

Studenti se dostaví v 8:30 do 1. NP pavilonu A26 (Kampus Bohunice).

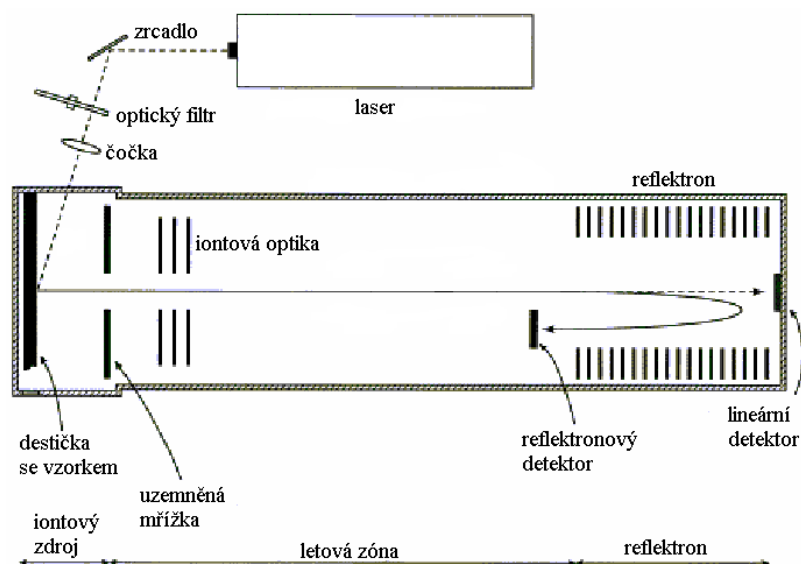
MALDI-TOF MS

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpceí a ionizací za účasti matrice (MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization) je využívána pro určení molekulové hmotnosti a identifikaci biomolekul, v současnosti je pak zaváděna v klinických laboratořích pro identifikaci bakterií. Zkoumané látky jsou před analýzou smíchány s nadbytkem tzv. matrice, kterou obvykle představují deriváty aromatických karboxylových kyselin (Obr. 1).



Obr. 1: Často používané MALDI matrice – kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB) a kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA)

Směs je poté nanášena na vzorkovací destičku a po zaschnutí je na ni v iontovém zdroji aplikován laserový puls. Jeho energii matrice absorbuje a následně předá analyzovaným molekulám, které se uvolní do plynné fáze v podobě molekulových iontů, tzn. nedochází k jejich fragmentaci. Vzniklé ionty jsou odpuzeny elektrickým polem a analyzovány v průletovém analyzátoru (TOF – Time-of-Flight, Obr. 2).



Obr. 2: Schéma přístroje MALDI-TOF MS

Úkoly:

I. Určení molekulové hmotnosti proteinu

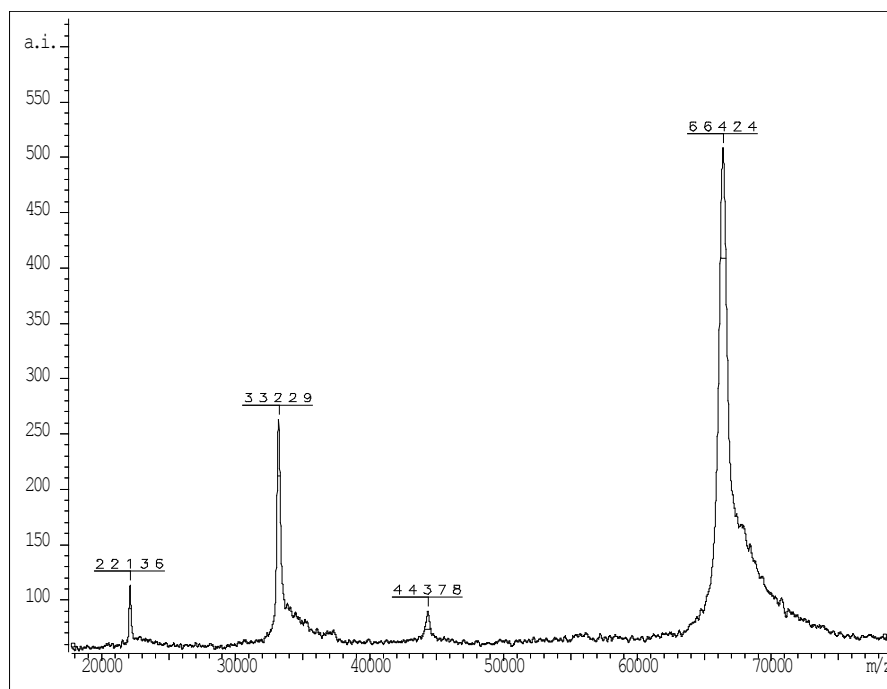
II. Identifikace proteinu peptidovým mapováním

III. Určení sekvence proteolytického peptidu na základě MALDI-MS/MS analýzy

IV. Identifikace bakteriálního kmene

I. Určení molekulové hmotnosti proteinu

Připravte cca 100 μl roztoku DHB (20 mg/ml ve směsi voda/kyselina trifluoroctová/acetonitril, 79:1:20 v/v). Smíchejte v mikrozkuhavce 0,6 μl roztoku proteinu s 2,4 μl roztoku DHB a 0,6 μl této směsi naneste na zvolenou pozici vzorkovací desky. Po zaschnutí směsi při laboratorní teplotě proveďte MALDI-TOF MS analýzu v lineárním pozitivním módu. Na základě sedmi opakovaných analýz vypočítejte přesnost určení molekulové hmotnosti proteinu. Interpretujte MALDI-TOF hmotnostní spektrum.



