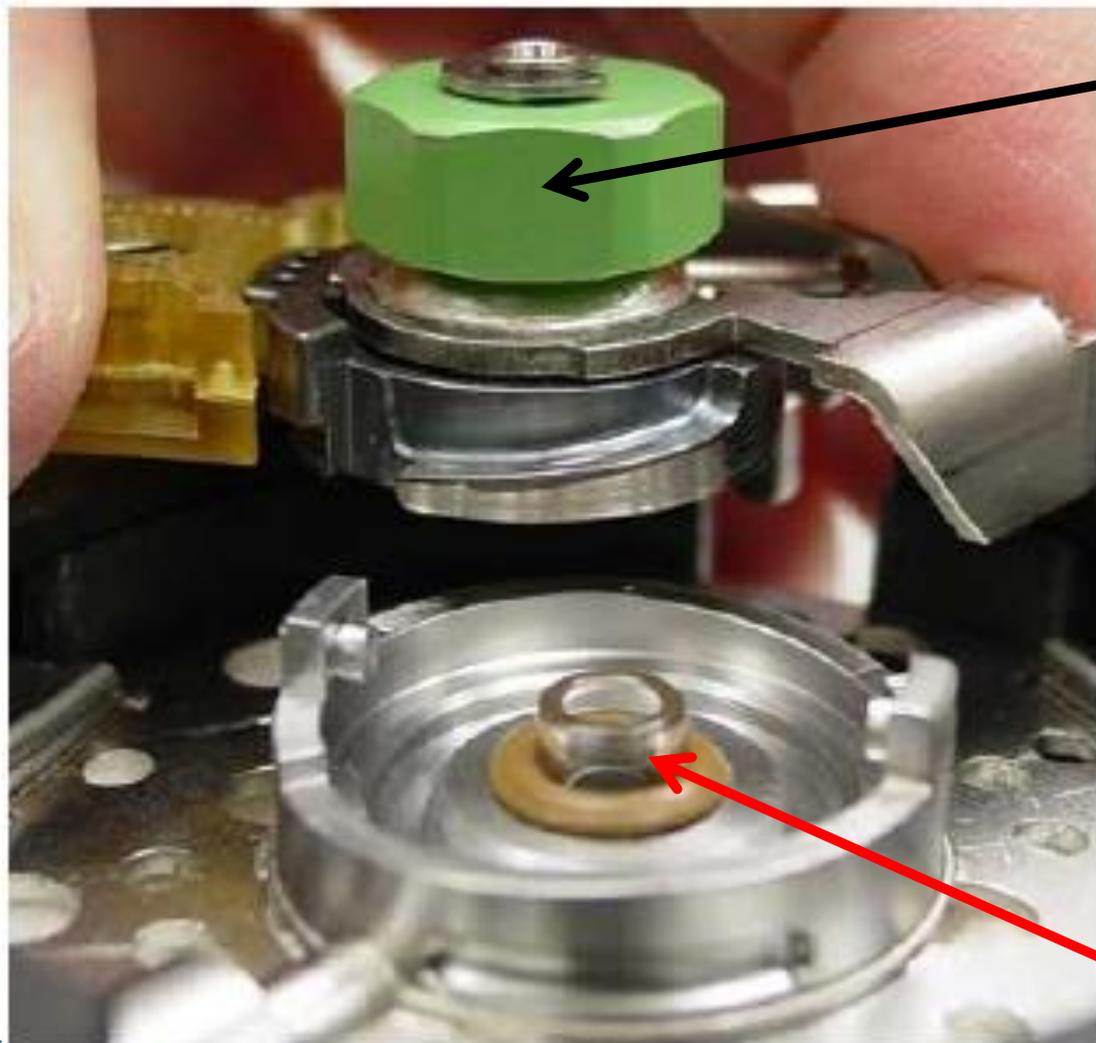


## 二、微生物自动鉴定

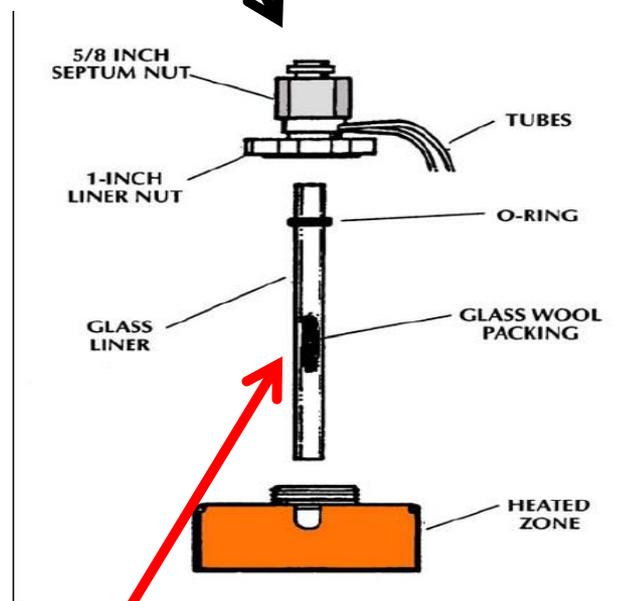


## 二、微生物自动鉴定

### 气相进样口



隔垫Septum



玻璃衬管liner

## 二、微生物自动鉴定

### MIDI系统对GC配置的要求

1. 自动进样器，通常使用前进样口
2. 火焰离子化FID检测器
3. 氢气 $H_2$ 作为载气，氮气 $N_2$ 作为尾吹气
4. 专用色谱柱及气化管



安捷伦货号：19091B-102E 6850GC  
19091B-102 6890GC

MIDI货号：Column G

## 二、微生物自动鉴定

# MIDI菌库介绍及软件配置

### 1. 菌种鉴定系统主机软件

包含：Sherlock 6.2 Software菌种鉴定系统软件（包含分析软件及数据输出软件），  
**Standard/ Rapid Aerobe Library 6.2**噬氧菌库/快速噬氧菌库。

