

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Identifikace jedlých hub pomocí hmotnostní spektrometrie
MALDI-TOF**

Diplomová práce

Bc. Marika Aronová
Výživa a potraviny (AMD)

Ing. Matěj Božik, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Identifikace jedlých hub pomocí MALDI-TOF“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24. 7. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Matějovi Božikovi, Ph.D. za vedení práce a pomoc při experimentu, dále RNDr. Ivaně Eichlerové z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i. za poskytnutí hub ze sbírky. Velké poděkování patří rodině a okruhu blízkých přátel za podporu.

Identifikace jedlých hub pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Souhrn

Identifikace hub je v současné době omezena na porovnávání podle morfologických znaků, což vyžaduje zkušeného mykologa, nebo na identifikaci na základě analýzy DNA, která taktéž vyžaduje odbornost pracovníků, a navíc je finančně i časově náročná. Identifikace pomocí MALDI nabízí levnou, rychlou a snadnou alternativu. Jedná se o hmotnostní spektrometrii, kdy jsou rozlišována specifická hmotnostní spektra proteinů organismu. Princip určování druhů pomocí MALDI spočívá ve vytvoření knihovny referenčních spekter pro daný druh, případně kmen. Spektra neznámého vzorku jsou porovnána s knihovnou a program vyhodnotí shodu, která je vyjádřena logaritickým skóre 0 – 3. Metoda je v praxi používána v mikrobiologii pro identifikaci bakterií, kvasinek a vláknitých hub, ovšem metody identifikace vyšších hub pomocí MALDI ještě nejsou zcela prozkoumány a pro identifikaci není standardní postup přípravy vzorku a nejsou dostupné knihovny referenčních spekter hub. V této diplomové práci byla vytvořena domácí knihovna ze spekter 56 známých kmenů hub rodu *Pleurotus*. Kmeny náležely 9 druhům. Nejdříve byla provedena optimalizace extrakční metody, kdy byly vyhodnoceny jako nejvhodnější přípravy vzorku: extrakce etanolem a kyselinou mravenčí s homogenizací v oscilačním mlýně, a přímý přenos na destičku. Všechny vzorky byly analyzovány oběma způsoby a následně byly vytvořeny dvě knihovny. Na základě shlukové analýzy byla zřetelná rozlišitelnost druhů v obou případech. Aplikovatelnost MALDI na identifikaci na druhové úrovni byla úspěšně ověřena identifikací slepých vzorků. Referenční spektra knihoven byla mezi sebou porovnána a byla zjišťována kompatibilita spekter získaných ze dvou metod přípravy vzorku, při porovnání spekter došlo ke 100% úspěšnosti správného určení druhu a 51 % správného určení kmenu. Metoda MALDI je vhodná pro identifikaci hub rodu *Pleurotus* na druhové úrovni. Nejlepším protokolem přípravy vzorku je přímý přenos buněk na destičku, což metodu činí ještě rychlejší a levnější. Další výhodou je, že je přímý přenos buněk použitelný i v případě, že by knihovna referenčních spekter hub nabízená komerčními systémy MALDI biotyperu byla tvořena spektry získanými ze vzorků extrahovaných kyselinou mravenčí.

Klíčová slova: MALDI-TOF, *Pleurotus*, jedlé houby, biotyper

Identification of edible mushrooms by MALDI-TOF mass spectrometry

Summary

The identification of mushrooms is currently limited to comparisons based on morphological features, which requires an experienced mycologist. Other option is an identification based on DNA analysis, which also requires skilled workers, these methods are expensive and time consuming. MALDI identification offers a cheap, fast and easy alternative. It is mass spectrometry based on specific protein spectra of organism, The principle of MALDI biotyping consists in creating a library of reference spectra for species or strain, the spectra of an unknown sample are compared with the library and the program calculate similarity, which is expressed by a logarithmic score of 0-3. The method is used in practice in microbiology for the identification of bacteria, yeast and filamentous fungi. The identification of mushrooms by MALDI has not been fully investigated and the sample preparation protocol is not optimized for the method and there are not available libraries of reference spectra of mushrooms. In this diploma thesis was created a in-house database of the spectra of 56 known strains of the genus *Pleurotus*, which belonged to 9 species. First, the optimization of the extraction was performed, where we evaluated as the most suitable sample preparation: extraction with ethanol and formic acid with homogenization in an oscillating mill, and direct transfer of cells to the target – intact cell. All samples were analyzed by both methods and two libraries were created. Based on a cluster analysis, the difference of species in both protocols was clear. The applicability of MALDI for identification at the species level was successfully verified by the identification of blank samples. The reference spectra of the libraries were compared with each other and the compatibility of the spectra obtained from two sample preparation protocols was determined. When compared the spectra, there was a 100% success of the correct determination of the species and a % of the correct determination of the strain. The MALDI method is suitable for identification of fungi of the genus *Pleurotus* at the species level, a sufficient and in fact the best protocol for sample preparation is intact cell transfer to the target, which makes the method even faster and cheaper. Another advantage is that intact cell transfer is usable even if the library of reference spectra offered by commercial MALDI biotyper systems would be obtained from the samples extracted with formic acid.

