

УДК 579.8.06

ПРИМЕНЕНИЕ МАЛДИ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2013 г. Е.А. Демидов, К.В. Старостин, В.М. Попик, С.Е. Пельтек

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: scratch_nsu@ngs.ru

Поступила в редакцию 15 августа 2013 г. Принята к публикации 5 сентября 2013 г.

В последнее десятилетие наряду с классическими и молекулярно-биологическими методами идентификации микроорганизмов, все чаще применяется метод идентификации микроорганизмов по их белковым профилям, или прямое белковое профилирование. Данный метод не уступает по таким показателям, как точность и специфичность идентификации, однако его выгодно отличают быстрота проведения и более низкая себестоимость анализов. В данном обзоре приведены современные представления о возможностях данного метода, а также дано сравнение с используемыми методами идентификации микроорганизмов.

Ключевые слова: МАЛДИ, прямое белковое профилирование, идентификация микроорганизмов.

ВВЕДЕНИЕ

Быстрая и точная идентификация микроорганизмов является востребованной задачей во многих приложениях человеческой деятельности как научного, так и прикладного характера. Наибольшее значение среди них представляет клиническая диагностика, так как точность и скорость идентификации патогена могут сыграть решающую роль в успешности лечения. Другими важными областями являются санитарный и эпидемиологический контроль, противодействие угрозам биотерроризма, экологические и микробиологические исследования.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Традиционно для идентификации микроорганизмов использовались фенотипические методы, основанные на анализе физиологических и морфологических характеристик – размер и форма микроорганизмов, условия роста, способность к спорообразованию, а также биохимические тесты – окраска по Грамму, способность спе-

цифично расщеплять определенные субстраты или устойчивость к определенным компонентам среды. Исследование физиологических и морфологических характеристик не позволяет достичь высокого таксономического разрешения и в настоящее время выполняет лишь вспомогательную функцию, а для точной идентификации на видовом и внутривидовом уровнях используются тест-системы. На данный момент создано и коммерчески доступно множество таких тест-систем, позволяющих с высокой точностью идентифицировать определенные таксономические группы (O'Hara, 2005). Отдельно можно отметить иммунологические методы анализа, основанные на антителах, специфически связывающихся с мембранными белками клеток микроорганизмов, что позволяет с помощью флюоресцентных меток идентифицировать отдельные виды и так называемые серотипы. К недостаткам фенотипических методов можно отнести тот момент, что отдельные тест-системы и наборы антител специализированы для идентификации определенных таксономических групп микроорганизмов и не предназначены для широкого скрининга образцов. Помимо

этого многие биохимические процедуры могут занимать длительное время, что очень критично в клинической диагностике и многих других областях применения.

ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Генотипические методы основаны на анализе структуры ДНК, реализованной в виде гибридизации ДНК, секвенировании ДНК, либо анализе фингерпринта, полученного в результате сайт-специфичной рестрикции ДНК. Пионерами в этой области были ДНК-ДНК гибридизация (Notermans, Wernars, 1990) и гель-электрофорез в пульсирующем поле PFGE (Heinzen *et al.*, 1990), в течение долгого времени остававшиеся «золотыми стандартами» при идентификации микроорганизмов. Прорывом в области генотипических методов стала разработка эффективных способов секвенирования ДНК, основанных на полимеразно-цепной реакции. Ввиду того что секвенирование целого генома до сих пор остается дорогой и времязатратной процедурой, при идентификации микроорганизмов используются сиквенсы отдельных участков ДНК. В основном это крайне консервативные последовательности, как, например, гены домашнего хозяйства. За последние 15 лет большую популярность завоевал метод секвенирования гена 16s рРНК. В ряде работ было показано преимущество этого метода над классическими фенотипическими методами (Becker *et al.*, 2004; Cloud *et al.*, 2004; Bosshard *et al.*, 2006). Также значимым преимуществом методов, основанных на ПЦР, является способность работать с микроколичествами исследуемого материала, что позволяет идентифицировать некультивируемые микроорганизмы. Другим набирающим все большую популярность является метод MLST, основанный на секвенировании одновременно нескольких генов домашнего хозяйства, что позволяет увеличить точность идентификации и дискриминационную способность метода (Maiden, 2006; Turner, Feil, 2007).

ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Еще одним подходом являются хемотаксономические методы, основанные на исследо-

вании биохимического состава клетки. Методы заключаются в определении биохимических маркеров, имеющих определенную таксономическую специфичность. Еще в начале 70-х годов прошлого века проводились успешные опыты по идентификации микроорганизмов с помощью пиролитической газо-жидкостной хроматографии (Reiner *et al.*, 1972). В приведенном исследовании на примере *Salmonella* spp. было показано наличие в пирохроматографических спектрах характеристичных пиков, позволяющих идентифицировать отдельные серотипы. В 1975 г. К. Фенслау была предложена идея использовать масс-спектрометрию для хемотаксономических исследований (Anhalt, Fenselau, 1975). Масс-спектры, полученные из хлороформ-метанольных экстрактов лиофилизированных клеток, имели достоверные различия для представителей различных видов бактерий. Так как масс-спектрометрические методы отличаются высокой скоростью и точностью анализа, дальнейшее развитие хемотаксономии было связано преимущественно с ними.

МЕТОД МАЛДИ

Однако действительно большой прорыв в идентификации микроорганизмов сделало появление в арсенале масс-спектрометрии «мягкого» способа ионизации молекул исследуемого вещества (Despeyroux *et al.*, 1996; Krishnamurthy *et al.*, 1996), такого как матрично-ассоциированная десорбция/ионизация (МАЛДИ). В комплексе с времяпролетной масс-спектрометрией это дало возможность проводить анализ сложных биоорганических молекул, в частности тяжелых, труднолетучих молекул нуклеиновых кислот и белков.

Метод МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии основан на десорбции и ионизации исследуемого вещества с помощью лазерного излучения в присутствии вспомогательного вещества – матрицы с последующим разделением ионов во времяпролетном масс-анализаторе. Под воздействием лазерных импульсов матрица, сокристаллизованная с исследуемым веществом, активно поглощает излучение лазера, что приводит к ее десорбции (рис. 1). Переходя в газовую фазу, матрица увлекает за собой молекулы

исследуемого вещества, а также способствует их ионизации с образованием преимущественно однозарядных ионов (Karas *et al.*, 1987). Метод позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ белковой фракции микробной клетки (прямое белковое профилирование), т. е. без фракционирования и очистки отдельных белков, и получать уникальные для данного вида масс-спектры (рис. 2) с высокой точностью и разрешением, характеризующие исследуемый объект по типу «отпечатков пальцев» (Ben, van Baar, 2000).

Одним из подходов для идентификации отдельных микроорганизмов методами МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии является поиск по существующим базам белковых профилей микроорганизмов. Для идентификации необходима база данных характеристичных (эталонных) спектров, представляющих собой суперспектры, полученные усреднением серии



Рис. 1. Схема процесса ионизации в условиях МАЛДИ.

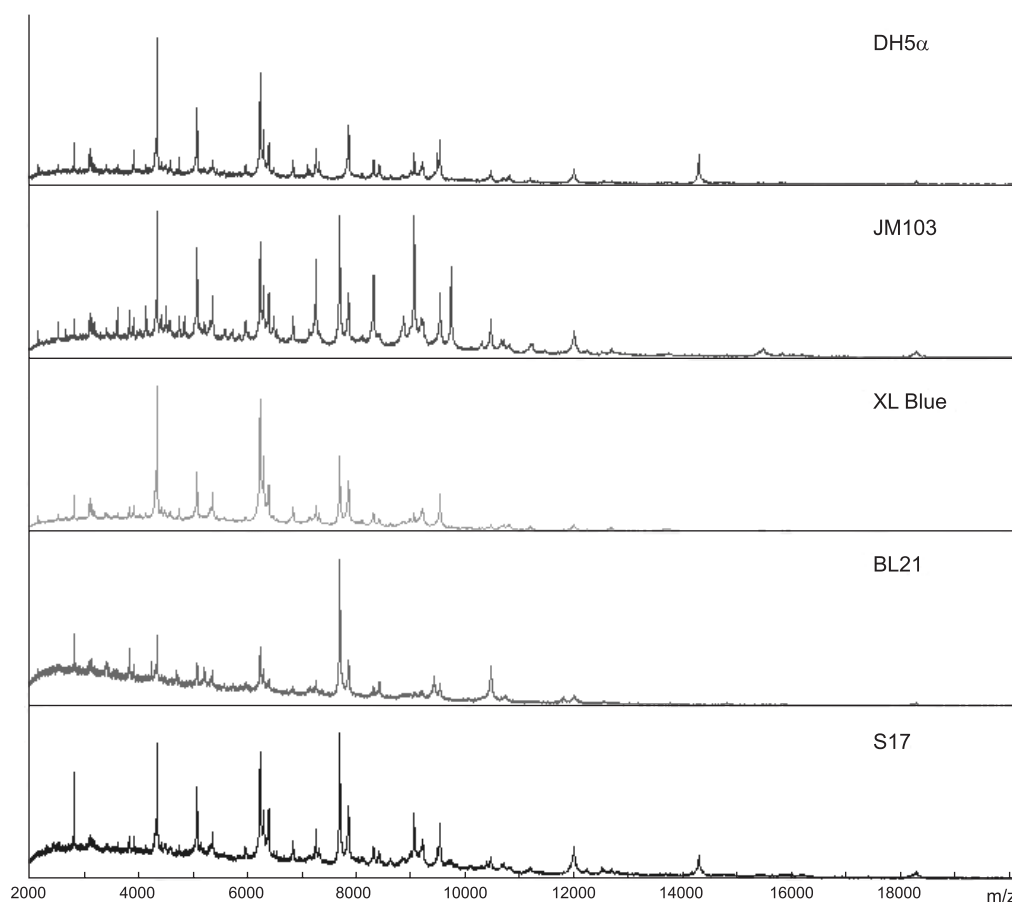


Рис. 2. Масс-спектры различных штаммов *E. coli*.

По оси абсцисс – отношение масса/заряд (m/z) .

единичных спектров, что позволяет добиться большей точности и воспроизводимости анализа. В рамках процедуры идентификации происходит попарное сравнение пиков в спектре исследуемого образца с пиками эталонных суперспектров, находящихся в базе данных. Каждому сравнению с суперспектром в базе данных присваивается численный рейтинг, вычисленный на основании количества совпадений. Идентификация микроорганизмов происходит по наилучшему совпадению (Sandrin *et al.*, 2013), при этом не происходит идентификация конкретных белков.

Однако, несмотря на широкие потенциальные возможности использования этого подхода для идентификации и типирования микроорганизмов, на данный момент не существует единого протокола для пробоподготовки и идентификации. При данном подходе пробоподготовка может представлять собой простое нанесение клеточной культуры на подложку масс-спектрометра в смеси с матрицей. Однако чаще всего прибегают к различным методам лизиса клеток для получения белкового экстракта (Šedo *et al.*, 2011). Также остается открытым вопрос о воспроизводимости белковых профилей отдельных микроорганизмов в зависимости от условий культивирования и стадии роста.

Данный подход к идентификации получил сейчас наибольшее распространение, поскольку позволяет быстро и надежно идентифицировать микроорганизмы, для которых получены суперспектры белковых профилей. На сегодняшний день различными фирмами выпускаются масс-спектрометры, предназначенные для решения задач идентификации микроорганизмов. Существуют также коммерчески доступные базы данных различных микроорганизмов. Все это привело к тому, что данная методика активно применяется в клинической диагностике.

Тем не менее существует биоинформационный метод бактериального профилирования. Этот метод включает в себя идентификацию отдельных пиков в белковых профилях бактерий при помощи баз данных с геномными последовательностями. Данный метод не требует создания специализированной базы данных и такой жесткой стандартизации методик культивирования и пробоподготовки (Fenselau *et al.*, 2007), однако для его успешной

реализации необходимы масс-спектрометры, обеспечивающие сверхвысокое разрешение, что увеличивает время анализа и стоимость оборудования.

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ И СРАВНЕНИЕ С ДРУГИМИ МЕТОДАМИ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Для идентификации микроорганизмов обычно используются спектры в диапазоне масс 2–20 кДа. Анализ масс-спектров *E. coli* в диапазоне 2–20 кДа показал, что из 2000 белков, предсказанных на основании данных секвенированного генома *E. coli*, в спектрах присутствует только 30 (Ryzhov, Fenselau, 2001). Около половины пиков были отнесены к рибосомальным белкам, оставшаяся часть – к ДНК-связывающим белкам и белкам холодового шока. Рибосомальные белки относятся к белкам домашнего хозяйства и вследствие этого являются достаточно консервативными, что обеспечивает их таксономическую специфичность. Помимо этого рибосомальные белки в большом количестве присутствуют в цитоплазме клеток – до половины массы растущей клетки, а их набор остается неизменным вне зависимости от внешних условий и стадии роста, что и обеспечивает воспроизводимость масс-спектров. Исследования внутри- и межлабораторной воспроизводимости показали высокую надежность метода. В работе S. Barbuddhe с соавт. (2008) было показано на примере видов рода *Listeria*, что при использовании трех различных приборов фирмы «Bruker Daltonics» в двух разных лабораториях не наблюдается существенных различий в полученных спектрах для представителей этого рода. В работе A. Mellmann с соавт. (2008) были исследованы 10 случайно выбранных из коллекции штаммов на трех различных приборах. Было показано, что результаты идентификации не зависят от используемого прибора и демонстрируют схожий рейтинг точности идентификации при использовании программы Biotyper. Визуальное сравнение спектров, полученных для каждого отдельного штамма на всех трех приборах, также не выявляет значительных отличий. В 2009 г. было проведено крупное исследование межлабораторной воспроизводимости с участием 8 лабораторий из различных

стран мира (Mellmann *et al.*, 2009). Используя оборудование и программное обеспечение фирмы «Bruker Daltonics», каждая лаборатория проводила идентификацию 60 образцов с помощью базы данных, состоящей из 2800 штаммов. В результате идентификации 97,29 % образцов были определены до вида и только 2,5 % – до рода. Из всех образцов 98,75 % были определены верно. Данное исследование показывает, что при использовании стандартных протоколов и единой базы данных метод идентификации с помощью МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии обеспечивает высокую точность и воспроизводимость.

Важным вопросом является зависимость результатов идентификации от условий культивирования микробиологических культур, таких как среда и время роста. При исследовании спектров культур *B. subtilis*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, каждая из которых выращена на 4 разных средах: минимальной среде М9, триптическом соевом бульоне TSB, LB и кровяном агаре, было показано что в зависимости от выбора среды состав пиков может меняться, но при этом также имеется набор пиков, присутствующих в спектрах вне зависимости от этого выбора (Valentine *et al.*, 2005). В работе Ruelle с соавт. (2004) также указано на изменение состава пиков в спектре в зависимости от выбора среды. Также в данной работе было проведено исследование влияния времени инкубации на полученные спектры. Было показано на примере *E. coli*, что при длительном времени культивирования происходит исчезновение части пиков из спектра. Однако, как показано в данных работах, возникающие различия в спектрах при разных условиях культивации культур не мешают проведению достоверной идентификации.

Метод идентификации микроорганизмов с помощью МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии сильно выигрывает у классических методов идентификации по время- и трудозатратности анализа и при этом не уступает им в точности. В нескольких работах было показано преимущество МАЛДИ идентификации над секвенированием гена 16S рРНК и фенотипическими тестами – одними из наиболее распространенных методов при идентификации микроорганизмов. В работе К. Böhme с соавт. (2013) провели сравнение этих двух методов на

