

MALDI-TOF MS 微生物迅速同定 サンプル処理プロトコル

(*Pseudomonas* の場合)

1 用意するもの (一般的な実験器具、試薬は除く)

1.1 器具類

- ・ ギ酸、アセトニトリル用のサンプルチューブとピペットチップは有機溶剤に溶けない素材のものを用いる。
- ・ あらかじめ乾熱滅菌 (160 ℃、2~3 時間) した爪楊枝

1.2 試薬など

- ・ ギ酸 (LC/MS グレード)
- ・ アセトニトリル (HPLC グレード)
- ・ エタノール (HPLC グレード)
- ・ マトリクス : α -cyano-4-hydroxycinnamic acid
- ・ スタンダード用の大腸菌 (*Escherichia coli* NBRC 3301 など)
培地 No. 802 で 30 ± 2 ℃、20 時間、培養しておく。

2 通則

試験に用いた菌株は、供試菌株リストのエクセルファイルを参照のこと。菌株は本培養の前に適切な復元培養を行ったものを用いた。

MALDI スペクトラ・ライブラリー構築においては、最低でも 1 菌株あたり、4 ウェル×繰り返し 2 回測定、培養から異なる日程で行った 2 回を反復した合計 16 データを集約している。

注意：本ライブラリーを用いるエンドユーザーが、同様に繰り返し試験を行う必要があるというわけではない。

なお、スーパースペクトラのライブラリー用の *Pseudomonas* の前処理には、ギ酸 / アセトニトリル処理をする場合 (以下の 3.1 から 4.6 まで) と、その手法で測定用プレートにスポットした菌体が計測途中で剥がれた場合があったため、一部の菌株の測定では、菌体を直接プレートに塗布して行った (3.1 の後、途中を省略して、直接 4.5 へ進む。塗布の方法は 4.5 と同じ)。

3 培養から集菌まで (ギ酸 / アセトニトリル処理をする場合)

3.1 菌株は市販の Heart Infusion Agar を使い、30 ℃、暗室、20 時間の条件で培養する。(これは *Pseudomonas* の場合。培養条件や培地の基質情報は、各微生物群の供試菌株リストを参照のこと。)

- 3.2 ループで菌体を掻き集め、サンプルチューブの少量（250 uL）の滅菌水に懸濁後、99.5%エタノール（1 mL）を添加して終濃度 80%にする。
- 3.3 この状態でディープフリーザー（-80 ）で凍結すれば、一時中断、保存できる。
- 3.4 遠心分離（15,000 × g, 2 分）にかけ、上清を捨て、ピペットで吸い取るなどしてエタノールが残らないようにする。
遠心分離の時間は、沈降度合いによって延長する。
- 3.5 ギ酸（98～100%）は揮発しやすいので、使用直前に 70%に調整する。

4 サンプルの処理

- 4.1 3.3 の沈殿物に 70%ギ酸を 30～50 uL を加え、軽くボルテックスしてよく懸濁する。
- 4.2 懸濁液にアセトニトリルを 30～50 uL（前項で加えたギ酸と等量）を加え、軽くボルテックスして懸濁する。
- 4.3 遠心分離（15,000 × g, 2 分）にかける。
- 4.4 上清 1 uL を測定用プレートのウェルに滴下し、自然乾燥させる。
- 4.5 大腸菌をスタンダード用のウェルに爪楊枝で塗りつける。
- 4.6 それぞれのサンプル上にマトリクスを 1 uL を滴下し、自然乾燥させる。

MALDI-TOF MS 解析の条件は、各メーカー及び機種のプロトコルに準じる。

以上