Key words: MALDI-TOF, *Pleurotus*, edible mushrooms, biotyper

Obsah

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE	9
3	PŘEHLED LITERATURY	10
3.1	OBECNÁ CHARAKTERISTIKA HUB	10
3.1.1	Klasifikace hub	11
3.1.2	Pěstované houby	12
3.1.3	Hlíva a její význam	13
3.2	IDENTIFIKACE HUB	14
3.2.1	Genetické molekulární metody	15
3.3	MALDI – TOF MS	15
3.3.1	Hmotnostní spektrometrie	16
3.3.2	MALDI-TOF princip metody	16
3.3.3	MALDI biotyping	19
3.3.4	MALDI biotyping u hub	21
4	METODIKA	26
4.1	MATERIÁL	26
4.1.1	Biologický materiál	26
4.2	MALDI ANALÝZA	28
4.2.1	Chemikálie	28
4.2.2	Vybavení laboratoře	28
4.3	OPTIMALIZACE EXTRAKCE	28
4.3.1	Extrakční protokol	29
4.4	MĚŘENÍ A VYHODNOCENÍ	30
5	VÝSLEDKY	32
5.1	VÝSLEDKY OPTIMALIZACE EXTRAKCE	32
5.2	VALIDACE A VERIFIKACE METODY	32
5.2.1	Robustnost metody MALDI	34
5.2.2	Analýza slepých vzorků	35
5.3	OVĚŘENÍ DATABÁZE	36
5.4	DRUHOVÁ IDENTIFIKACE RODU <i>PLEUROTUS</i>	37
5.5	IDENTIFIKACE V RÁMCI DRUHU	40
6	DISKUZE	42
7	ZÁVĚR	45
8	SEZNAM LITERATURY	46

9	SEZNAM OBRÁZKŮ	52
10	SEZNAM TABULEK	53
11	SEZNAM ZKRATEK	54

1 Úvod

Tématem diplomové práce je identifikace jedlých hub, konkrétně hub rodu *Pleurotus* (hlíva). Hlívy jsou jedny z nejpěstovanějších hub na světě, jsou běžně dostupné čerstvé v supermarketech, nebo sušené jako doplňky stravy v lékárnách (Krakowska et al. 2020). Doplňky stravy se z hlív vyrábějí pro jejich obsah bioaktivních látek, jako jsou β -glukany a fenolické sloučeniny, kterým jsou připisovány antivirotické, antibiotické i protirakovinové účinky. Mezi druhy hlív je nejpěstovanější a nejžádanější hlíva ústříčná *Pl. ostreatus* (Golak-Siwulska et al. 2018; Krakowska et al. 2020). Jelikož je s ostatními druhy někdy špatně rozeznatelná, je ke správnému určení druhu nutná pomoc odborníka v mykologii. Další běžnou možností identifikace hub jsou metody na základě analýzy DNA (Hebert et al. 2003; Shimomura et al. 2008). Jelikož jsou obě metody drahé, zdlouhavé a vyžadují odbornost, bude se tato diplomová práce zabývat alternativní, nebo alespoň doplňkovou metodou identifikace, metodou MALDI-TOF MS. Jedná se o druh hmotnostní spektrometrie, která se v praxi používá na určování bakterií, kvasinek a začíná se používat i u vláknitých hub. Metoda MALDI je založena na specifických hmotnostních spektrech proteinů organismu, které jsou jedinečné jako třeba otisk prstů (Sugawara et al. 2016; Crossay et al. 2017; Sanguinetti & Posteraro 2017; Beck et al. 2017; Tomé et al. 2019).

V této diplomové práci bude ověřována aplikovatelnost MALDI na houby rodu *Pleurotus*, výběr nejvhodnějšího protokolu přípravy vzorku pro analýzu a bude ověřeno, jestli je na základě získaných spekter možné rozlišení druhů, nebo i rozlišení jednotlivých kmenů v rámci druhu.

2 Cíl práce

Hlavním cílem práce je optimalizovat přípravu vzorků a otestovat metodu identifikace významných druhů jedlých hub (např. *Pleurotus* spp.) pomocí screeningové metody MALDI biotyping. Dílčími cíli bude vypracování standardizované metodiky přípravy vzorku pro vzorky jedlých hub a jejich případná klasifikace v rámci rodů.

Hypotéza: Jedlé houby lze klasifikovat na základě jejich iontového profilu pomocí MALDI biotyping.

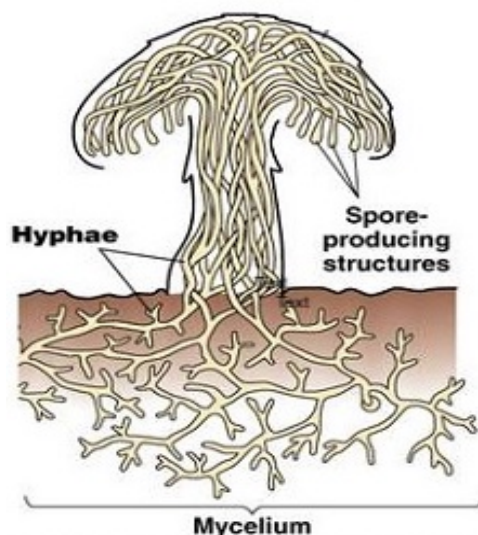
3 Přehled literatury

3.1 Obecná charakteristika hub

V historii byly houby považovány za druhy rostlin, jelikož stejně jako ony rostly na jednom místě a na rozdíl od živočichů se neživí polykáním potravy. To ovšem bylo v době, kdy se všechny organismy dělily do dvou skupin – rostliny a živočichové. S objevem mikroskopu se otevřel nový svět, který není pozorovatelný pouhým okem, a to svět mikroorganismů – bakterie, řasy, prvoci či mikroskopické houby. Elektronovým mikroskopem potom byla odhalena rozdílná buněčná organizace u bakterií, a tedy prokaryotická buňka. Tyto a další objevy vedly ke změně systému organismů – systém pěti říší, kde byly houby samostatnou říší, ale pouze houby mnohobuněčné a jednobuněčné pak patřily do jiné říše. Díky molekulární biologii se systematika opět posunula. Na základě evolučních linií se organismy dělí na tři domény – bakterie, archea a eukarya. Eukarya jsou dále členěny do pěti říší – prvoci (*Protozoa*), chromista (*Chromista*), rostliny (*Plantae*), živočichové (*Animalia*) a houby (*Fungi*) (Jablonský & Šašek 2006; Hofrichter 2018).

Houby neboli *Fungi* mají eukaryotickou buňku. Způsobem výživy se jedná o heterotrofní organismy, stejně jako živočichové se živí organickými látkami, ale na rozdíl od nich rozkládají organické složky mimotělně – do svého okolí vylučují hydrolytické enzymy, které substrát naštěpí a houba pak absorbuje až tráveninu. Houby se rozmnožují výtrusy (Jablonský & Šašek 2006). To jak jsou povětšinou houby známy – v podobě plodnice, je jen fáze života některých z nich. Plodnici tvoří jenom nejvyspělejší typy hub pomocí nepravého pletiva. Větší část života i větší objem biomasy pak tvoří podhoubí (mycelium), které je složeno z jednotlivých vláken (hyf). Většina hub jsou mnohobuněčné organismy, výjimkou jsou však kvasinky (Hofrichter 2018).

Jelikož houby nejsou schopny fotosyntézy, neboť neobsahují chlorofyl, jedná se převážně o organismy saprofytické či parazitické (Hofrichter 2018).



Obr. 1 Ilustrace plodnice a mycelia. Upraveno z <https://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/biofungos2.php>

Význam mikroskopických hub v potravinářském průmyslu může být pozitivní i negativní. Ve prospěch jsou ušlechtilé plísňové kultury užívané při výrobě sýrů či masných výrobků. Dále jsou v potravinářství těžko postradatelné kvasinky, které jsou užívané v pekárenství, vinařství nebo pivovarnictví. Houby se vyznačují produkcí sekundárních metabolitů – mykotoxinů, které mohou být k užitku farmaceutickému průmyslu, ovšem tyto látky jsou často pro člověka toxické a karcinogenní.

Makroskopické, tedy okem viditelné houby, mají význam jak v gastronomii pro svou specifickou chuť, tak ve farmacii a výživě pro obsah zdraví prospěšných látek (Jablonský et Šašek 2006). Houby jsou hodnotná potravina, která celosvětově navyšuje v kultivaci a spotřebě. Jsou využity ve výživě, lékařství, jsou součástí obchodu i zemědělství (Adedokun et al. 2016). Naopak z řady makromycet jsou pro člověka v nelehlosti dřevokazné houby a houby nejedlé a jedovaté, které mohou být chybně zaměněny s těmi lahodnými (Jablonský & Šašek 2006).

3.1.1 Klasifikace hub

Klasifikace hub se stále vyvíjí stejně jako vymezení hub samotných. V minulosti byly houby tříděny na základě morfologických znaků a způsobu rozmnožování. Ovšem díky rozvoji molekulárně genetických a biochemických metod se pohled na klasifikaci změnil. Tyto metody pomohly odhalit příbuzenské vztahy skupin organismů včetně hub (Jablonský & Šašek 2006).

Houby jako říše *Fungi* jsou tříděny do pěti tříd: *Chytridiomycota*, *Microsporidiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* (vřeckovýtrusé), *Basidiomycota* (stopkovýtrusé).

Co se jedlých hub týče, nejvíce jich je zastoupeno ve třídě *Basidiomycota*, kam spadá drtivá většina pěstovaných či sbíraných hub (Jablonský & Šašek 2006). Dále mezi *Ascomycota* jsou z tohoto pohledu významné pouze smrže z rodu *Morchella* a kupříkladu lanýže z rodu *Tuber* (Hofrichter 2018).

3.1.2 Pěstované houby

Vědomé využívání plodnic je přisuzováno již pravěkým lidem, což dokazují některé dochované kresby v jeskyních (Hofrichter 2018). Egyptské hieroglyfy jsou dalším dokladem z dávné historie, že houby mají pro člověka zvláštní význam. Zájem o ně vedl k pokusům houby pěstovat. Předpokládá se, že se žampiony začaly pěstovat ve Francii na počátku 17. století a dodnes se jedná o nejvíce pěstované houby ve světovém měřítku. Pěstování hub je typické pro jihovýchodní Asii, kde jsou nejvíce v oblibě dřevokazné houby – pro Čínu a Japonsko typický houževnatec jedlý, který je znám jako shii-také. Ve světě je průmyslově pěstováno především pět rodů hub: *Agaricus* (pečárka), *Pleurotus* (hlíva), *Lentinula* (houževnatec), *Callistosporium* (penízovka) a *Volvariella* (kukmák). Méně významné pěstované houby jsou potom například *Hirneola auricula judae* (ucho Jidášovo), *Cyclocybe aegerita* (polnička topolová), *Hericiium coralloides* (korálovec bukový), *Sparassis crispa* (kotrč kadeřavý) nebo *Pholiota nameko* (šupinovka nameko) (Lepšová 2005). Podle dat FAO (2018) bylo v roce 2018 celosvětově vypěstováno téměř 9 miliónů hub, což značí, že se jednalo o nejrychleji rostoucí odvětví pěstitelství. Za posledních 10 let se sklizeň plodnic hub zdvojnásobila, taktéž se zvýšila druhová rozmanitost pěstovaných hub (Krakowska et al. 2020).

V České republice je vyhláškou č. 157/2003 Sb. povoleno pěstovat 22 druhů hub určených k přímému prodeji nebo k dalšímu průmyslovému zpracování pro potravinářské účely. A to *Agaricus hortensis* (žampion zahradní), *Agaricus brunescens* (žampion hnědý), *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústřičná), *Pleurotus cornucopiae* (hlíva miskovitá), *Pleurotus pulmonarius* (hlíva plicní), *Pleurotus eryngii* (hlíva máčková), *Stropharia rugosoannulata* (límčovka obrovská žlutá), *Stropharia rugosoannulata* (límčovka obrovská hnědá), *Flammulina velutipes* (penízovka sametonohá), *Agrocybe aegerita* (polnička topolová), *Lentinus edodes* (houževnatec jedlý), *Kuehneromyces mutabilis* (opěnka měnlivá), *Volvariella volvacea* (kukmák sklepní), *Hirneola auricula judae* (ucho Jidášovo), *Pholiota nameko* (šupinovka nameko), *Hypsizygus tessulatus* (líhovec moučný), *Agaricus brasiliensis* (žampion mandlový), *Grifola frondosa* (trsnatec lupenitý), *Hericiium erinaceus* (korálovec ježatý), *Agaricus arvensis* (žampion ovčí), *Pleurotus citrinopileatus* (hlíva citronová), *Pleurotus salmoneostramineus* (hlíva růžová).

3.1.3 Hlíva a její význam

Říše: *Fungi* (houby)

Oddělení: *Basidiomycota* (houby stopkovýtrusné)

Podkmen: *Agaricomycotina*

Třída: *Basidiomycetes* (stopkovýtrusné)

Podtřída: *Agaricomycetidae* (houby rouškaté)

Řád: *Agaricales* (pečárkotvaré)

Čeleď: *Pleurotaceae* (lupenotvaré)

Rod: *Pleurotus* (hlíva)

Druhy rodu *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. patří mezi nejvýznamnější komerčně pěstované druhy hub na světě, nejvýznamnějším druhem je *P. ostreatus* (Jablonský et al. 2017; Pánek et al. 2019). Hlíva ústříčná se řadí mezi dřevokazné houby, která se živí saprofitně. V přírodě roste převážně na pařezech nebo kmenech listnatých, někdy i jehličnatých stromů. Má takto roli rozkladače, meziproducty rozkladu pak slouží jako výživa jiných organismů. Kromě dřeva hlívy rostou i na jiných organických odpadech, které jsou bohaté na lignin, celulózu a hemicelulózu (Jablonský & Šašek 2006; Jablonský et al. 2017).

3.1.3.1 Hlíva ve výživě člověka

Hlívy jsou pěstovány především kvůli pozitivním zdravotním účinkům, které přináší jejich konzumace. Obsahují několik bioaktivních látek, jichž se využívá při léčbě virových, bakteriálních onemocněních, taktéž kardiovaskulárních onemocněních a dokonce při léčbě rakoviny (Golak-Siwulska et al. 2018; Krakowska et al. 2020).

Hlívy mají ve výživě význam při pomoci předcházení nemocem, mají své místo v racionálním stravování a vzhledem k vysokému obsahu vlákniny a nízkému obsahu tuku i při redukčních dietách. Výživově hodnotnými jsou v hlívách bílkoviny, sacharidy, mastné kyseliny, vitaminy a minerální látky (Sałata et al. 2018). Jsou zdrojem významných biologicky aktivních látek, specifických polysacharidů a polyfenolů. Bylo zjištěno, že polysacharidy β -glukany obsažené v hlívě ústříčné mají imunostimulační vlastnosti, které kromě pozitivního účinku na imunitní systém a protirakovinných účinků, snižují cholesterol a snižují riziko ischemické choroby srdeční. Polyfenoly v těle působí jako antioxidant, spolu s dalšími biologicky aktivními látkami obsaženými v hlívách mají antibiotické, antivirotické a protizánětlivé účinky (Sałata et al. 2018; Krakowska et al. 2020).

3.1.3.2 β -glukany

Jedlé houby jsou potenciálním zdrojem dietární vlákniny. Jejich buněčná stěna obsahuje chitin, další hemicelulózy, manany a z výživového hlediska nejzajímavější β -glukany (Manzi a Pizzoferrato 2000). β -glukany jsou přírodní polysacharidy, tvořené z více než 250 tisíc D-glukóz spojených β -glykosidickou vazbou. Jejich struktury se liší podle jejich zdrojů. U hlív je přítomen β -glukan Pleuran, který má vazby β (1 \rightarrow 3) a β (1 \rightarrow 6) (Jayachandran et al. 2018).