### 2. 厌氧菌库（Anaerobe Library）

### 3. 酵母库（Yeast Library）

### 4. 磷脂脂肪酸群落分析方法PLFA

### 5. 文库生成软件（Library Generation Software）

LGS是一个终端开放的研究软件包，完全由用户自定义创建。用户可以为自己的特殊菌株或物种创建新的数据库，如通过脂肪酸分析鉴定的鱼库，通过碳水化合物分析鉴定的昆虫库。

### 6. 追踪/集落分析(Tracker/Cluster)

利用Dendrogram, Neighbor-joining trees和2-D Plot分析菌种之间的亲源性关系。

### 7.微生物基因型分析软件及16S/28S序列信息库

## 二、微生物自动鉴定

### MIDI系统的菌库

菌库分类	菌种数量
嗜氧菌库	大于1500种，其中593种来自于临床
厌氧菌库	约800种菌种
酵母菌库包含酵母菌、放线菌、真菌	约300种
<i>PLFA</i> 群落分析	可准确鉴定的 <i>PLFA</i> 有165种

- 菌株水平：超过10万株型
- 菌种水平：迄今为止自动微生物鉴定系统中最大的细菌库
- 群落水平：第一套商业化的*PLFA*群落分析产品,涵盖绝对多数微生物群落分析的分子标记物

## 二、微生物自动鉴定

### Sherlock的菌库和方法

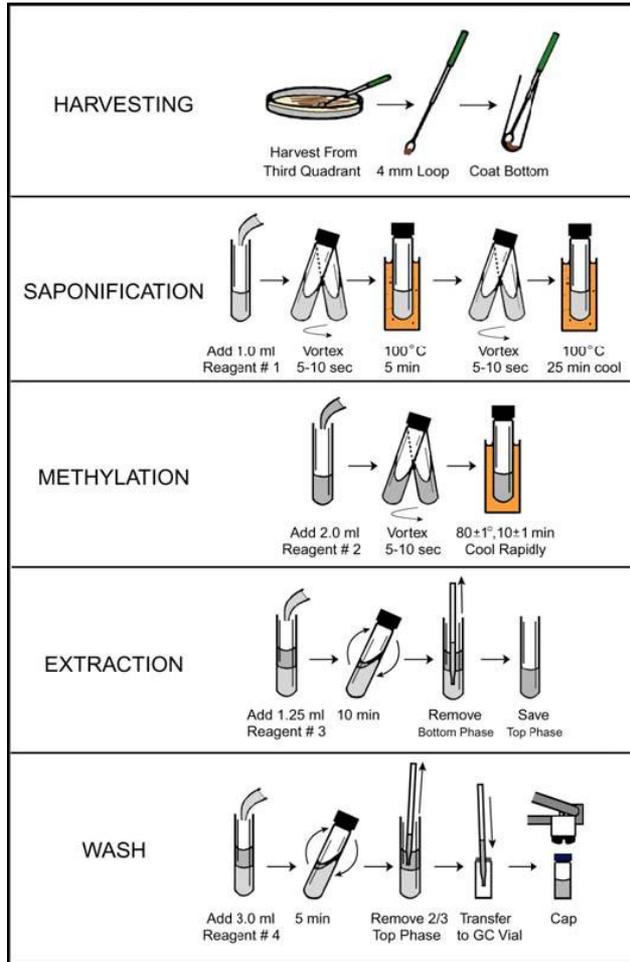
分类	菌种库名称	注解
Aerobe(嗜氧) >1,500种	TSBA6	嗜氧菌, 28°C, 24hr: Trypticase Soy Broth Agar
	CLIN6	临床嗜氧菌, 35°C, 24hr: Blood Agar, Chocolate..
	M17H10	分枝杆菌, 35 °C, 5-10% CO2: Middlebrook7H10 with OADC enrichment
Anaerobe(厌氧) ~800种	BHIBLA	厌氧菌, 35 °C, 48 hr: BHIBLA plates in Gas System
	MOORE6	VPI Broth-grown Anaerobe Library, 35°C in PYG Broth
Yeast (酵母菌) ~300种	YST28	酵母菌, 28 °C, 24hr, SAB Dextrose Agar
	YSTCLN	酵母菌, 28 °C, 24hr, SAB Dextrose Agar
	FUNGI	真菌, 28°C, 2-5天, in SAB Dextrose Broth, 150 rpm shake culture
	ACTIN1	放线菌, 28 °C, 3-10天, in 150 rpm shake culture
PLFA群落分析	PLFAD1	准确鉴定165种PLFA用于群落分析

## 二、微生物自动鉴定

### **MIDI可以满足两个层面的分析需求**

- ❖ 微生物整体上的群落分析，找出优势的菌群及起关键作用的群落（宏观）
  - ❖ 菌种及菌株水平：进一步研究了解那种细菌在主要菌群中发挥主要作用（微观），微生物鉴定和新种发现
-

## 二、微生物自动鉴定



### Sherlock的操作流程

- 1. 获菌** 通常取培养至对数生长后期的菌体，脂肪酸种类及含量最稳定
- 2. 皂化** 破裂细菌，释放脂肪酸并形成钠盐
- 3. 甲基化** 甲基化脂肪酸形成脂肪酸甲酯 (fatty acid methyl esters), 以增加脂肪酸的挥发性以利于GC分析
- 4. 萃取** 将脂肪酸甲酯从酸性亲水相转移到有机相
- 5. 碱洗涤** 除去有机萃取相中的游离的脂肪酸和残余的试剂

## 二、微生物自动鉴定

# MIDI软件操作



Sample  
Processor

Sample Processor (ST) S/M: 160584 - [Sample Table]

File Table Batch View Help

Print Table Add Samples LockTable Start Batch

RUN STATUS  DATA VOL DATA:   Shutdown instrument at end of batch

	Status	Bottle	ID Number	Data File
COL A	AVAILABLE			

Btl	Type	Method	Seq#	ID Num	Name	Status
1	Calib	RTSBA6	1	1		Queued
2	Samp	RTSBA6	1001	1001	A	Queued
3	Samp	RTSBA6	1002	1002	B	Queued
4	Blank	RTSBA6	1003	1003	C	Queued
5	Empty					Done
6	Empty					Done
7	Empty					Done
8	Empty					Done
9	Empty					Done
10	Empty					Done
11	Empty					Done
12	Empty					Done