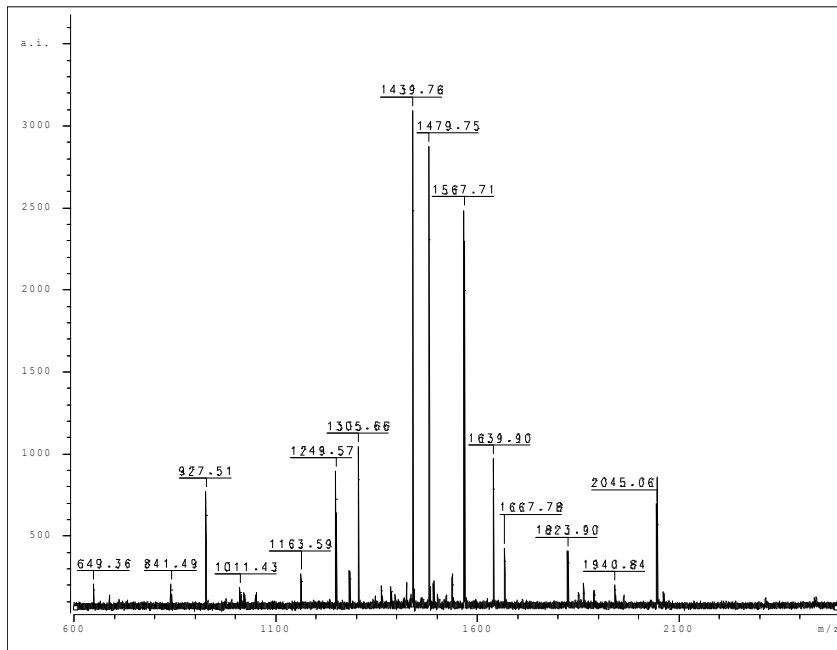
Obr. 3: MALDI-TOF hmotnostní spektrum hovězího albuminu

II. Identifikace proteinu peptidovým mapováním

Připravte v mikrozkuhavce 10 μl roztoku obsahujícího 1 μg proteinu (zásobní roztok 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 0,1 μg trypsinu (zásobní roztok 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$) a 25 mM hydrogenuhličitan amonný (zásobní roztok 0,5 M). Mikrozkuhavku umístěte do termomixéru a proteolýzu nechte probíhat po dobu 2 hodin při 40 $^{\circ}\text{C}$. Reakci ukončete přidáním 1 μl 1% kyseliny mravenčí.

Připravte 100 μl nasyceného roztoku matrice HCCA ve směsi 5% kyseliny mravenčí a acetonitrilu (1:1, v/v). Smíchejte v mikrozkuhavce 0,6 μl roztoku proteinu s 2,4 μl roztoku HCCA a 0,6 μl této směsi naneste na zvolenou pozici vzorkovací desky. Po zaschnutí směsi při laboratorní teplotě proveďte MALDI-TOF MS analýzu v reflektorném pozitivním

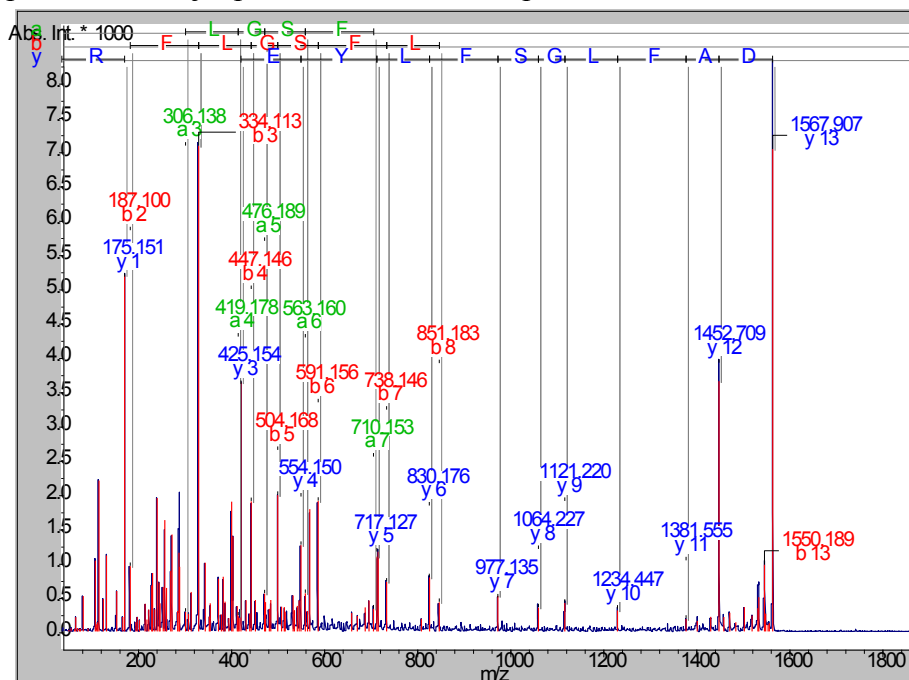
módu. Na základě molekulových hmotností získaných proteolytických štěpů proveďte identifikaci proteinu peptidovým mapováním.