50 штаммах, представляющих собой патогены, выделенные из морских пищевых продуктов. Идентификация с помощью секвенирования гена 16S рРНК позволила определить 50 % штаммов до видового уровня, в то время как с помощью МАЛДИ удалось идентифицировать 76 %. Из 25 штаммов, для которых не удалось получить видовую идентификацию с помощью секвенирования, 18 были идентифицированы с помощью МАЛДИ. Для сравнения, только 5 штаммов из 12 неидентифицированных до вида с помощью МАЛДИ удалось определить с помощью секвенирования гена 16S рРНК. Д. Диксоном и коллегами было проведено исследование результатов идентификации спор *B. pumilus* с помощью фенотипического метода, основанного на «Biolog identification system», секвенировании генов 16S рРНК и *gyrB*, ДНК-ДНК гибридизации и МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии (Dickinson *et al.*, 2004). С помощью метода «Biolog identification system» было определено только 3 штамма из 18 как *B. pumilus*. 8 штаммов были некорректно определены как *B. subtilis*. Оставшиеся 7 штаммов не имели совпадений с базой данных этой системы. Другие 4 метода идентифицировали все штаммы, при этом МАЛДИ времяпролетная масс-спектрометрия, секвенирование гена *gyrB* и ДНК-ДНК гибридизация продемонстрировали схожую дискриминационную способность, заметно превосходя метод секвенирования гена 16S рРНК. Более высокая дискриминационная способность МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии по сравнению с секвенированием гена 16S рРНК была также показана в работе Mellmann с соавт. (2008) на примере комплекса *B. ceracia*, реклассифицированного на основании данных полиморфизма гена *recA*. Метод секвенирования гена 16S рРНК в отличие от МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии показал неспособность дифференцировать штаммы в рамках этого комплекса. Также в данной работе было проведено сравнение результатов идентификации 80 клинически значимых штаммов с помощью масс-спектрометрии, позволившей определить 82,5 % изолятов до видового уровня и 95,2 % – до рода, с фенотипическими тестами API 20NE и Vitek 2, определившими соответственно 61 и 54 % изолятов.

Особой важностью обладает вопрос внутривидовой идентификации, позволяющей идентифицировать отдельные штаммы, имеющие клиническое и прикладное значение. Помимо приведенных выше работ (Dickinson *et al.*, 2004; Mellmann *et al.*, 2008) успешная дифференциация на внутривидовом уровне показана в работе Ghyselinck с соавт. (2011). Метод МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии продемонстрировал высокое таксономическое разрешение, позволяющее различать на внутривидовом уровне представителей родов *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. В работе S. Barbuddhe с соавт. (2008) масс-спектрометрический анализ корректно объединил серотипы *Listeria monocytogenes* в три линии в соответствии с данными PFGE (pulsed-field gel-electrophoresis). Seibold с соавт. (2010) удалось идентифицировать 45 изолятов *Francisella tularensis* на уровне штаммов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные работы показывают, что метод идентификации с помощью МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии не уступает большинству известных методов по точности идентификации и дискриминационной способности, а некоторые из них заметно превосходит. Метод обладает большим потенциалом для идентификации на внутривидовом уровне, который будет реализовываться с усовершенствованием приборной базы, появлением более представленных библиотек эталонных суперспектров и сиквенсов бактериальных геномов.

Работа была выполнена в рамках Государственного контракта № 14.512.11.0050 «Создание методов метаболической инженерии термофильных микроорганизмов для получения штаммов-продуцентов молочной кислоты».

