

## MALDI-MS analýza mikroorganismů

Její výhodou je rychlé získání výstupních dat, která jsou obtížně dostupná u geneticky a biochemicky obtížně odlišitelných druhů, např. druhů rodu *Listeria*, *B. anthracis* a *B. cereus*, kmeny beta-hemolytických streptokoků skupiny A. Technika MALDI-TOF MS však poskytl jedinečné signály těchto bakterií.

Důkazem typizace až po úroveň kmene jsou studie typizace kmenů methicilin-senzitivních (MSSA) a rezistentních (MRSA) stafylokoků.

Další studie získala charakteristické spektrum kmene *E. coli O157:H7* se specifickým signálem antigenu: *m/z* 9740.

- rychlost analýzy a značná citlivost detekce, vysoká reprodukovatelnost a jednoduchá příprava vzorku, detekce markerů široké palety mikroorganismů

- Databáze

Referenční spektra jsou vytvořena za využití vhodných algoritmů a uložena na internetu (Demirev a kol. 1999). Takto je např. dostupná knihovna PNNL obsahující referenční signály kmene *B. subtilis* ATCC 15841 v TSB, *E. coli* a *Y. enterocolitica* v LB bujonu (Valentine a kol. 2005). Protože pro mnohé bakteriální druhy je tato technika teprve ve stadiu optimalizačních procesů, databáze jsou většinou placeny. Navíc proteinové databáze nejsou úplně v případě druhů, u kterých byla provedena pouze částečná analýza genomu.

- nízké detekční limity, až  $10^{-15}$  mol
- Analýzu je tedy při zamražení vzorku možno provést nezávisle na datu kultivace. I zaschlá kapka vzorku ve směsi s MALDI matricí skýtá možnost analýzu opakovat; vzorek je v této podobě stabilní několik dní. Obě situace jsou výhodné pro možnosti srovnávacích analýz. Toho je možno využít např. pro krátkodobé srovnávací studie

Podle mnohých studií je 90 % signálů hmotnostního spektra v rozmezí 500-10 000 Da. Markery o hmotnosti menší než 500 Da nemohou být spolehlivě odlišeny od iontů matrice. K typizaci kmene může přispět detekce charakteristických proteinů. Biomarkerové proteiny mohou být identifikovány sekvenováním či měřením přesné hmotnosti peptidů získaných enzymatickým štěpením

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

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

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

**MALDI MS analýza vzorku bakteriální kultury:**