**排样、编号：** 第1个一定为标准品，然后是对照，样品

## 二、微生物自动鉴定

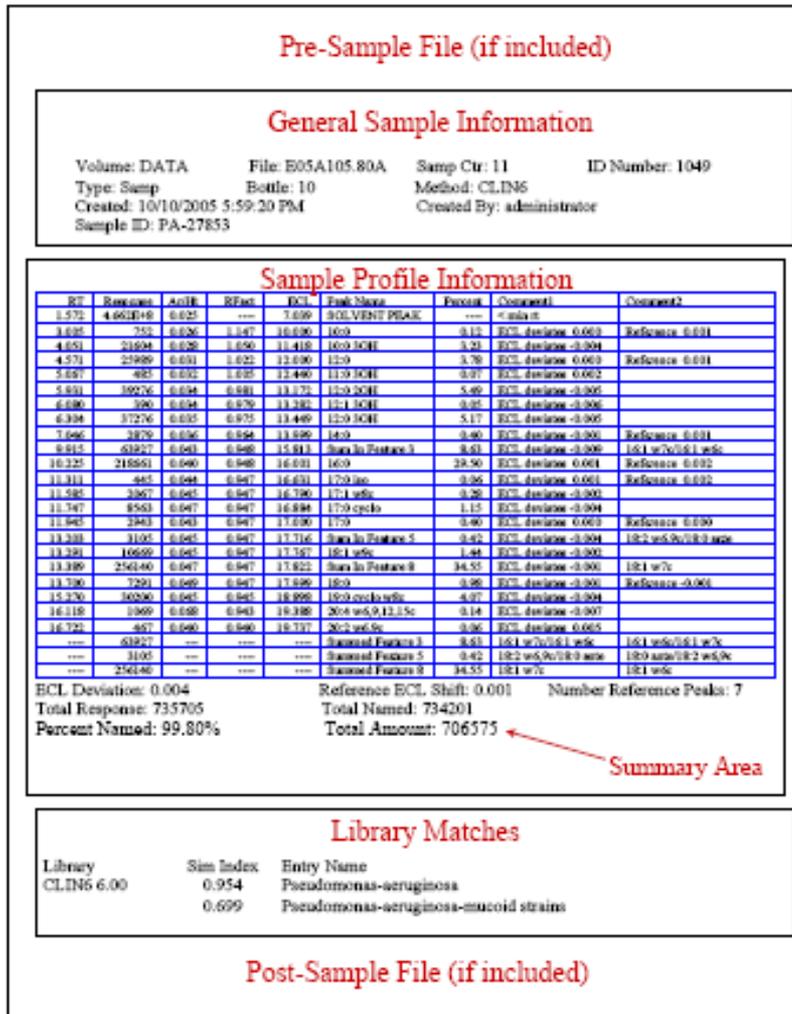
### MIDI软件操作

- ◆ Sample Processor编辑完毕后，点击start batch。软件将自动调用安捷伦ChemStation进行检测，整个过程全部自动完成。可过夜连续检测。
  - ◆ Batch开始后，先测两针标准品，通过后才开始检测样品，每测11个样品后自动检测一针标准品。有效的保证检测质量。
  - ◆ 检测完成后，生成report文件（word格式），可以选择每个样品检测完生成或者是整个batch检测完毕后批量生成。
-

## 二、微生物自动鉴定

### 检测报告1

Figure 4-1  
Sherlock Composition Report- First Half (red text shows sections)



➤ Pre-Samples File 用户自主添加备注，描述。

➤ General Sample Information 样品ID 检测时间等基本信息等。

➤ Sample Profile Information 最重要，是鉴定的依据。

➤ Library Matches 鉴定结果，SI值。

## 二、微生物自动鉴定

### 样品的脂肪酸信息

#### Sample Profile Information

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.572	4.662E+8	0.025	----	7.039	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
3.005	752	0.026	1.147	10.000	10:0	0.12	ECL deviates 0.000	Reference 0.001
4.051	21604	0.028	1.050	11.418	10:0 3OH	3.23	ECL deviates -0.004	
4.571	25989	0.031	1.022	12.000	12:0	3.78	ECL deviates 0.000	Reference 0.001
5.067	485	0.032	1.005	12.440	11:0 3OH	0.07	ECL deviates 0.002	
5.931	39276	0.034	0.981	13.172	12:0 2OH	5.49	ECL deviates -0.005	
6.080	390	0.034	0.979	13.282	12:1 3OH	0.05	ECL deviates -0.006	
6.304	37276	0.035	0.975	13.449	12:0 3OH	5.17	ECL deviates -0.005	
7.046	2879	0.036	0.964	13.999	14:0	0.40	ECL deviates -0.001	Reference 0.001
9.915	63927	0.043	0.948	15.813	Sum In Feature 3	8.63	ECL deviates -0.009	16:1 w7c/16:1 w6c
10.225	218661	0.040	0.948	16.001	16:0	29.50	ECL deviates 0.001	Reference 0.002
11.311	445	0.044	0.947	16.631	17:0 iso	0.06	ECL deviates 0.001	Reference 0.002
11.585	2067	0.045	0.947	16.790	17:1 w8c	0.28	ECL deviates -0.002	
11.747	8563	0.047	0.947	16.884	17:0 cyclo	1.15	ECL deviates -0.004	
11.945	2943	0.043	0.947	17.000	17:0	0.40	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
13.203	3105	0.045	0.947	17.716	Sum In Feature 5	0.42	ECL deviates -0.004	18:2 w6,9c/18:0 ante
13.291	10669	0.045	0.947	17.767	18:1 w9c	1.44	ECL deviates -0.002	
13.389	256140	0.047	0.947	17.822	Sum In Feature 8	34.55	ECL deviates -0.001	18:1 w7c
13.700	7291	0.049	0.947	17.999	18:0	0.98	ECL deviates -0.001	Reference -0.001
15.270	30200	0.045	0.945	18.898	19:0 cyclo w8c	4.07	ECL deviates -0.004	
16.118	1069	0.068	0.943	19.388	20:4 w6,9,12,15c	0.14	ECL deviates -0.007	
16.722	467	0.040	0.940	19.737	20:2 w6,9c	0.06	ECL deviates 0.005	
----	63927	---	----	----	Summed Feature 3	8.63	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	3105	---	----	----	Summed Feature 5	0.42	18:2 w6,9c/18:0 ante	18:0 ante/18:2 w6,9c
----	256140	---	----	----	Summed Feature 8	34.55	18:1 w7c	18:1 w6c

