

MALDI-MS analýza mikroorganismů

<http://www.sci.muni.cz/FGP/>

Centrální laboratoř (CL)

Centrální laboratoř Masarykovy univerzity (CL) podporuje výzkum na kampusu i mimo něj. Intelektuální a technická infrastruktura je nezbytná pro řešení komplexních genomických a proteomických výzkumných projektů. CL umožňuje akademické komunitě přístup k pokročilým technologiím na bázi sdílené instrumentace a její vysoce kvalifikované obsluhy. Genomické technologie zahrnují DNA sekvenování a fragmentační analýzu a navíc též syntézu oligonukleotidů (včetně Real-Time PCR sond). Proteomické techniky pokrývají spektrum izolace, purifikace a separace proteinů a jejich charakterizace hmotnostní spektrometrií. CL nabízí praktické kurzy. CL je aktivním členem Association of Biomolecular Resource Facilities (ABRF).

Proteomické techniky

Jednorozměrná a dvojrozměrná multigelová elektroforéza (Bio-Rad)

Kapalinové chromatografy Ultimate (Dionex-LC Packings)

Hmotnostní spektrometry Reflex IV a Esquire 2000 (Bruker)

Nabízíme všechny kroky nutné ke zpracování vzorku - od izolace proteinů až po jejich charakterizaci a bioinformatické zpracování dat. Provádíme solubilizaci vzorku, depleci abundantních proteinů, prefrakcionaci, isoelektrickou fokusaci na imobilizovaných gradientech pH, separaci polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (1-DE, 2-DE), barvení po separaci v gelu, image analýzu, dále pak frakcionaci a separaci kapalinovou chromatografií, proteinovou digesci (in-gel nebo in-solution) a **MS analýzu** (MALDI-TOF MS a LCMSMS).

Příprava vzorku (extrakce kyselina mravenčí/acetonitril)

Pomůcky

- dostatečně narostlé overnight kultury bakterií (kvasinek, hub) (testováno – vliv media, kultivační teploty a stáří kultury!!! – variace ve spektru, ale nikoli v sumě cca 200-300 peptidů stabilně přítomných, podmínkami neovlivnitelných a důležitých pro identifikaci)
- pomalurostoucí kultury – odběr po jejich narostení
- chemikálie a plasty musí být v kvalitě pro hmotnostní spektrometrii nebo pro HPLC!! (tzn. nejvyšší čistoty)
- sterilní 1,5 ml Eppendorf zkumavky, sterilní 1000 µl špičky, automatické mikropipety, sterilní deionizovaná voda, sterilní umělohmotné kličky (vyhýbat se kovům, ovlivňují spektra - adukty), pokud odebíráme z tekutého media – sterilní skleněné pasteurky)
- pomůcky v MALDI-MS laboratoři: čerstvě připravená matrice – HCCA v 50% ACN a 2,5% TFA (roztok ACN/TFA – basic organic solvent)

Postup přípravy vzorku v mikrobiologické laboratoři (flowbox, vortex):

- 5-10 mg buněčného materiálu narostlé kultury rozmíchat v 900 µl sterilní DDW
- dobře promýt buňky od media (vortex) (při použití buněk z kultivace v tekutém mediu doporučuji dvojitě promytí v DDW)
- Centrifugovat 2 minuty při 4000-5000ot/min
- Odpipetovat vodu po promytí buněk, dále pracujeme s peletem
- K peletu buněk přidat 300 µl DDW a promíchat na vortexu
- Přidat 900 µl 96 % ethanolu, promíchat na vortexu
- Centrifugovat 2 minuty při 13 500 ot/min
- Odpipetovat VEŠKERY supernatant
- Pelet skladovat v lednici

Postup přípravy vzorku pro analýzu v laboratoři MS (kampus, budova A2):

MALDI MS analýza vzorku bakteriální kultury: