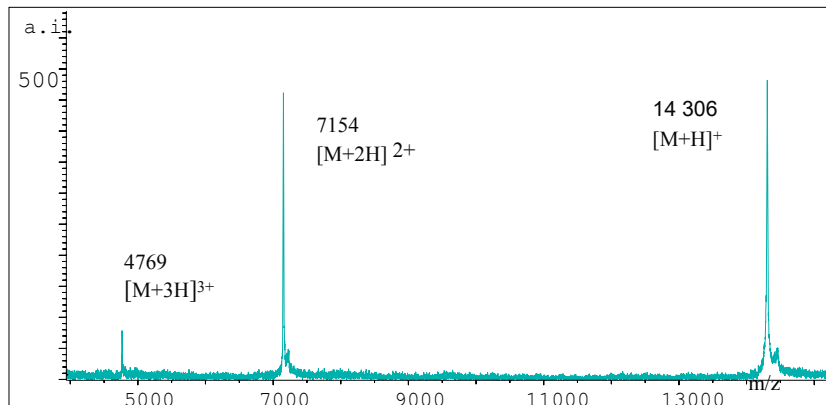


MALDI - TOF MS

Hmotnostní spektrometrie se již několik desítek let užívá pro identifikaci látek. Dříve sloužila pouze pro studium nízkomolekulárních látek měřením jejich hmotností či hmotností jejich fragmentů. V polovině 80. let se podařilo nalézt techniky převádějící velké molekuly do plynné fáze bez fragmentace (karas a kol. 1987). Zájem o tuto metodu začal narůstat; kromě metod molekulární biologie se tak hmotnostní spektrometrie stala nejdynamičtěji se rozvíjející metodikou současné biochemie. MALDI – TOF MS (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) je nepostradatelným nástrojem analýzy biologických a syntetických polymerů, nejvíce se však uplatňuje v proteomice při analýzách peptidů a proteinů. Pro analýzu složitějších směsí přispívá off-line spojení se separačními metodami, například s 2D gelovou elektroforézou či kapalinovou chromatografií (Havliš 1999). MALDI-TOF MS je citlivou analytickou technikou s detekčními limity řádově femtomolů nebo i desetin femtomolů.

Metoda je aplikována při určování molekulových hmotností biomolekul, monitorování bioreakcí, studiu prostorového uspořádání a postranlačních modifikací bílkovin, sekvenování peptidů a oligonukleotidů. Využívá šetrné ionizační techniky, což znamená, že biomolekuly nejsou štěpeny, ale pouze ionizovány pomocí matrice, obvykle v pozitivním modu (analyzovány jsou kationty). Obecně se ionizují netěkavé složky biologického materiálu - fragmenty DNA, RNA, lipidy a proteiny. Generovat ionty látek s vyšší molekulovou hmotností je možné s využitím ionizace vzorku laserem za přítomnosti matrice. Podmínkou je schopnost molekuly absorbovat vlnovou délku laseru (tzn., že energie fotonů laseru je rovna energii potřebné pro excitaci matrice). Přenos energie z matrice na analyt je velmi rychlý (několik nanosekund). Technika MALDI využívá nejčastěji dusíkové UV lasery (trvání pulzu 4 ns o vlnové délce 337 nm), méně pak IR lasery. Proces ionizace v případě této metody však není doposud spolehlivě vysvětlen. Excitované molekuly matrice ionizují molekuly analytu přenosem protonu. K extrakci iontů z iontového zdroje do hmotnostního analyzátoru TOF (Time of Flight) (obrázek 12) dochází pomocí extrakčních mřížek s vysokým napětím. Průletový analyzátor TOF je podle fyzikálních principů separace iontů řazen do skupiny separující ionty dle různé doby rychlosti letu. Všechny ionty obdrží stejnou kinetickou energii, ionty s menší hodnotou m/z se pak pohybují k detektoru rychleji. K formování molekulových iontů dochází i u molekul s molekulovou hmotností až 10^6 Da a více.

Jak bylo uvedeno, technika charakterizuje molekuly poměrem m/z . Protože ionty nesou zpravidla jeden náboj ($[M+H]^+$), poměr je roven molekulové hmotnosti, jež je výstupním datem a hodnotou pro osu x charakteristického spektra (obrázek 5). V analyzátoru TOF jsou měřeny doby letu iontů. Detektor obsahuje záznamové zařízení. Výstup je veden do elektrometrického zesilovače, kde je signál upraven pro další, většinou počítačové zpracování.



Obr. 5: MALDI TOF spektrum lysozymu 14,3kDa
osa x : poměr m/z ;
osa y : intenzita iontu
v místě odštělu.

(Převzato: Oddělení funkční genomiky a proteomiky, PŘF MU)

MALDI-TOF MS analýza mikroorganismů

MALDI-TOF MS je rychlá technika pro identifikaci prokaryot, analýzu biomarkerů intaktních virů a spor. V případě bakteriálních buněk jsou analyzovány složky bakteriálního proteomu uvolněné narušením buněčné stěny rozpouštědly (Demirev a kol. 1999, Marvin a kol. 2003). Jako buněčný materiál pro analýzu zpočátku sloužily lyzáty buněk (Cain a kol. 1994), následně byly zpracovávány celobuněčné preparáty (Holland a kol. 1996, Williams a kol. 2003). Hlavní předností analýzy celých buněk je rychlost a jednoduchost (Lay 2000).

Buňky mohou být tedy analyzovány přímo nebo za využití metod zakoncentrování proteinů. Bakteriální kultura se odebírá buď z tekutého média po centrifugaci nebo z pevného média na agarových plotnách. Odebraný objem buněk se mísí s roztokem voda:rozpouštědlo. Vhodným rozpouštědlem je acetonitril, který působí fraktury buněk a uvolňuje proteiny; ve vzorku se poté vyskytují buňky intaktní i narušené. Před analýzou lze proteiny separovat.

Jiné postupy přípravy vzorku se využívají u gram pozitivních a jiné u gram negativních buněk, neboť proteiny a peptidy jsou z buňky uvolňovány v závislosti na struktuře buněčné stěny. U gram pozitivních buněk nestačí pro zpřístupnění proteinů mechanické rozrušení buněčné stěny. Jejich buněčná stěna je proto rozrušována lysozymem (0,5 mg/ml) v místě

β -1,4-glykosidických vazeb mezi N-acetylglukosaminem a kyselinou N-acetylmuramovou v peptidoglykanu. Buňky jsou promyty vodou a po centrifugaci je pelet resuspendován v 50% acetonitrilu a 0,1% trifluoroctové kyselině (TFA). Následně je jejich buněčná stěna narušena lysozymem a vzorek je smíchán s matricí, která se dodává v nadbytku k analyzovanému roztoku. Po usušení následuje MALDI-TOF MS analýza. U gramnegativních buněk není zařazován krok přidavku lysozymu (Smole a kol. 2002).

Princip přípravy vzorku pro analýzu MALDI-MS spočívá ve smísení bakteriální suspenze (v roztoku voda : ACN) v nadbytku matrice v molárním poměru přibližně 1:10⁴. Směs je nanášena na speciální kovovou destičku a po vysušení při pokojové teplotě umístěna do hlubokého vakua (10⁻⁴ Pa) v iontovém zdroji. Krystaly ze zaschlé kapky jsou zasaženy pulzy laseru. Matrice absorbuje energii, rozkládá se na ionty a pravděpodobně ionizuje vzorek za vysokého tlaku těsně nad ozářeným povrchem. Výsledkem je charakteristické MALDI-MS spektrum (profil) proteinů a peptidů buňky.

Zpracování hmotnostních spekter zahrnuje identifikaci a kvantifikaci píků, výpočet podobnosti mezi proteinovými spektry, seskupení dat a identifikaci vzorku v rámci rodu a druhu, případně typizaci kmene. Profil je druhově i kmenově specifický a proto jej lze využít k identifikaci neznámého vzorku i k autentizaci bakteriálního kmene, což je významné například u nozokomiálních infekcí (Lay 2000).

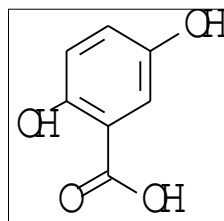
Matrice

Volba matrice je klíčovým faktorem analýzy. Jako vhodné matrice pro UV lasery jsou používány aromatické karboxylové kyseliny, většinou deriváty kyseliny benzoové rozpuštěné ve vodě a vhodném rozpouštědle. Vhodnými matricemi jsou kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA), 3,5-dimetoxy-4-hydroxyskořicová (sinapová, SA), dihydroxybenzoová (gentisová, DHB), 4-hydroxy-3-metoxyskořicová (ferulová, FA). Pro gramnegativní bakterie a archea je nejčastěji užívanou matricí α -cyano-4-hydroxyskořicová kyselina, pro grampozitivní bakterie 5-chlor-2-merkaptobenzothiazol (Evason 2001, Krader a Emerson 2004). V některých studiích se však setkáváme s užitím stejné matrice pro grampozitivní i gramnegativní bakterie (Karas a Bahr 1991, Marvin a kol. 2003).

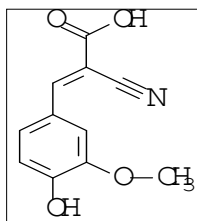
Odlišná povaha jednotlivých matricí způsobuje odlišnou krystalizaci a ionizaci látek dle jejich molekulových hmotností (obrázek 6). CHCA například ionizuje hlavně peptidy a SA vykazuje dobrou schopnost ionizace v oblasti nižších molekulových hmotností proteinů a polymerů. Pro vysokomolekulární látky se využívá DHB v roztoku voda:acetonitril 4:1. Vody

je zde větší množství, vzorek tak zasychá pomaleji a správně krystalizuje. DHB dobře ionizuje peptidy, proteiny, lipidy, nukleové kyseliny a sacharidy, je proto považována za univerzální matici.

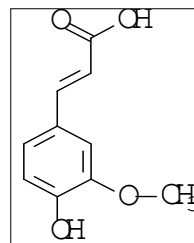
Chemická struktura některých matic pro techniku MALDI:



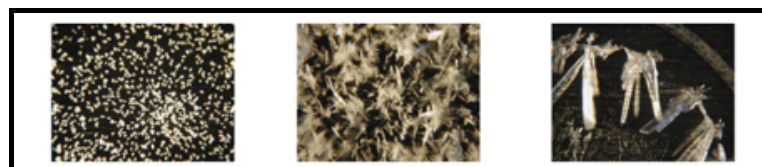
kyselina DHB
2,5 – dihydroxybenzoová



kyselina CHCA
 α -kyano-4-hydroxyskořicová



kyselina FA
4-hydroxy-3-metoxyskořicová



A

B

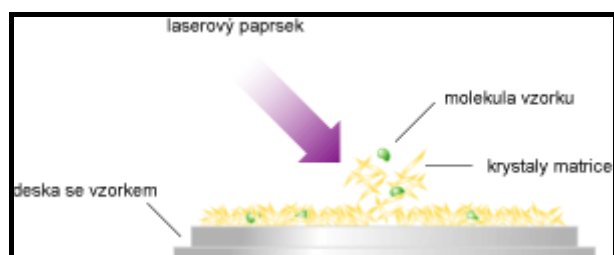
C

Obr. 6: Krystalizace některých matic na MALDI desce:

A – CHCA, B – SA,

C – DHB

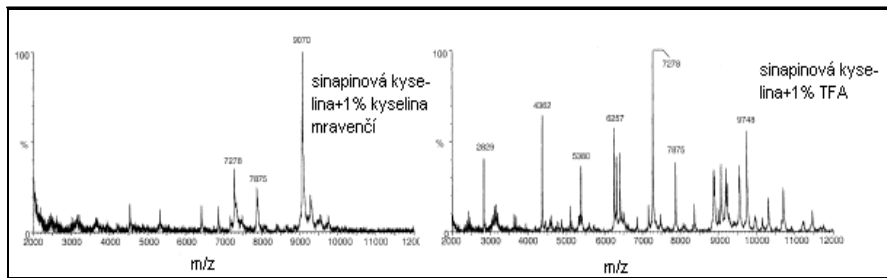
(Převzato: Martin Strohm, 2005)



Obr. 7: Schéma ionizace

(Převzato: Martin Strohm, 2005)

Pro úpravu pH slouží kyselina trifluoroctová (TFA) nebo kyselina mravenčí. Okyselení se provádí pro zvýšení kvality signálu. Roztoky kyselin jsou k analyzované směsi přidávány buď přímo na destičce, nebo se jimi nahrazuje voda při rozpuštění matrice a vzorku. Po přidavku TFA k matici je detekováno více proteinů a silnější signály než při užití k.mravenčí (obrázek 8). Kyselina mravenčí může esterifikovat hydroxyskupiny přítomné např. v molekulách peptidů a vytvářet píky o 28 Da vyšší, než by odpovídalo očekávaným iontům.



Obr. 8:
 Vliv přidavku
 1% FA (A) a 1%TFA
 (B) na MALDI-MS
 profil *E. coli*
 (Upraveno podle:
 Williams a kol. 2003)

A

B

Matrice je s analytem v těžko definovatelném kontaktu, proces ionizace není doposud spolehlivě vysvětlen. Matrice se volí tak, aby tvořila během schnutí směsné krystaly s analytem a vzniklé krystaly měly co nejmenší velikost a tvořily na destičce souvislý film (obrázek 7). Tato vlastnost není předvídatelná, zjišťuje se empiricky. Nestejnorodá krystalizace komplikuje zacílení laseru a získávání dat. Výhodou je možnost „konzervace“ vzorku v krystalech matrice po nanesení na destičku, analýza nemusí být provedena záhy po nanesení vzorku.

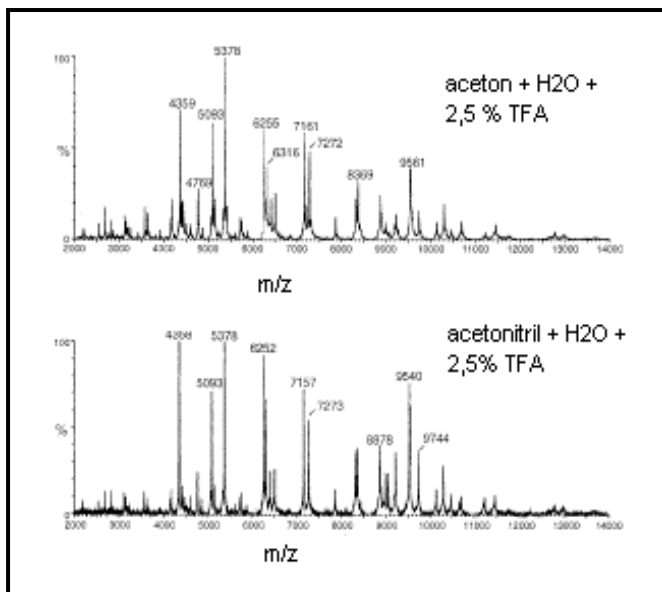
Matrice by se měla rozpouštět ve stejném rozpouštědle jako vzorek, aby se molekuly ze vzorku správně inkorporovaly do krystalů matrice. Matrice musí absorbovat vlnovou délku laseru a neměla by reagovat se vzorkem. Za působení laserového pulsu musí být matrice fotostabilní. Nesmí docházet k tvorbě reaktivních zbytků kyseliny; tyto by vytvářely adukty s molekulami analytu a komplikovaly spektrum. Při analýze peptidů a proteinů se nepoužívá matrice oxidující sulfoskupiny cysteinu a methioninu nebo aldehydy vytvářející s aminoskupinami Schiffovy báze.

Rozpouštědlo vzorku

Nejčastějšími využívanými rozpouštědly jsou aceton a acetonitril ve směsi s vodou (obrázek 9). Rozpouštědlo musí být mísitelné s rozpouštědlem matrice a musí mít vhodné povrchové napětí, aby došlo ke správnému rozlití kapky na destičce. Vysoké povrchové napětí a kruhové kapky vykazují směsi rozpouštědel s vysokým podílem vody. Více těkavá rozpouštědla tvoří malé krystalky s homogennější distribucí analytu. Při vyšší rychlosti vypařování dochází k nárůstu míry kationizace molekul analytu a poklesu intenzity signálu velkých molekul.

Nesmí dojít k vykrytalizování vzorku nebo matrice při smíchání obou roztoků. Na procesu krystalizace matrice a vzorku se významně podílí pH směsi rozpouštědel. U proteinů

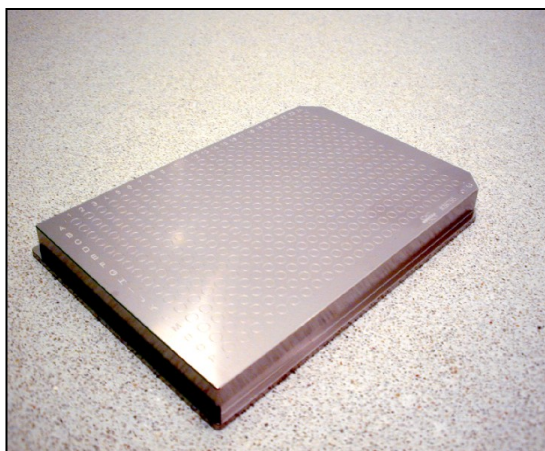
a peptidů může docházet v závislosti na pH ke změnám jejich konformací. Kyselost se zvyšuje pomocí kyseliny mravenčí nebo trifluoroctové.



Obr. 9: Vliv rozpouštědel acetonu a acetonitrilu na MALDI-MS profil *E. coli* (Upraveno podle: Williams a kol. 2003)

Destička MALDI

Destičky (obrázek 10) jsou vyráběny s vysokou přesností obvykle z nerezové oceli nebo hliníku. Ocel i hliník jsou vůči matrici a rozpouštědlům inertní. Nezpůsobují kationizaci analytu. Destička pro 384 vzorků obsahuje ve sloupci políčka A až P a v řádku políčka s čísly 1 až 24. Destičky musí být snadno čistitelné do hladkého povrchu a před analýzou musí být zbaveny nečistot a prachu.



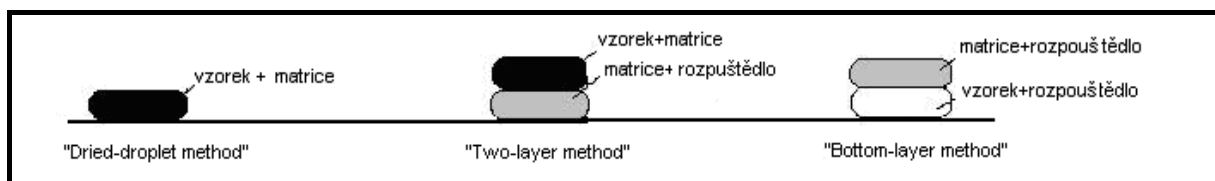
Obr. 10: Destička MALDI (Převzato: Oddělení funkční genomiky a proteomiky, PřF MU)

Nanášení vzorku

Podle způsobu vrstvení směsi matrice, rozpouštědla a vzorku rozlišujeme tři základní metody (obrázek 11). První způsob se nazývá „Dried-droplet“, kdy se nanáší kapka směsi vzorku s nasyceným roztokem matrice v poměru 1:5 až 1:10 v objemu 0,5 – 2 μl na destičku a kapka zasychá při laboratorní teplotě. Tato metoda je jednoduchá a vysoce reprodukovatelná. Poskytuje nejlepší výsledky při detekci vysokomolekulárních látek (Vaidyanathan a kol. 2002). Nevýhodou je vylučování krystalů matrice a vzorku na obvodu vysušené kapky. Místa poskytující signál se poté musí vyhledávat.

Při metodě „Two-layer“ se nanáší na destičku jako první kapka roztoku matrice a po zaschnutí se převrstvuje směsí vzorku a matrice. Při třetí, „Bottom-layer“ metodě se jako první nanáší kapka rozpuštěného vzorku, na kterou je po zaschnutí nanášena kapka roztoku matrice. Tato metoda ionizuje lépe látky s nižší molekulovou hmotností (Vaidyanathan a kol. 2002, Williams a kol. 2003).