ЛИТЕРАТУРА

- Anhalt J.P., Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry // *Analyt. Chem.* 1975. V. 500. No. 2. P. 219–225.
- Barbuddhe S.B., Maier T., Schwarz G. *et al.* Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. No. 17. P. 5402–5407.
- Becker K., Harmsen D., Mellmann A. *et al.* Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species // *J. Clin. Microbiol.* 2004. V. 42. No. 11. P. 4988–4995.
- Ben L.M., van Baar. Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry // *FEMS Microbiol. Rev.* 2000. V. 24. No. 2. P. 193–219.
- Böhme K., Fernández-No I.C., Pazos M. *et al.* Identification and classification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria: 16S rRNA sequencing versus MALDI-TOF MS fingerprinting // *Electrophoresis.* 2013. V. 34. No. 6. P. 877–887.
- Bosshard P.P., Zbinden R., Abels S. *et al.* 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting gram-negative bacteria in the clinical laboratory // *J. Clin. Microbiol.* 2006. V. 44. No. 4. P. 1359–1366.
- Cloud J.L., Conville P.S., Croft A. *et al.* Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of *Nocardia* species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database // *J. Clin. Microbiol.* 2004. V. 42. No. 2. P. 578–584.
- Despeyroux D., Phillpotts R., Watts P. Electrospray mass spectrometry for detection and characterization of purified cricket paralysis virus (CrPV) // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996. V. 10. No. 8. P. 937–941.
- Dickinson D.N., La Duc M.T., Satomi M. *et al.* MALDI-TOFMS compared with other polyphasic taxonomy approaches for the identification and classification of *Bacillus pumilus* spores // *J. Microbiol. Meth.* 2004. V. 58. No. 1. P. 1–12.
- Fenselau C., Russell S., Swatkoski S., Edwards N. Proteomic strategies for rapid characterization of micro-organisms // *Eur. J. Mass Spectrom.* 2007. V. 13. No. 1. P. 35–39.
- Ghyselinck J., Van Hoorde K., Hoste B. *et al.* Evaluation of MALDI-TOF MS as a tool for high-throughput dereplication // *J. Microbiol. Meth.* 2011. V. 86. No. 3. P. 327–336.
- Heinzen R., Stiegler G.L., Whiting L.L. *et al.* Use of pulsed field gel electrophoresis to differentiate *Coxiella burnetii* strains // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990. V. 590. P. 504–513.
- Karas M., Bachmann D., Bahr D., Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of nonvolatile compounds // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1987. V. 78. P. 53–68.
- Krishnamurthy T., Ross P.L., Rajamani U. Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996. V. 10. No. 8. P. 883–888.
- Maiden M.C. Multilocus sequence typing of bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* 2006. V. 60. P. 561–588.
- Mellmann A., Bimet F., Bizet C. *et al.* High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria // *J. Clin. Microbiol.* 2009. V. 47. No. 11. P. 3732–3734.
- Mellmann A., Cloud J., Maier T. *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing

- for species identification of nonfermenting bacteria // J. Clin. Microbiol. 2008. V. 46. No. 6. P. 1946–1954.
- Notermans S., Wernars K. Evaluation and interpretation of data obtained with immunoassays and DNA-DNA hybridization techniques // Intern. J. Food Microbiol. 1990. V. 11. No. 1. P. 35–49.
- O'Hara C. Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic gram-negative bacilli // Clin. Microbiol. Rev. 2005. V. 18. No. 1. P. 147–162.
- Reiner E., Hicks J.J., Ball M.M., Martin W.J. Rapid characterization of salmonella organisms by means of pyrolysis-gas-liquid chromatography // Analyt. Chem. 1972. V. 44. No. 6. P. 1058–1061.
- Ruelle V., El Moualij B., Zorzi W. *et al.* Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2004. V. 18. No. 18. P. 2013–2019.
- Ryzhov V., Fenselau C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells // Analyt. Chem. 2001. V. 73. No. 4. P. 746–750.
- Sandrin T.R., Goldstein J.E., Schumaker S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: A review // Mass Spectrom. Rev. 2013. V. 32. No. 3. P. 188–217.
- Šedo O., Sedláček I., Zdráhal Z. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria // Mass Spectrom. Rev. 2011. V. 30. No. 3. P. 417–434.
- Seibold E., Maier T., Kostrzewa M. *et al.* Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels // J. Clin. Microbiol. 2010. V. 48. No. 4. P. 1061–1069.
- Turner K.M., Feil E.J. The secret life of the multilocus sequence type // Intern. J. Antimicrobial Agents. 2007. V. 29. P. 129–135.
- Valentine N., Wunschel S., Wunschel D. *et al.* Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. No. 1. P. 58–64.

MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY IN MICROORGANISM IDENTIFICATION

E.A. Demidov, K.V. Starostin, V.M. Popik, S.E. Peltek

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: scratch_nsu@ngs.ru

Identification of microorganisms from their protein profiles, or direct protein profiling, has been extensively used in the last decade. Being sufficiently accurate and specific, this method is fast and inexpensive. In this review, current notions of the potential of this method are considered and it is compared with other approaches to microorganism identification.

Key word: MALDI-TOF, direct protein profiling, microorganism identification.