

MALDI-TOF MS 微生物迅速同定 サンプル処理プロトコル

(*Aspergillus flavus* 類縁菌の場合)

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

- ・ サンプルチューブおよびピペットチップ (ギ酸、アセトニトリルなど有機溶剤に溶けない素材のもの)
- ・ 滅菌済みの医療用綿棒
- ・ あらかじめ乾熱滅菌 (160℃、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 (CHCA)
- ・ スタンダード用の大腸菌 (*Escherichia coli* NBRC 3301 など)
培地 No. 802 で 1~2 日間、30℃ で培養しておく。

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 回測定を行い、培養開始日の異なる同一菌株を用いて同条件で再度測定を行った、合計 16 データの取得を行い、更に種ごとに選抜・集約したデータを使用している。

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わけではない。

3 培養から集菌まで

3.1 菌株は市販の Potato Dextrose Agar を使い、25℃、10 日間の条件で培養する。

3.2 滅菌水で十分に湿らせた綿棒を用いて、培養した菌体のコロニーを半量 (6cm²) 程度掻き取り、少量 (250 μ L) の滅菌水を入れた 2.0mL 滅菌チューブに懸濁後、99.5%エタノール (1 mL) を添加して終濃度 80%に調整し、よく懸濁する。

エタノール終濃度 80%に調整したサンプル溶液は、ディープフリーザー (-80℃) で一時保存が可能 (保存できる期間はおよそ 2~3 週間)。

4 サンプルの処理（ギ酸 / アセトニトリル処理）

4.1 3.2 で作製したサンプル溶液を遠心分離（15,000 × g, 3 分）にかけ、上清をピペットで吸い取るなどして取り除き、沈殿物にエタノールが残らないようにする。

上清を取り除いた後、沈殿物に含まれるエタノールを完全に除去するため、3 分程度自然乾燥させても良い。

4.2 4.1 の沈殿物に 70%ギ酸（使用直前に 70%濃度へ調整したもの）を 50 uL を加え、軽くボルテックスして懸濁する。

4.3 懸濁液にアセトニトリルを 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よく懸濁する。

4.4 遠心分離（15,000 × g, 2 分）にかける。

4.5 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。

4.6 大腸菌 1 コロニーをスタンダード用のウェルに爪楊枝で薄く塗布する。

4.7 それぞれのサンプル上にマトリクス（CHCA）を 1 uL ずつ滴下し、自然乾燥させる。

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

以上