Pokud se na destičku roztok nanáší elektrosprejem, roztok se stříká na destičku z kapiláry pod vysokým napětím ze vzdálenosti několika centimetrů. Vzniká tak vrstva mikrokrystalů stejné velikosti, ve které jsou molekuly analytu pravidelně distribuovány a tak je dosaženo vysoké reprodukovatelnosti měření a možnosti kvantitativní analýzy. Lze potom metodu MALDI spojit se separačními metodami, jako například HPLC nebo CE (Vaidyanathan a kol. 2002).

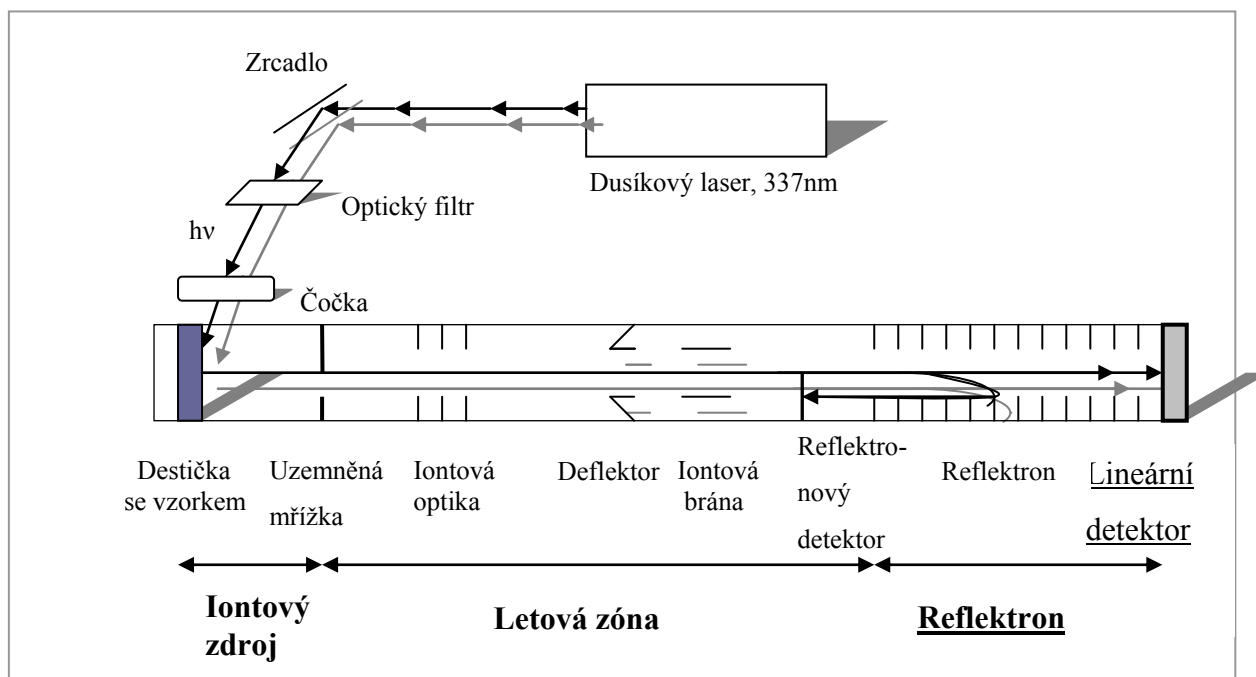


Obr.11: Metody nanášení vzorku před analýzou (Upraveno podle: Williams a kol. 2003)

Princip techniky MALDI - MS

Mechanismem generování protonovaných molekul analytu je pravděpodobně přenos protonu v excitovaném stavu. Zároveň dochází k přechodu molekul analytu z pevné do plynné fáze. Ionizací se rozumí adice kationu (H^+ , Na^+) či aniontu na molekulu vzorku, disociace H^+ z molekuly vzorku nebo vznik radikálu odštěpením elektronu. Produkty ionizace jsou převážně pseudomolekulové ionty $[\text{A}+\text{H}]^+$, kdy je náboj iontu většinou 1. Lze ovšem

pozorovat i vícenásobně nabitě ionty analytu $[A+H]^{2+}$, dimer iontu analytu $[A_2+H]^+$, adukty analytu s alkalickými kovy a maticí $[A+Na]^+$, $[A+K]^+$, $[A+MH]^+$, fragmenty matrice a analytu a iontové klastry. Ionty jsou urychleny silným elektrickým polem (25-30kV) a přes uzemněnou mřížku vstupují do vakua v trubici analyzátoru TOF, kde se pohybují rychlostí danou jejich hmotností a nábojem. Měří se doba letu částice, kterou zaznamenává detektor (obrázek 12). Menší ionty dorazí k detektoru dříve než větší (Havliš 1999, Helánová 2004, <http://user.upce.cz/~holcapek/vyuka.htm>, Marvin a kol., 2003).



Obr. 12: Schéma přístroje MALDI TOF (Upraveno podle: Marvin a kol. 2003)

Hmotnostní průletový analyzátor TOF

Fyzikální popis principu TOF (obr.12) vychází z předpokladu, že při ionizaci získají ionty přibližně stejnou energii a jsou urychleny elektrickým potenciálem V , takže platí:

$E_k = 1/2 \cdot m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot V$. Pro dobu dráhy letu iontu platí: $t = l/v$, kde l je délka analyzátorové trubice (tj.dráha letu), v je rychlost iontu a e elementární náboj.

Reflektron je soustava mřížek nesoucí vysoké napětí se stejnou polaritou jako druh analyzovaného iontu. Dokáže zúžit distribuci kinetické energie iontů tím, že ionty s vyšší energií pronikají do reflektoru hlouběji, a tím dochází ke zvýšení jejich doby letu. Zhoršení rozlišení může být způsobeno rozpadem metastabilních iontů, jehož pravděpodobnost se zvyšuje kvůli nárůstu celkové doby letu.

Výhoda TOF analyzátoru spočívá v jeho vysoké citlivosti (jsou detekovány všechny ionty extrahované z iontového zdroje), v krátké době analýzy a v teoreticky neomezené maximální m/z hodnotě. Pomocí iontového zrcadla (reflektronu) a zpožděné reakce lze dosáhnout vysokého rozlišení.

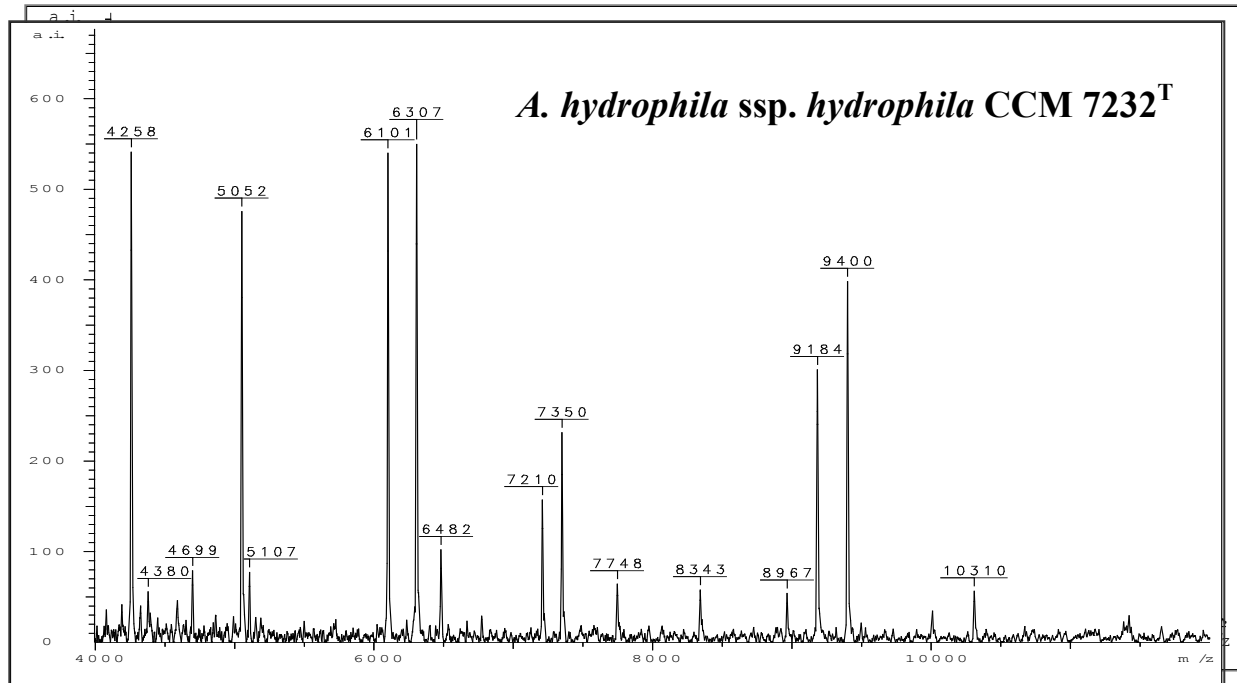
Hmotnostní spektrum

MALDI-TOF hmotnostní spektrum je zobrazením četnosti ionizovatelných částic bakteriálního proteomu. MALDI-MS profil proteinů celých buněk i proteinů izolovaných je vysoce charakteristický (Lay 2001). Charakter spektra závisí na krystalizaci a ionizačních vlastnostech vzorku, proto je výška píku rovna relativní koncentraci proteinu v místě ionizace na desce. Intenzita (výška) píku se projeví dle stupně ionizace, proto není MALDI-MS vhodnou kvantitativní metodou. V praxi se posouvá terčik pro zacílení paprsku na jednotlivých místech políčka, které je snímáno kamerou. Vyhledávají se spektra s co nejvyšším poměrem signál/šum. Signál se objevuje po dosažení prahové energie.

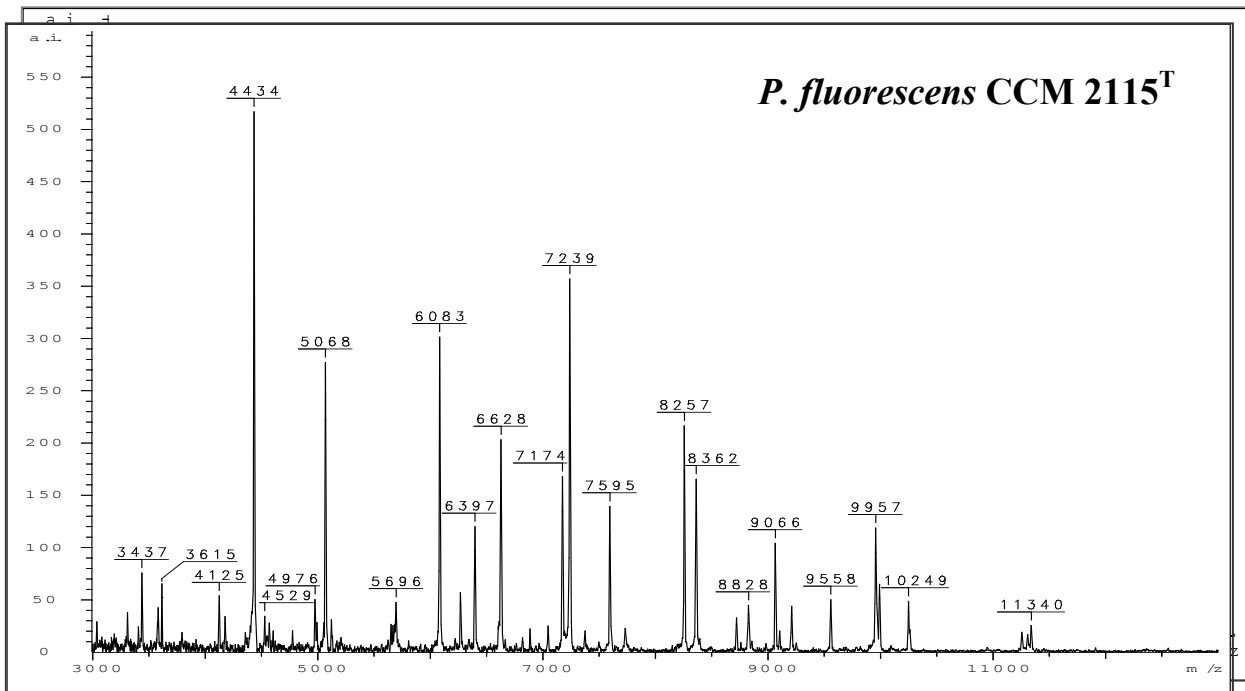
Spektra produkovaná identickými kmeny vykazují za dodržení standardních protokolů vysoký stupeň podobnosti. Identifikace je umožněna srovnáním proteinových profilů analýzy s referenčními spektry (Lay 2001). Spektra užitá při identifikaci musí být vysoce reprodukovatelná. Pro charakterizaci bakterií je důležitá interpretace dat postihující složitost spekter a nepatrné rozdíly u příbuzných kmenů (Lay 2001). Píky přítomné ve všech měřeních jednoho vzorku jsou považovány za charakteristické markery jednotlivých kmenů (Tvrzová a kol. 2006). Studie spekter ukázaly, že 90 % signálů pochází z oblasti 600 - 10 000 Da. Ionty s molekulovou hmotností pod 600 Da jsou výsledkem ionizace vlastní matrice. Vysokohmotnostní ionty jsou charakteristické pouze pro určitý bakteriální kmen. Tyto ionty jsou jedinečnými signály vhodnými k rozlišení bakterií díky minimálnímu pozadí přítomnému ve vysokohmotnostní oblasti spekter (Lay 2001).