Obr. 4: MALDI-TOF hmotnostní spektrum směsi tryptických štěpů hovězího albuminu

III. Určení sekvence proteolytického peptidu na základě MALDI-MS/MS analýzy

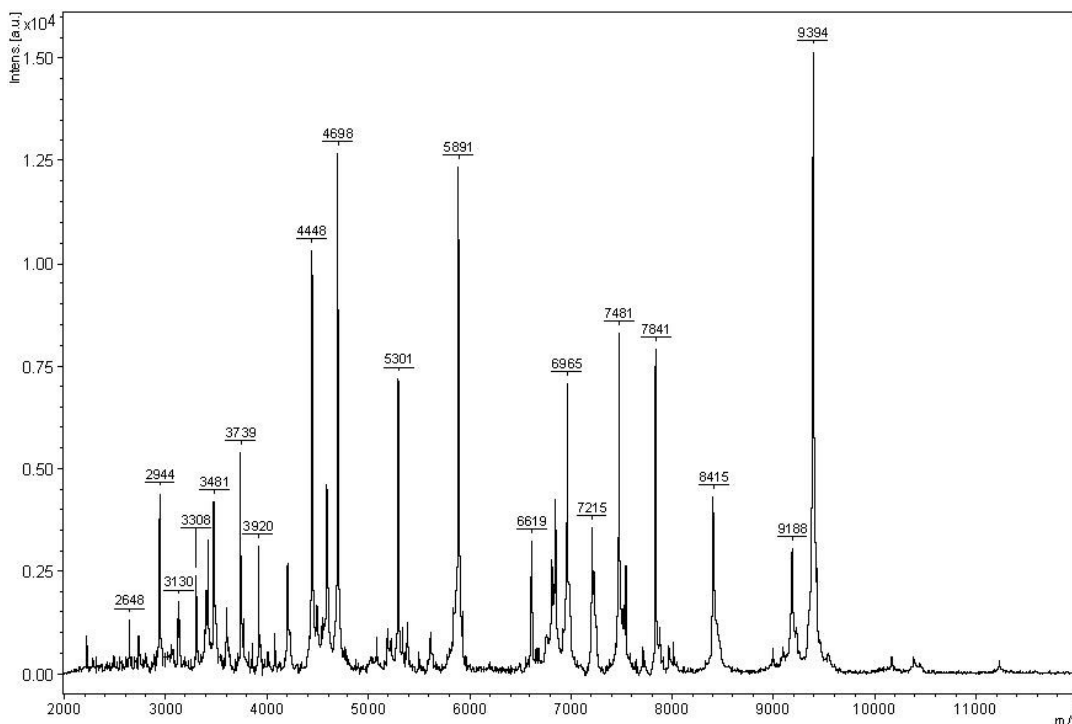
Vybraný proteolytický peptid podrobte MALDI-MS/MS analýze. Pokuste se na základě rozdílů hmotností MS/MS fragmentů odhadnout část sekvence aminokyselin. Peptid poté identifikujte pomocí databázového prohledávání.



Obr. 5: MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrum tryptického štěpu hovězího albuminu (sekvence DAFLGSFLYEYSR).

IV. Identifikace bakteriálního kmene

Vzorek sterilizovaných bakterií suspendujte v 100 μ l směsi 70% kyseliny mravenčí a acetonitrilu (1:1, v/v), 30 s míchejte na vortexu a pak 2 minuty centrifugujte při 13000 ot./min. Supernatant převed'te do mikrozkušavky, na tři zvolené pozice vzorkovací destičky pak naneste po 0,3 μ l. Po zaschnutí při laboratorní teplotě převrstvěte 0,3 μ l roztoku HCCA (roztok z části II) a po opětovném zaschnutí proved'te MALDI-TOF MS analýzu v lineárním pozitivním módu. Srovnáním získaného MALDI-TOF hmotnostního spektra s databází bakteriálních MALDI-TOF MS spekter identifikujte kmen na úrovni rodu a druhu. Na základě vizuálního porovnání a klastrové analýzy pak zhodno'te vzájemnou podobnost MALDI-TOF hmotnostních spekter analyzovaných kmenů.



Obr. 6: MALDI-TOF hmotnostní spektrum extraktu kmene *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7089.