ECL Deviation: 0.004  
 Total Response: 735705  
 Percent Named: 99.80%

Reference ECL Shift: 0.001  
 Total Named: 734201  
 Total Amount: 706575

Number Reference Peaks: 7

Summary Area

主要由RT（保留时间）和Response（峰值）两个参数进行数据库内搜索匹配。

## 二、微生物自动鉴定

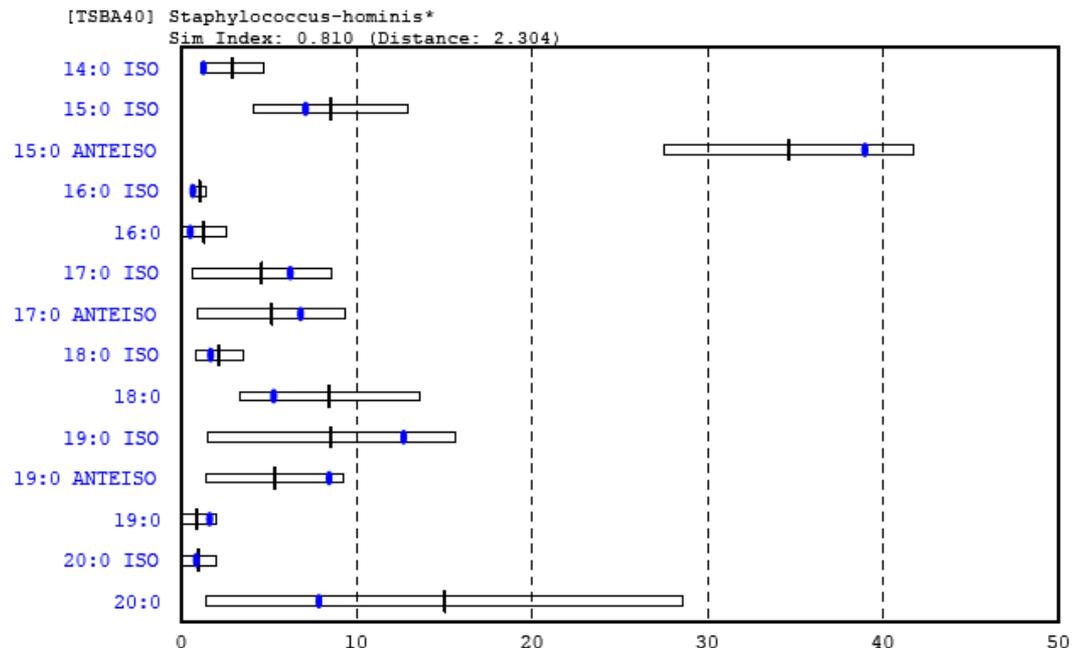
# 相似指数 (similarity index) 的判读

### Library Matches

Library	Sim Index	Entry Name
CLIN6 6.00	0.954	Pseudomonas-aeruginosa
	0.699	Pseudomonas-aeruginosa-mucoid strains

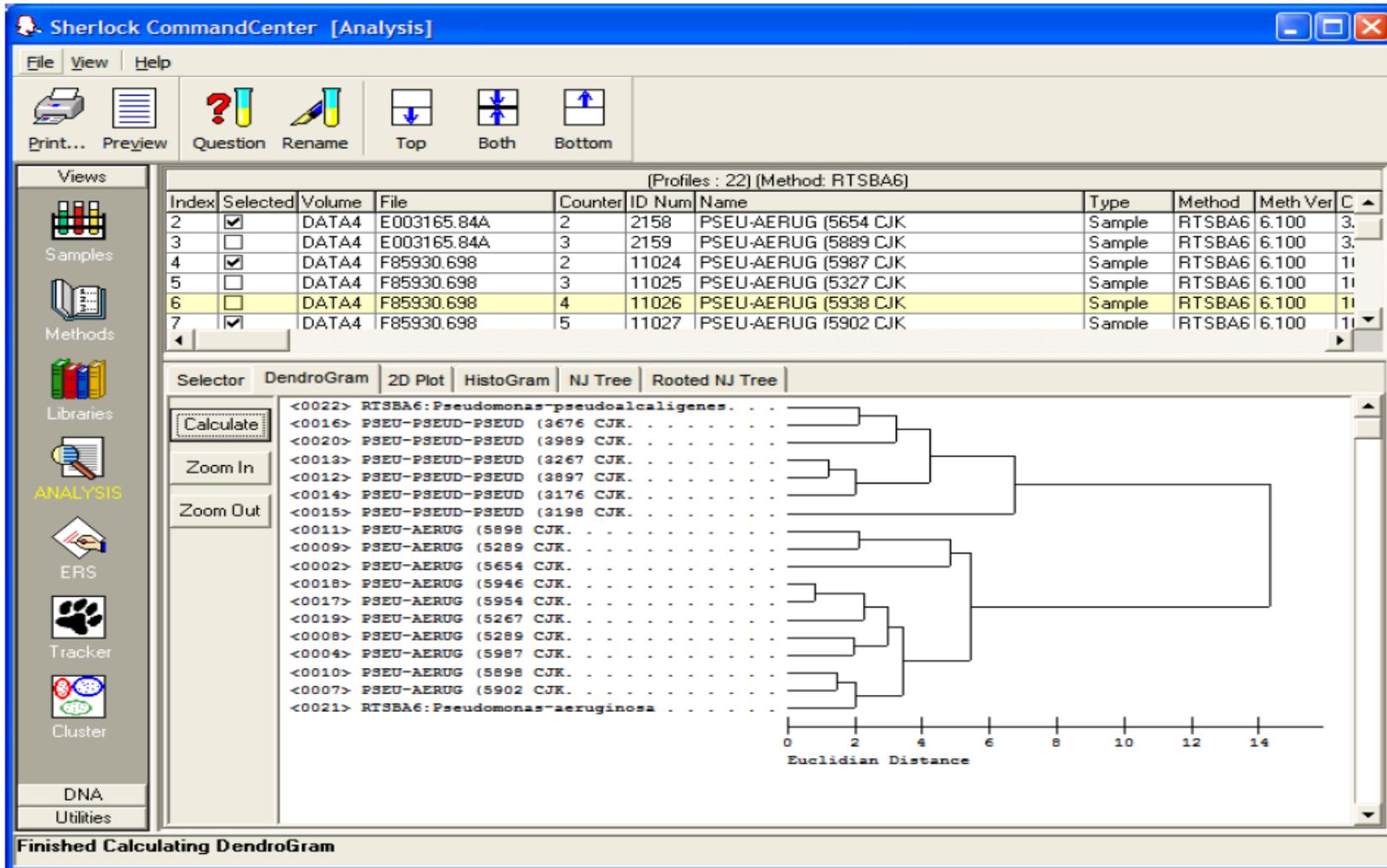
### Comparison Charts

- ❖ “相似指数”不同于“可能性”，更科学，更严谨。
- ❖ 第一个SI>0.5并且与比第二个SI大0.1，为 **Good Match**
- ❖ 第一个SI<0.3,即可认为本数据库中没有这种菌



## 二、微生物自动鉴定

# 计算系统发育树 *Dendrogram*



## 二、微生物自动鉴定

# PLFA微生物群落分析

### 1. 传统的培养技术

- 检测原理：检测微生物群落的碳源的利用特性，吡啶橙直接染色法菌数，细菌酶活性ATP 法等。
- 局限性：培养基选择性，培养过程是再选择过程，不能反映原始群落结构

### 2. 核酸鉴定技术：目前世界主流技术之一

- ❖ 提取过程：环境样品中直接提取总群落DNA/RNA，可PCR扩增
  - ❖ Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)
  - ❖ Temperature gradient gel electrophoresis(TGGE)
  - ❖ Terminal-restriction fragment length polymorphism analysis (T-RFLP)
-

## 二、微生物自动鉴定

# PLFA微生物群落分析

### ❖ PLFA含义

PLFA是磷脂脂肪酸 (Phospholipid fatty acid) 的英文缩写, PLFA是构成活体细胞膜的重要组分。

### ❖ 群落分析基本原理

部分PLFA 总是出现在同一类群的微生物中,而在其它类群的微生物中很少出现。

### ❖ PLFA混合样本分析

根据不同类群微生物的指示性PLFA不同,定性反映微生物类群;通过提取和分析指示性PLFA,测定其含量,可定量反映活体微生物中不同类群的生物量及总生物量。

## 二、微生物自动鉴定

微生物的PLFA表征分布

微生物分类	特征性脂肪酸类别
细菌Bacteria in general	含有以酯链与甘油相连的饱和或单不饱和脂肪酸(如15:0、i15:0、a15:0、16:0、i16:0、16:1 $\omega$ 5、16:1 $\omega$ 9、16:1 $\omega$ 7t、17:0、i17:0、a17:0、cy17:0、18:1 $\omega$ 5、18:1 $\omega$ 7、18:1 $\omega$ 7t、i19:0、a19:0和cy19:0等)
革兰氏阳性细菌Gram-positive bacteria	含有多分枝脂肪酸
革兰氏阴性细菌Gram-negative bacteria	含有多羟基脂肪酸
厌氧细菌Anaerobes	cy17:0、cy19:0
好氧细菌Aerobes	16:1 $\omega$ 7、16:1 $\omega$ 7t、18:1 $\omega$ 7t
硫酸盐还原细菌Sulfate-reducing bacteria	10Me16:0、i17:1 $\omega$ 7、17:1 $\omega$ 6
甲烷氧化菌Methaneoxidizing bacteria	16:1 $\omega$ 8c、16:1 $\omega$ 8t、16:1 $\omega$ 5c、18:1 $\omega$ 8c、18:18t、18:1 $\omega$ 6c
嗜压/嗜冷细菌Barophilic/psychrophilic bacteria	20:5、22:6
黄杆菌Flavobacterium balustinum	i17:1 $\omega$ 7
芽孢杆菌Bacillus spp.	各种支链脂肪酸
放线菌Actinomycetes	10Me16:0、10Me17:0、10Me18:0等
真菌Fungi	含有特有的磷脂脂肪酸(如18:1 $\omega$ 9、18:2 $\omega$ 6、18:3 $\omega$ 6、18:3 $\omega$ 3)
蓝细菌Cyanobacteria	含有多不饱和脂肪酸(如18:2 $\omega$ 6)
微藻类Microalgae	16:3 $\omega$ 3
原生动物Protozoa	20:3 $\omega$ 6、20:4 $\omega$ 6
脱硫细菌Desulfobacteria	cy18:0 ( $\omega$ 7,8)
硫细菌Sulfobacteria	i17:1 $\omega$ 5、10Me18:1 $\omega$ 6、11Me18:1 $\omega$ 6
脱硫弧菌Desulfovibrio	i17:1 $\omega$ 7c、i15:1 $\omega$ 7c、i19:1 $\omega$ 7c
脱硫叶菌Desulfobulbus	17:1 $\omega$ 6、15:1

## 二、微生物自动鉴定

### PLFA群落分析与MIDI纯菌落鉴定差异

- ❖ **PLFA特征性脂肪酸文库(C9-C24)**
  - ❖ **GC分析时间: 15min**
  - ❖ **PLFA专用标准品: 1208Vs.1300**
-