Při srovnávání spekter jednotlivých druhů uvnitř rodu se hledají rodově charakteristické signály píků. Tyto píky se opakují u všech druhů. Dalším krokem je nalezení vnitrodruhových společných a diferenciacních znaků. Jedná se o biomarkery charakteristické pro daný druh a dále o markery, jimiž se odlišují kmeny uvnitř druhu. Identifikace až po úroveň kmenů je možná díky detekci charakteristických proteinů a peptidů. Biomarkery se dále charakterizují sekvenací nebo měřením hmotnosti peptidů po enzymatickém štěpení (Lay 2000).

Charakteristická MALDI-MS spektra prokaryotických organismů z celobuněčného vzorku jsou znázorněna na obrázcích 13 a 14. Na ose x vidíme záznam molekulové hmotnosti ionizovaných složek rozpouštědly „zpřístupněného“ proteomu buňky, na ose y potom intenzitu jejich signálu.



Obr. 13: Charakteristické spektrum kmene *A. hydrophila ssp. hydrophila CCM 7232^T*
Osa x: poměr m/z (hmotnost); osa y: intenzita signálu *a.i.* (arbitrary units)



Obr. 14: Charakteristické spektrum kmene *P. fluorescens CCM 2115^T*
Osa x: poměr m/z (hmotnost); osa y: intenzita signálu *a.i.*

MALDI-MS hmotnostní profily jsou jedinečné, takže umožňují identifikaci bakterií (Holland a kol. 1996). Typizace je možná na základě nepatrných rozdílů ve spektrech mezi jednotlivými kmeny. V publikacích se uvádějí MALDI-MS profily jednotlivých druhů. Takto se získaly typické a konzervované profily např. mezi jednotlivými druhy rodu *Campylobacter*. Testováno bylo 130 kmenů. Všechny analyzované kmeny *C. jejuni* a *C. coli* poskytovaly píky o hodnotě 7 035-7 036 Da a 8 153-8 154 Da, které se nevyskytovaly v žádném ze vzorků kmenů *C. lari* a *C. upsaliensis*. *C. jejuni* byl dále od druhu *C. coli* odlišen typickým výskytem píků v oblasti hmot 10 275-13 728 Da, které nebyly u kmenů *C. coli* přítomny. Pro druh *C. lari* byly naopak charakteristické píky o hodnotách 6 998 Da a pro *C. upsaliensis* 7 063 Da. Grampozitivní buňky *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. pyogenes* a *S. agalactiae* obsahují ve spektru 16 až 32 společných píků z celkového množství 50-75 detekovaných píků. Jejich hmotnosti jsou v rozmezí 1,8 – 11 kDa (Smole a kol. 2002).

Tyto rozdíly není možné hodnotit opticky; výsledky analýzy se opírají vzhledem k velkému množství dat o klastrovou analýzu provedenou vhodným software. V současnosti je cílem získat standardní protokol přípravy vzorku a stabilní, reprodukovatelná spektra, aby mohla být vytvořena rozsáhlá databáze referenčních spekter, která by umožnila spolehlivou a rychlou identifikaci mikroorganismů (Bright a kol. 2002, Shah a kol. 2002, Wunschel a kol. 2005 a).

Úprava výstupních spekter před klastrovou analýzou

MALDI-TOF spektra se po MALDI-MS analýze upravují a poté převádějí do formátu ascii (tabulka s hodnotami m/z a intenzit), které slouží jako vstup pro klastrovou analýzu. Při úpravách se spektrum vyhlazuje, odečítá se baseline, a kalibrují se molekulové hmotnosti. Každý pík spektra je na ose x charakterizován poměrem m/z , který se získá přepočítáním z naměřené doby letu. Aby nebyly při vyhodnocení za píky považovány náhodné signály příslušející šumu, průměruje se každých 41 sousedních bodů spektra. Poté se odečítá baseline, čímž je dolní hranice šumu sjednocena s osou y .

Pro kalibraci molekulových hmotností byl použit lysozym, který se analyzuje v sérii se vzorky. Na základě známých poměrů m/z $[M+H]^+$ a $[M+2H]^{2+}$ iontů lysozymu je vytvořena matematická funkce pro přepočet doby letu na m/z píků v analyzovaných vzorcích. Spektra všech 15ti analýz jednoho vzorku jsou sjednocena na průměrné hmotnosti, neboť píky se opakují v každém z nich. Empiricky se stanovují charakteristické píky rodu – přítomné u všech druhů.

Metodika shlukové analýzy

Protože výsledná spektra vykazovala mnoho píků v rozsahu různých intenzit, hodnocení výsledných spekter opticky není dostatečně přesné. Nejvhodnější analýzou porovnávání takového souboru dat je proto analýza klastrová. Vzdálenosti (podobnosti) mezi dvojicemi spekter se počítaly v programu vyvinutém Fakultou informatiky MU jako vektorový součin (tzv. kosinová vzdálenost). Aby se s číselnými hodnotami podobnosti dobře pracovalo, je vhodné, aby tyto splňovaly vlastnosti metrik (symetrie, identita a trojúhelníková nerovnost). Uvedené podmínky kosinová funkce splňuje (Zezula 2005). Přítomnost nebo nepřítomnost jednotlivých píků je vyjádřena jednotlivými složkami vektoru. Každá dvojice spekter je převedena na dvojici vektorů. Rozměr vektoru odráží počet odlišných píků, hodnoty vektorů znamenají intenzitu těchto píků. Poté byl vypočítán součin vektorů (dot product), což je kosinus úhlů mezi vektory kvantifikující podobnost spekter a nabývající hodnoty 0 – 1 (Salton, 1989).

Součin vektorů identických spekter dává hodnotu 1, součin vektorů spekter úplně odlišných se rovná 0. Jeden vzorek byl souhrnem 15 spekter; k výpočtu průměrné vzdálenosti mezi dvojicí spekter je tedy využito 225 porovnáání. Průměr se přepočítává dvakrát – z opakovaných analýz MALDI v rámci jednoho spotu a ze tří spotů jednoho mikrobiologického vzorku. Výsledkem je matice vzdáleností pro každou dvojici vzorků. Nad maticí vzdáleností mezi spektry byly vytvořeny shluky programem CLUTO (Karypis G.). CLUTO je program, který klastruje sady dat do smysluplných skupin hierarchickým aglomerativním shlukováním, přičemž podobnost uvnitř klastru je maximalizována. Shluky spekter (klastrová analýza) se zobrazily jako dendrogram pomocí programu DRAWTREE z balíku PHYLIP. CLUTO rovněž vypočítává vzdálenosti mezi větvemi dendrogramu. V průběhu prvních analýz byly dendrogramy generovány přímo programem CLUTO a neobsahovaly měřítko. Čísla v uzlu ukazovala pořadí shluku. Každý nový uzel byl posunut o stejnou vzdálenost bez ohledu na podobnost. Následně byl Fakultou informatiky vyvinut postup přidělující dendrogramům měřítko ve formátu NEWICK dle použitého výpočtu podobnosti – tedy v rozsahu 0-1. Maximální možná celková délka větví dendrogramu je rovna 1 a to je vzdálenost dvou nejméně příbuzných vzorků spojených přes kořen dendrogramu. Šířka dendrogramu má tedy hodnotu 0,5 a sumární délky kratších větví mezi libovolným párem vzorků jsou vyjádřením příbuznosti, v měřítku 0-1.

