

## A MALDI-TOF MS gyakorlat leírása

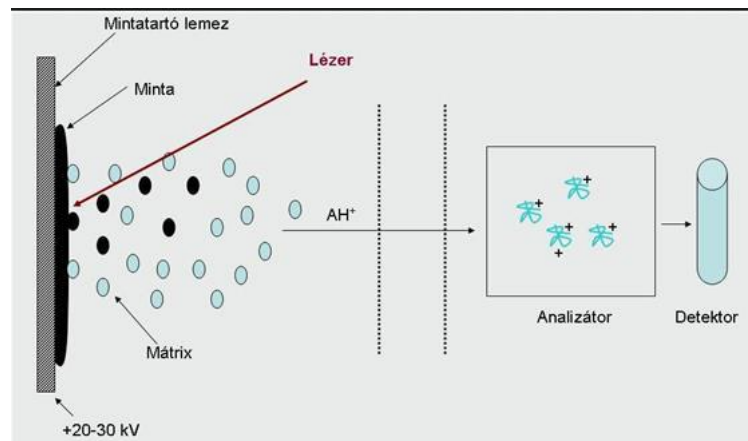
A tömegspektrometria (MS) egy széleskörűen alkalmazott műszeres analitikai technika, amelynek alapelveire számos műszer épül. Az utóbbi időben hatalmas fejlődésen ment keresztül és egyre szélesedő területet fed le. Kialakulása J. J. Thomson nevéhez fűződik, aki megfigyelte, hogy ionizációt követően az elektromos térben felgyorsított pozitív töltésű gázionok mágneses térben eltérő röppályán haladnak, aminek következtében különböző helyen csapódnak be a detektorba, lehetővé téve így a megfelelő energiájú elektronnyalábbal bombázott mintából keletkező ionok molekulatömeg/töltés ( $m/z$ ) alapján történő szortírozását.

A tömegmérésen alapuló fehérjevizsgálati módszer feltétele egy megfelelő ionizációs eljárás, amely során az analizálandó molekula ionizálódik és bomlás nélkül gázfázisba jut és a keletkezett ionok analizátor alkalmazásával elkülöníthetők. Az első tömegspektrométerek elektronsugárral ionizálták a vákuumba párologtatott mintákat, azonban ez a módszer csak a kis molekulatömegű, nem poláros, illékony molekulák (pl. zsírsavak, metabolitok) analizálására szolgált. A nagyobb molekulatömegű és poláris molekulák, hőérzékeny anyagok (pl. biomolekulák, biopolimerek) analizését a molekula bomlása miatt még nem tették lehetővé.

Az újabb technikák kifejlesztését követően a biopolimerek szempontjából a legnagyobb áttörést két új ionizációs eljárás kifejlesztése jelentette az 1980-as évek végén. Az egyik, a mátrix által segített lézerdesorpciós ionizáció (MALDI), a másik az elektroporlasztásos ionizáció (electrospray ionization, ESI). Mindkét újítást Nobel-díjjal jutalmazták 2002-ben. A MALDI és az ESI kis- és nagymolekulák ionizációjára egyaránt alkalmas eljárások és napjainkban ezt a két kíméletes, úgynevezett „soft” ionizációs technikát alkalmazzák proteinek és peptidek analízise során.

Az ionizációs módszerekkel párhuzamosan az analizátorok is nagy fejlődésen mentek keresztül, különösen a gyors adatgyűjtést lehetővé tevő korszerű számítógépeknek és a precízen és pontosan indítható óráknak köszönhetően. A MALDI ionizációs technikát leggyakrabban repülési időn alapuló analizátorral (time of flight, TOF) szerelik fel, melynek mintavételi gyakorisága a legnagyobb felbontásnál 0,5 nsec. Ez a típusú analizátor repülési idő szerint különíti el a különböző tömeg/töltés hányadossal bíró részecskéket. A nagyobb tömegű ionok lassabban repülnek, ezáltal később érkeznek meg a detektorhoz, míg a könnyebb tömegű ionok gyorsabbak. Ezen típusú ionizátor és analizátor kombinálása azért is célszerű, mert maga a gerjesztő lézersugár indítja az órát, így könnyebb és pontosabb a repülési idő alapú mérés.

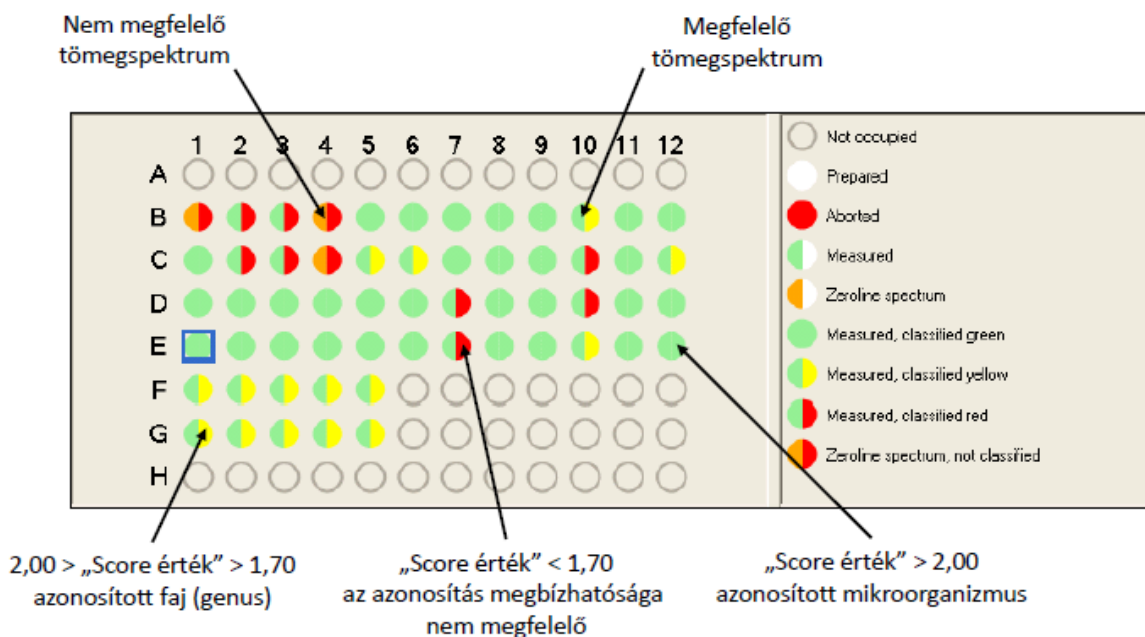
A MALDI-TOF MS módszer alkalmas nagy molekulatömegű anyagok, például fehérjék, szénhidrátok analizálására. A gerjesztő energia a MALDI esetében az ultraibolya lézer fény (337 nm), mellyel besugározzák a mintát. A mintához szerves segédanyagot, ún. mátrixot adnak, amely elnyeli a lézernyalábok energiáját, ezáltal a minta nem disszociálódik. A mátrix anyaga általában alfa-ciano-4-hidroxi-fahéjsav (CHCA), de lehet például 2,5-dihidroxibenzoésav (DHB), vagy szinapinsav (SA) is. A lézernyaláb a mátrixot gerjeszti, amely továbbadja a gerjesztést a fehérjének, annak roncsolása, bomlása nélkül („soft” ionizáció). Az ionizációt követően az ionok felszabadulnak a mintából és gázhalmazállapotúvá válnak. A nagy térerejű (60-100kV) gyorsító feszültség hatására deszorpció következik be, azaz az ionok kikerülnek a mátrixból. Az 1. ábra szemlélteti MALDI-TOF MS működési elvét.



1. ábra: MALDI-TOF MS működési elve

A MALDI-TOF MS készülék felhasználása széles körben elterjedt. A kémiai iparban alkalmazzák többek között szénhidrogének meghatározására, az élelmiszeriparban a csomagolóanyagokban lévő szennyezőanyagok kimutatására, a gyógyszeriparban fehérje meghatározásra, stb. Biológiai alkalmazása is egyre finomodik. Kezdetben csupán a baktériumok azonosítására használták, manapság egyre jelennek meg MALDI-TOF mérések alapján kapott eredmények. Ez a technika alkalmas lehet faj alatti kategóriák elkülönítésére, szubtípusok meghatározására, epidemiológiai és leszármazástani vizsgálatokra, antibiotikum rezisztencia vizsgálatokra, valamint gombák és vírusok fehérjéinek tanulmányozására is. A kitenyésztett baktériumok és gombák MALDI-TOF MS készülékkel történő azonosítása a riboszómális és egyéb, citoszol fehérjék analízisen alapul. Minden mikroorganizmusnak van egy ún. „fehérje ujjlenyomata”, vagyis rá jellemző fehérje profilja. A MALDI technikával intakt baktérium sejtek vizsgálatára van lehetőség.