## 二、微生物自动鉴定

### PLFA数据定量

1.相对定量（报告直接给出结果）

2.绝对定量（C19内标法）

目标 PLFA 浓度 ( $\text{ng g}^{-1}$ ) =

$$\frac{\text{PLFA 峰面积}}{\text{内标峰面积}} \times \text{内标浓度} (\text{ng } \mu\text{l}^{-1}) \times \frac{\text{溶样体积} (\mu\text{l})}{\text{样品质量} (\text{g})}$$

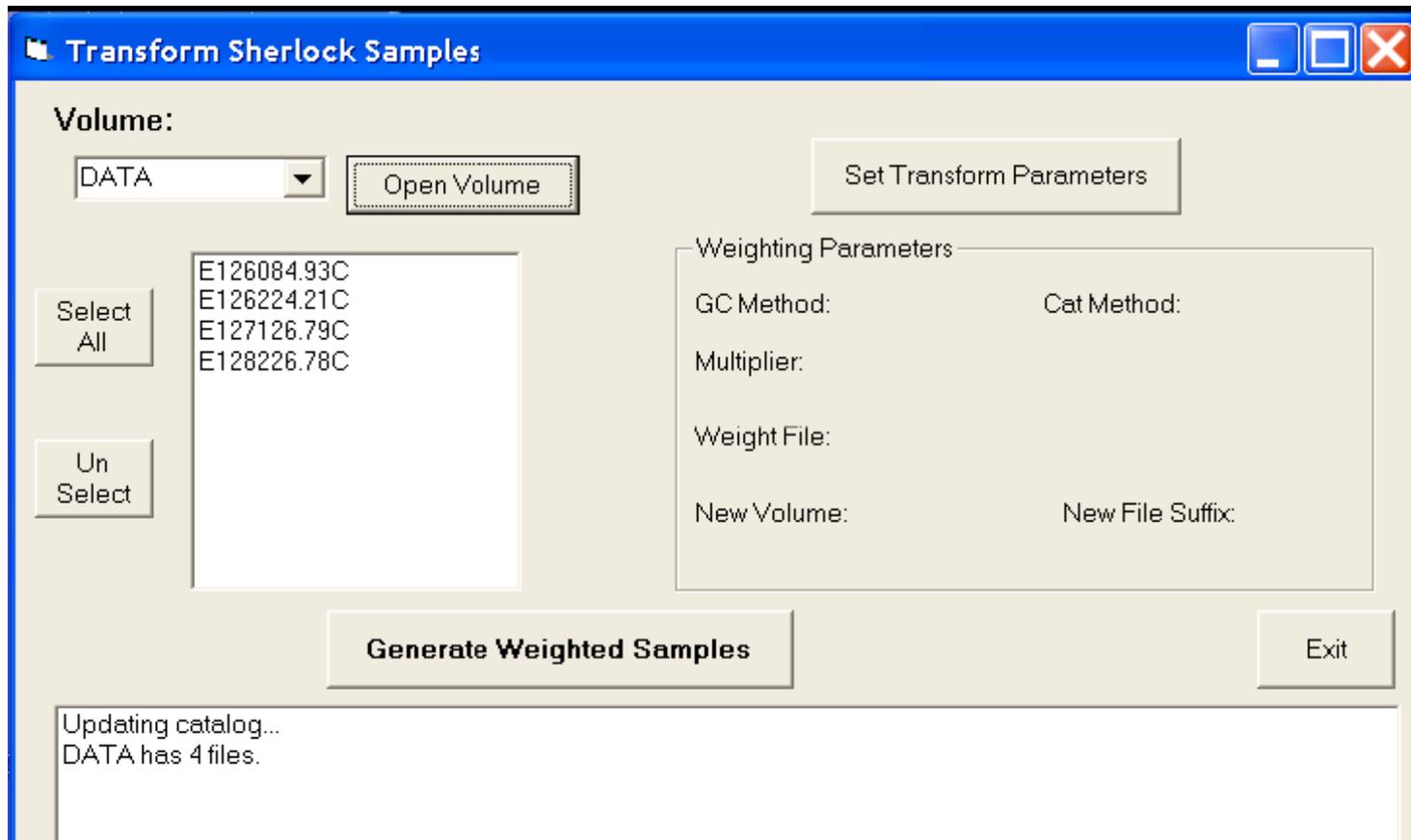
目标 PLFA 浓度 ( $\text{nmol g}^{-1}$ ) =

$$\frac{\text{PLFA 峰面积}}{\text{内标峰面积}} \times \frac{\text{内标浓度} (\text{ng } \mu\text{l}^{-1})}{\text{PLFA 摩尔质量}} \times \frac{\text{溶样体积} (\mu\text{l})}{\text{样品质量} (\text{g})}$$