Nově vytvořené dendrogramy zachovávají topologii s původními dendrogramy ukazujícími pouze pořadí shluků, ale délka větví lépe odráží podobnost mezi jednotlivými

shluky. Podobnost je zobrazena lépe, protože větve jsou v měřítku, které je odvozené od průměrné podobnosti mezi skupinami.

Tvorba dendrogramů

Zpracování dat zahrnuje identifikaci a kvantifikaci píků, výpočet podobnosti mezi hmotnostními spektry. Z matice podobnosti spekter se provádí klastrová analýza. Shluky podobnosti se zobrazují jako dendrogram, jsou vypočítávány vzdálenosti mezi větvemi.

Na základě získaného dendrogramu je založena klasifikace vzorku v rámci rodu, druhu i kmene. V publikacích je uváděno využití softwaru SARAMIS (Anagnostec, Německo), Biotyper (Bruker, Německo).

Vliv experimentálních podmínek na analýzu bakterií

Rozdíly mezi spektry získanými v různých laboratořích jsou způsobeny rozdílnou přípravou vzorku. K tomu, aby se metoda MALDI-TOF MS stala účinnou identifikační metodou, je potřeba zavedení standardního protokolu přípravy vzorku.

Při MALDI-TOF MS analýze buněčných vzorků se zkoumá vliv růstových cyklů buňky, uchovávání vzorku, růstového media, typ použité matrice a její okyselení. Při standardizaci protokolů je nutno dodržovat typ užitých kultivačních medií a stáří kultury. Živiny indukují nebo potlačují syntézu některých proteinů, což může ovlivnit výstupní spektrum (Lay, 2000, Valentine a kol. 2005, Mazzeo a kol. 2005).

Mnoho variací ve spektrech je spojeno s buněčnou biologií. Bakterie vykazují odezvy na změny kultivačních podmínek změnami ve spektru buněčných proteinů a peptidů, ačkoli určitá část těchto markerů zůstává ve spektru dle studie Valentine a kol. (2005) stejná. Buňky by pro opakovanou analýzu měly být kultivovány za jednotných podmínek – na stejném vhodném mediu a se shodným stářím kultury. Je třeba dbát na specifické nároky na živiny některých bakteriálních druhů. Standardně se užívá medium, ze kterého bakterie poskytují nejlepší spektra. Vysoce reprodukovatelná spektra jsou získána z bakteriální kultury v exponenciální fázi růstu (Lay 2000, Krader a Emerson 2004).

Experimentální podmínky jsou rovněž důležitým parametrem. Instrumentální parametry, volba matrice, typ užitého rozpouštědla a okyselení matrice, urychlovací napětí a typ laseru mají rovněž vliv na hmotnostní spektrum (Williams a kol. 2003). Tato fakta

upozorňují na potřebu standardních protokolů přípravy vzorku. Vliv matrice a rozpouštědel a okyselení se zkoumal u gramnegativní *E.coli* a grampozitivní *Listeria innocua*. Pro různé druhy bakterií jsou vhodné různé druhy matric. Williams a kol. (2003) uvádí, že nejvhodnější matrice pro celobuněčné preparáty bakterií je α -cyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CHCA). Tato kyselina se jeví vhodnější pro detekci proteinů v rozmezí 12 až 25 kDa než sinapová kyselina. Jako rozpouštědlo slouží acetonitril, který poskytuje lepší následnou detekci bakteriálních proteinů z rozmezí hmot Mr 3-14 kDa než aceton. Spektra za použití acetonu či acetonitrilu jako rozpouštědla matrice jsou navzájem podobná, množství detekovaných proteinů a intenzita signálů je však větší než při využití methanolu či tetrahydrofuranu (Williams a kol. 2003).

MS detekuje velmi jemné změny v chemickém složení buňky. Identifikace klíčových proteinových biomarkerů však může vést k lepšímu porozumění těchto změn a rozlišení rodově, druhově a kmenově specifických iontů pro taxonomickou identifikaci. Změny v proteinovém spektru indukované prostředím nemusí negativně ovlivňovat výsledky identifikace proteinovými databázemi, protože určitá podmnožina biomarkerů zůstává při kultivaci buněk konstantní. Jedná se o specifické ionty bakteriálního proteomu, jejichž spektra jsou použita v databázích (Demirev a kol. 1999).

Využití MALDI-MS v mikrobiologii

Využití metody v klinické diagnostice

Metoda MALDI TOF je vhodná pro rychlé získání výsledků identifikace aerobních i anaerobních mikroorganismů v klinické diagnostice (Magee a kol. 2000, Ruelle a kol. 2004). Často analyzované druhy patří do rodů *Bacillus* (Warscheid a Fenselau 2004), *Campylobacter* (Mandrell a kol. 2005), *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Escherichia* (Holland a kol. 1996). V případě rodu *Haemophilus* bylo dokonce pomocí metody dosaženo rychlého screeningu izolátů nemocničních kmenů z pacientů. Určilo se, zda byly infekce získány nezávisle na pobytu v nemocnici (Haag a kol. 1998). MALDI-MS je vhodná pro klinickou diagnostiku druhů rodů *Helicobacter* (Nilsson 1999, Demirev a kol. 2001) a *Legionella* (Keys a kol. 2004). Metoda dosahuje rychlé a reprodukovatelné identifikace uvnitř složitěho systému nových i stávajících druhů rodu *Mycobacterium* (Chemlal a kol. 2002, Pignone a kol. 2006, Stinear a kol. 2000). Úspěšná identifikace byla prokázána i u druhů *Salmonella* (Leuschner a kol. 2003), *Streptococcus* (Kumar a kol. 2004, Keys a kol. 2004), *Staphylococcus* (Lay 2001,

Edwards-Jones a kol. 2000, Walker a kol. 2002). U rodu *Staphylococcus* byly dokonce rozlišeny methicilin-citlivé a methicilin-rezistentní kmeny (Walker a kol. 2002). Při využití referenčních spekter je možno identifikovat neznámý vzorek (Lynn a kol 1999).