A készülék ára és szervizelése meglehetősen drága, azonban a minták előkészítése a többi fajmeghatározási módszerhez (biokémia, zsírsavprofil, molekuláris módszerek) képest gyors, egyszerű és olcsó, azonban függ bizonyos tenyésztési paraméterektől (pl. a tenyészet kora), illetve az alkalmazott adatbázisban levő referenciaspektrumok számától. A minta előkészítése során a tiszta baktériumtenyészetből rendkívül kis mennyiséget felkenünk a mintatartó lemezek spotjaira, majd 1-1 µl folyékony szerves mátrixot (CHCA + trifluor-ecetsav + acetonitril) pipettázunk rá. A mátrix jelentősége abban rejlik, hogy száradás során mikrokristályos szerkezetet képez a mintával, majd a mérés során közvetíti a fehérjék ionizációjához szükséges energiát, miközben meg is védi azt az esetleges fragmentációtól. Megelőző fehérje-extrakciós lépésekre pl. hangyasavas, acetonitriles kezelésre csak tokkal, vagy vastagabb sejtfallal rendelkező baktériumok és gombák esetében van szükség, azonban a kezelés hatására a Gram-negatív szervezetekről is pontosabb eredményt kaphatunk. Az izolátumok azonosítása profil-alapú, a mért spektrum-ujjlenyomat, illetve az adatbázisban lévő spektrumok proteomikai összehasonlításával, így az azonosság számszerűsítésével szoftveresen történik. Az adatbázis jelenleg elsődlegesen a humán patogén kórokozókat foglalja magába. Az általunk használt Bruker MALDI-TOF MS könyvtárban kb. 5000 faj spektruma található. Az identifikáció során a szoftver pontozza az egyezést, ami alapján elkülöníthető a nagy valószínűségű fajszerű azonosítás, a nemzetség szintjén biztos és valószínű azonosítás, valamint a nem megbízható eredmény (2. ábra).



2. ábra MALDI-TOF MS szoftveres kiértékelése MALDI Biotyper Real Time Classification szoftverrel

score érték	értékelés*
<1,7	nincs azonosítás
1,7-2,0	valószínű nemzetség szintű azonosítás
2,0-2,3	nagyon valószínű nemzetség szintű, valószínű faj szintű azonosítás
>2,3	nagyon valószínű faj szintű azonosítás

\*A score érték értékelésében az egyes rendszertani kategóriák között jelentős különbségek lehetnek, az értékelés függ az alkalmazott könyvtártól is.

A baktériumok mindenhol előforduló, mikrométeres nagyságú, változatos megjelenésű és anyagcseréjű szervezetek, amelyek körülhatárolt sejtmaggal nem rendelkeznek. Fehérjéik vizsgálatához minden esetben az adott baktérium tiszta tenyészetéből kell kiindulni. Egyes baktériumok *in vitro* speciális tenyésztési körülményeket igényelnek. A különböző környezeti mintákból tiszta baktériumtenyészetek izolálása az adott organizmus tulajdonságaitól függően időt (1 naptól akár több hétig) vesz igénybe. Ezért a gyakorlaton előkészített tenyészetekkel fognak dolgozni a diákok, de betekintést nyerhetnek egy vízmikrobiológiai labor mindennapjaiba, és a mintaelőkészítés különböző fázisait (szűrés, leoltás, tenyésztés) is kipróbálhatják. Az előkészített baktériumtenyészeteket a MALDI-TOF MS készülékkel és hagyományos biokémiai próbákkal is identifikáljuk, így lehetőség nyílik a különböző módszerek összehasonlítására is.

A MALDI-TOF MS gyakorlat helyszíne az Országos Közegészségügyi Központ Országos Környezetegészségügyi Igazgatóságának „A” épületének (1097 Budapest, Albert Flórián út 2-6.) negyedik emeletén található vízmikrobiológiai laboratórium.

A gyakorlatokat a Vízhigiénés Osztály munkatársai, Róka Eszter és dr. Khayer Bernadett vezetik.

Budapest, 2017. március 21.

Készítette:

dr. Khayer Bernadett  
Róka Eszter