## 二、微生物自动鉴定

# MIDI PLFA定量

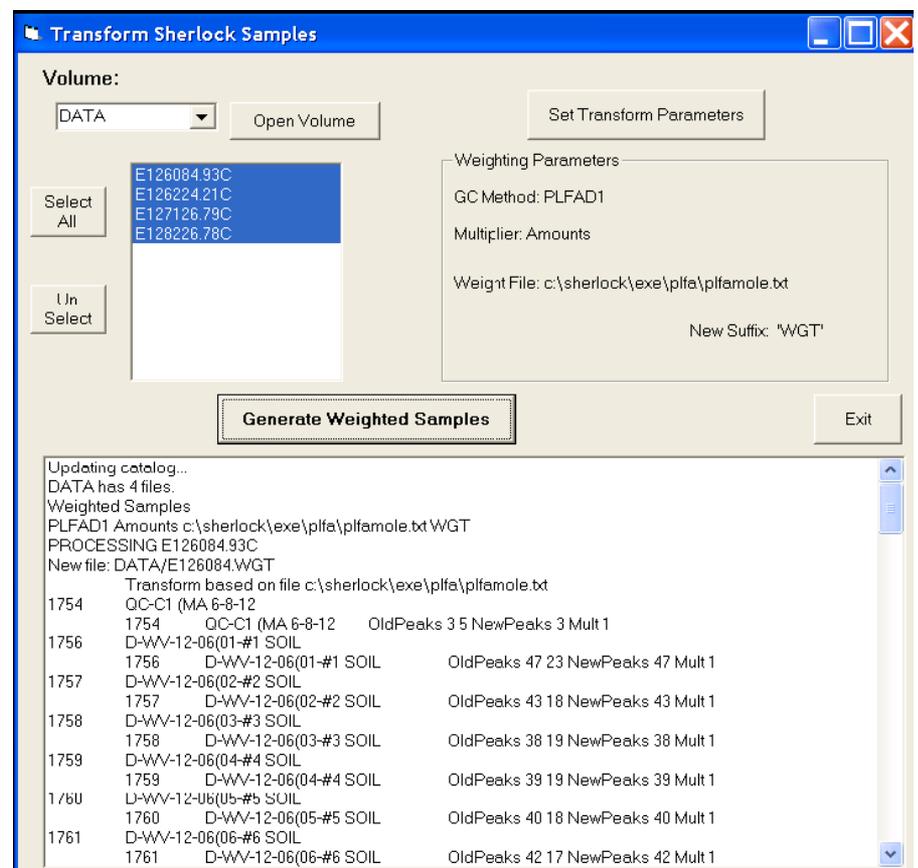
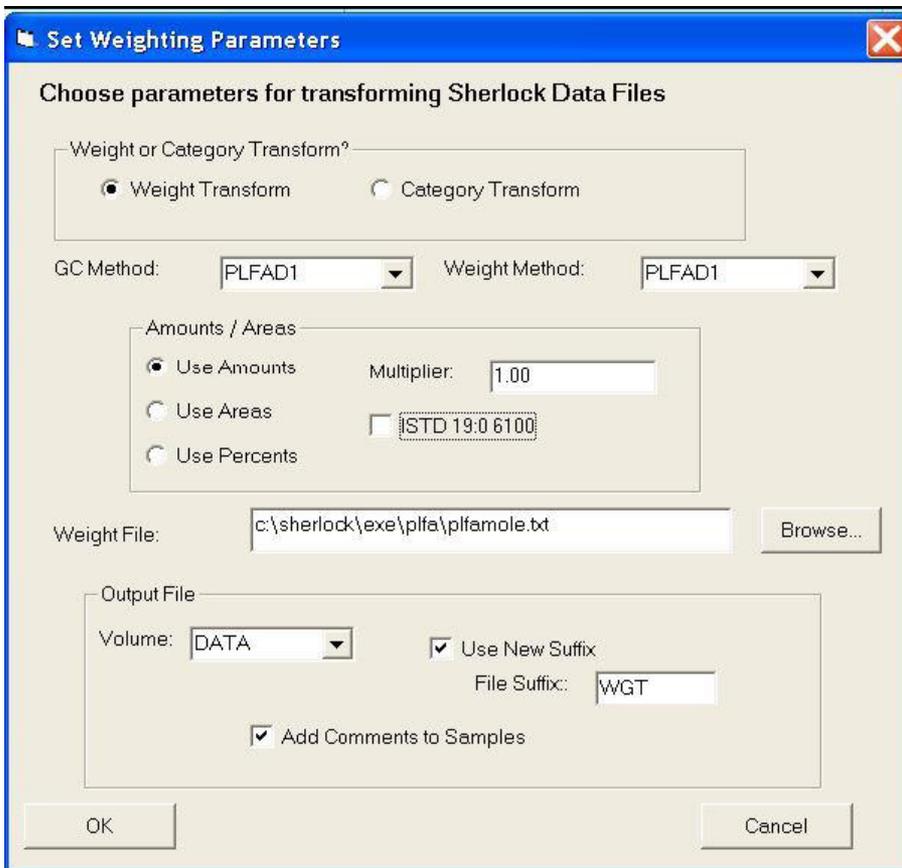
c:\Sherlock\Exe\PLFA



## 二、微生物自动鉴定

# MIDI PLFA定量

## c:\Sherlock\Exe\PLFA



## 二、微生物自动鉴定

# MIDI PLFA定量

Sherlock CommandCenter [Samples]

File Sample View Help

Print Print Preview SelectStyle Calc Method Sort Save

Views

SAMPLES

Methods

Libraries

Analysis

Tracker

Cluster

DNA Utilities

Sample

<SampMethod>

Index Volume Filename Bottle ID Nbr Type Method ID Samp Ctr Created Modified Creator Reviewer Rev

Index	Volume	Filename	Bottle	ID Nbr	Type	Method	ID	Samp Ctr	Created	Modified	Creator	Reviewer	Rev
18		E145086.69A	1	1	Calib	PLFAD1		2	2014/5/8 16:16:08				
19			2	1001	Samp	PLFAD1	3	3	2014/5/8 16:29:19				
20		E145086.MIC	1	1	Calib	MICYPE	CAL-MIX-MICYPE	1	2014/10/29 20:47:16	2014/10/29 20:47:16			
21			0	1001	Samp	MICYPE	3	2	2014/10/29 20:47:16				
22	DATA1	E145086.WGT	1	1	Calib	PLFAD1	CAL-MIX-PLFAD1	1	2014/10/29 20:42:06	2014/10/29 20:42:06			
23			0	1001	Samp	PLFAD1	3	2	2014/10/29 20:42:06				
24			1	1	Calib	PLFAD1	mix calibration	1	2014/10/27 16:17:30				
25		E14A276.78A	1	1	Calib	PLFAD1	mix calibration	2	2014/10/27 16:31:27				
26			2	1000	Calib	PLFAD1	mix calibration	2	2014/10/27 16:44:16				

Sample: E145086.WGT #2: 1001 3

General Raw Data Profile Matches Chromatogram DNA Comments Mgr Comments

Profile: Column Overload: A peak's response is greater than 400000.0. Dilute and re-run