Využití metody v enviromentálních studiích a v potravinářství

MALDI-TOF MS je vhodná pro sledování patogenních i nepatogenních mikroorganismů v potravinách (*Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*). Příkladem je studie, při níž bylo studováno 24 bakteriálních kmenů spolu s detailní analýzou a identifikací *E. coli* O157:H7. Byly získány vysoce specifické MALDI-MS profily bakterií, které jsou hlavními kontaminantami potravin. Byla vytvořena jejich databáze (http://bioinformatica.isa.cnr.it/Descr_Bact_Dbase.htm), která je volně dostupná na internetu. Výsledky potvrdily významnost rychlé a přesné identifikace bakteriálních druhů (Mazzeo a kol. 2005).

V prostředí se sleduje osídlení půdy a kolonizace rostlin. Kvalitativně se hodnotila přítomnost jednotlivých druhů při bioremediačních procesech a dále se stanovují sekundární metabolity v prostředí. Metoda se využívá při hodnocení stavu odpadních vod sledováním indikátorů biologické kvality vody, jako např. *E.coli*, *Salmonella* (Ruelle a kol. 2004).

Využití metody v taxonomii mikroorganismů

Fylogenetická příbuznost je základem pro klasifikaci mikroorganismů a vychází ze struktury 16Sr RNA. U některých druhů však sekvencování této nukleové kyseliny nerozliší příbuzné druhy. Např.u kmenů rodu *Bacillus* nejsou při klasifikaci na základě sekvence genů pro 16S rRNA kmeny různých druhů odlišeny. V případě techniky MALDI-TOF MS dochází k odlišení těchto fenotypicky a v genech pro 16S rRNA neodlišitelných druhů (Warscheid a Fensleau 2004). Názorná studie popisuje využití metody pro diferenciaci 25ti úzce příbuzných kmenů *E.coli* provedené ve dvou nezávislých laboratořích (Arnold a kol. 1998).

Významné je využití metody při typizaci v rámci rodu *Aeromonas*. Taxonomie rodu se vyvíjí; dle současného systému klasifikace patří do čeledi *Aeromonadaceae* řádu *Aeromonadales*. Rod vykazuje vysokou heterogenitu a genetickou proměnlivost, fenotypová diferenciaci je obtížná. Validně bylo doposud popsáno 17 druhů řazených do pěti skupin. Významným přínosem techniky MALDI-TOF MS je vnitrodruhová diferenciaci kmenů a odlišení druhů fenotypově nerozlišitelných (Donohue a kol. 2005, Donohue a kol. 2007).

Využití metody při analýze specifických bakteriálních proteinů, stanovení molekulové hmotnosti iontů, peptidů, proteinů, nukleových kyselin, sacharidů, lipidů

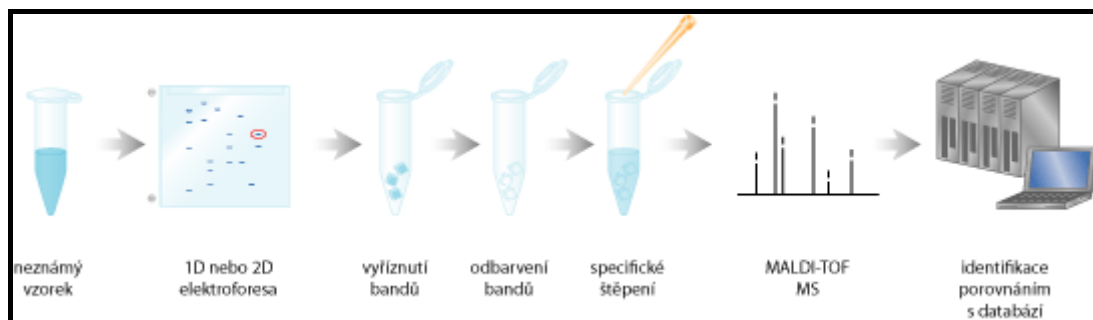
Metodou MALDI-MS byly identifikovány rekombinantní proteiny, proteiny faktorů virulence, enzymy, metabolity, proteiny sporových stěn (Hathout a kol. 1999, Ryzhov a kol. 2000, Dickinson a kol. 2004) a S-vrstvy, sekvenuje bakteriální nukleové kyseliny (Marvin a kol. 2003, Lay 2001, Taranenko a kol. 2002). Neméně je významné studium bakteriocinů (Hindre a kol. 2003).

Výhodou MALDI TOF MS je detekce markerů přímo ze vzorku bez purifikace, kdy by při každém kroku docházelo ke ztrátám materiálu (Westman a kol. 1998, Nilsson a kol. 1998).

Proteomické studie mají velký přínos při studiu biomarkerů použitelných pro diagnostiku onemocnění a pro předpověď odezvy na terapii. Pomocí MS je možné identifikovat tisíce proteinů tvořících komplexní biosystémy v tkáních a tělních tekutinách. Posun od analýzy jednoho markeru k analýze panelu markerů při diagnostice onemocnění a nutnost interpretace dat získaných proteomickými technologiemi vedla k rozvoji bioinformatiky, která umožňuje využívání proteinových databází a speciálního software (Poon a kol 2001).

Peptidové mapování

V posledních desetiletích vzrůstá potřeba identifikovat v mikrobiologickém materiálu jednotlivé bílkoviny (Abel a kol. 2007, Altincicek a kol. 2007, Reynaud af Geijersstam a kol. 2007). Pro analýzu stačí několik mikrolitrů vzorku s několika desítkami pikomolů proteinu. Po denuraci a přerušení disulfidových můstků redukcí (např. dithiotreitem) a zablokování alkylací (obvykle jodacetamidem) je peptidový řetězec za kontrolovaných podmínek specificky rozštěpen; nejčastěji se využívá trypsin (štěpí v řetězci za bazickými aminokyselinami lysinem a argininem) nebo chymotrypsinem (štěpí za aromatickými i dalšími aminokyselinami). Vzniká směs peptidů, u nichž se určují molekulové hmotnosti technikou MALDI-MS (obrázek 15). Hodnoty se zadají do veřejně přístupné databáze (MSDB, NCBIInr, Swissprot, dbEST). Srovnání s proteinovými databázemi probíhá pomocí speciálních programů: Protein Prospector, Mascot (www.matrixscience.com), Proteomics. Tato metodika je poměrně jednoduchá a lze ji při běžných laboratorních podmínkách zvládnout za 2 - 4 hodiny.



Obr. 15: Schema identifikace proteinů z gelu po elektroforéze (Převzato: Martin Strohalm, 2005)

Pokud se pracuje se směsí bílkovin, směs se nejprve elektroforeticky rozdělí, zóny gelu jsou pak vyříznuty, redukovány a alkylovány. Po naštěpení trypsinem je protein z gelu extrahován a peptidové štěpy analyzovány. Takto probíhá např. analýza krevního séra a buněčných homogenátů, kdy může být analyzováno až několik stovek bílkovin.