Ret. Time	Response	Ar/Ht	RespFact	ECL Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6184	3.0E+07	0.040	0.0000	6.8278 SOLVENT PEAK	0.00%	< min rt	
1.6500	14884	0.020	1.0000	11.8290 12:1 w8c	0.57%	ECL deviates 0.000	
1.6951	110196	0.020	1.0000	12.0000 12:0	4.23%	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
1.9052	23312	0.020	1.0000	12.6124 13:0 iso	0.90%	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
1.9385	23399	0.020	1.0000	12.7094 13:0 anteiso	0.90%	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
2.0382	6514	0.020	1.0000	13.0000 13:0	0.25%	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
2.2370	14948	0.020	1.0000	13.4602 13:0 DMA	0.57%	ECL deviates 0.000	
2.3035	125223	0.020	1.0000	13.6141 14:0 iso	4.81%	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
2.3475	57421	0.020	1.0000	13.7160 14:0 anteiso	2.20%	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
2.3845	54239	0.020	1.0000	13.8017 14:1 w8c	2.08%	ECL deviates 0.000	
2.4702	143211	0.020	1.0000	14.0000 14:0	5.50%	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
2.6864	35894	0.020	1.0000	14.4170 15:1 iso w9c	1.38%	ECL deviates 0.000	
2.7099	35907	0.020	1.0000	14.4622 14:0 DMA	1.38%	ECL deviates 0.000	
2.7901	211369	0.020	1.0000	14.6170 15:0 iso	8.12%	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
2.8389	571603	0.020	1.0000	14.7110 15:0 anteiso	21.95%	Column Overload	
2.8700	7902	0.020	1.0000	14.7710 15:1 w9c	0.30%	ECL deviates 0.000	
2.9042	59450	0.020	1.0000	14.8370 15:1 w7c	2.28%	ECL deviates 0.000	
2.9566	18143	0.020	1.0000	14.9380 16:1 w9c aldehyde	0.70%	ECL deviates 0.000	
2.9887	33188	0.020	1.0000	15.0000 15:0	1.27%	ECL deviates 0.000	Reference 0.000

Total Response: 2604491 Percent Named: 100.00

Clear Selections

.WGT——.MIC综合考虑FID检测器的校正因子以及脂肪酸的摩尔质量

## 二、微生物自动鉴定

# PLFA分析报告

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.000	24322	0.100	1.000	1.000	Gram Positive	30.49	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
3.000	28708	0.100	1.000	2.000	Gram Negative	35.99	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
5.667	12678	0.100	1.000	3.000	Diatoms	15.89	ECL deviates 0.000	
11.000	1581	0.100	1.000	5.000	Eukaryote	1.98	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
13.667	3258	0.100	1.000	6.000	Fungi	4.08	ECL deviates 0.000	
16.333	726	0.100	1.000	7.000	Methanobacter	0.91	ECL deviates 0.000	
19.000	8504	0.100	1.000	8.000	Actinomycetes	10.66	ECL deviates 0.000	

数据也可以Excel表格输出，可导入SPSS，Origin等生物学统计软件中分析

## 二、微生物自动鉴定

### PLFA群落分析优势与局限

#### 优势

- ◆ 保真性，无需培养，直接提取，适合跟踪微生物群落的动态变化
- ◆ 对细胞生理活性无要求，样品可长时间保存
- ◆ 实验条件要求低，操作难度小，成本低
- ◆ 分析仪器检测，高灵敏度，高通量，结果客观准确

#### 局限性

- 不能检测古生菌
-

## 二、微生物自动鉴定

### 注意事项

1. MIDI专用汽化管和色谱柱。进样体积与分流比固定。
  2. 待测菌数量要足够实验所需（标准方法40 mg左右）
  3. 提取样品时严格按照SOP，全程不可使用塑料器皿及工具。
  4. 所用试剂必须达到标准。
  5. 气体质量必须合格。
  6. 标准品用之前保证密封及洁净。
  7. 气相色谱仪放置环境需较洁净（避免太靠近窗口等灰尘多的地方）。
-

## 二、微生物自动鉴定

付晓斌

电话： 18510970757

Email: [fuxiaobin@cs-biotech.com](mailto:fuxiaobin@cs-biotech.com)

---

A photograph showing a woman in profile, looking at a computer monitor. She is wearing a dark blazer over a light-colored top. The background is blurred, showing other people in a professional environment. The image is framed by a blue banner at the top and an orange banner at the bottom.

**Thank You !**



## MIDI微生物鉴定系统操作流程

- 打开H<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>、空气钢瓶的气阀，并调节分压阀，使H<sub>2</sub>和N<sub>2</sub>的示数为0.35左右，空气的示数为0.42左右。
  - 开启仪器电源，先设定进样口250℃，柱温箱35℃，检测器300℃，（待进样口温度升高至250℃后，再将柱温设置为170℃）开启电脑。
  - 标准品和脂肪酸样品放置到仪器样品盘中。
  - 打开sherlock sample processor，编辑样品信息，选择方法，status项选择为Queued等，待编辑结束后锁上编辑的表格(Lock Table)，避免误操作。
  - 确保标准品放在样品盘的第一个位置，样品的顺序跟表格一致，洗液（solvent 3或正己烷）已放好（在A位），液面在2/3以上，废液瓶为空（在WA位）。
  - start batch，软件自动调用GC软件，开始进样（建议先跑两针正己烷，保留时间和基线没有问题再跑标样）。
  - 最小化白色的记录窗口，电脑下方显示instrument online1的窗口，右键最大化后观看仪器参数（View---online signals---signal window1）。
  - 全部样品结束后，关闭sherlock sample processor程序，打开Instrument1 online程序，设置如下关机参数：
    - 1.进样口（Inlet）：关掉加热（Heater），点击apply；此处切记不可关闭气流参数（**Pressure**和**Total Flow**）；
    - 2.炉温（Oven）：设置至40C，点击apply；
    - 3.检测器（Detector）：关掉加热（Heater）和火焰（Flame），点击apply；
  - 待进样口（Inlet）温度降至100C以下，炉温（Oven）降至40C，检测器（Detector）温度降至100C以下，关闭程序Instrument1 online，关闭仪器（GC）。
  - 关闭电脑。
- 
- 关闭气体（H<sub>2</sub>最后关），关闭总阀。