β -glukany jsou zodpovědné za celou řadu akcí, které chrání a posilují imunitní systém. Poskytují optimální odolnost vůči všem možným negativním útokům na zdraví, díky své schopnosti se vázat přímo s makrofágy a jinými bílými krvinkami a aktivovat je (Meena et al. 2013). Kromě aktivace imunitního systému se na základě pokusů na krysách ukázal i efekt při léčbě nádorových onemocnění. β -glukany hub mají také vliv na metabolismus tuků a cukrů (Rop et al. 2009), proto je zkoumáno možné využití β -glukanů při léčbě diabetu (Bozbulut a Sanlier 2019).

3.2 Identifikace hub

Klasické taxonomické metody jsou založeny na pozorování morfologických a fyziologických znaků. Vzhledem ke genotypové a fenotypové variabilitě v rámci druhů, může často docházet k mylné identifikaci (Hebert et al. 2003; Shimomura et al. 2008). Navíc jsou tyto znaky nestálé, jelikož jsou ovlivňovány vnějšími podmínkami prostředí (Shimomura et al. 2008). Další problém při sledování morfologických znaků je, že často mohou být efektivně hodnotitelné pouze u určitého vývojového stádia nebo pohlaví (Hebert et al. 2003). Z těchto důvodů mohou být snadno zaměněny jedlé houby s jedovatými druhy.

Důležitá je i rychlá identifikace houby při otravě, aby mohla být zvolena vhodná léčba. V této situaci se většinou jedná o zpracovanou plodnici, tudíž morfologické znaky jsou těžko pozorovatelné (Shimomura et al. 2008). Proto bylo potřeba posunout metody určování druhu na molekulární úroveň (Hebert et al. 2003).

Molekulární metody jsou především založeny na polymerázové řetězové reakci (PCR) amplifikaci regionu ribozomální DNA (rDNA) hub. Morfologické určování zahrnuje jak pozorování typických znaků plodnice, tak pozorování pod mikroskopem (Sakakibara et al. 2002).

3.2.1 Genetické molekulární metody

V posledních dvaceti letech došlo díky pokrokům v molekulárních technikách k převratům v našich znalostech o houbách a jejich vývoji. A to zejména vývojem PCR nebo fylogenetické analýzy sekvence DNA a sekvence proteinů (Yang 2011). Ke klasifikaci hub je používáno několik molekulárních genetických nástrojů, jako je náhodně amplifikovaná polymorfni DNA (RAPD), polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) nebo amplifikovaný polymorfismus délky fragmentů (AFLP). Je ovšem obtížné potvrdit fylogenetické postavení každého kmene, jelikož uspokojivá a spolehlivá genetická informace je omezena (Li et al. 2017). Problémem při využití těchto metod v praxi je, že je potřeba mít o daném vzorku nějaké informace, aby byl zvolen správný primer – specifický oligonukleotid, pro amplifikaci identifikačního markeru (Hall et al. 2003).

3.2.1.1 DNA barcoding

Metoda DNA barcoding jde mimo tento problém. Je totiž založena na identifikaci genomové sekvence, které je jedinečná pro každý biologický druh, jako je jedinečný otisk prstu jedince (Roopnarine, 2006). Klíčové pro identifikaci neznámého vzorku je vytvoření databáze sekvencí pro všechny eukaryotní organismy. Univerzální standardní DNA barcode má být sekvence natolik variabilní, aby bylo možné spolehlivě odlišit i příbuzné druhy. Identifikace je většinou založena na sekvenci ribozomální RNA nebo mitochondriální DNA.

Pro použití DNA barcoding u hub bylo nejdříve potřeba zvolit ideální standardní barcode sekvenci (Seifert 2009). To bylo vzhledem k různorodosti říše komplikované (Dentinger et al. 2011). Nakonec je oficiální barcode sekvencí ITS region, přestože je pro některé vřeckovýtrusné houby vzhledem ke standardizovaným pravidlům nevhodný (Seifert 2009). U živočichů je používán mitochondriální gen cytochrom *c* oxidáza (COI).

Tato metoda je oproti jiným genetickým metodám časově i finančně šetrnější, ovšem zahrnuje několik kroků zpracování vzorku – izolace DNA, PCR, gelová elektroforéza, sekvenování, statistické zhodnocení a samotné porovnání s databází sekvencí (Hebert et al. 2003).

3.3 MALDI – TOF MS

Doplňkovou metodou k molekulárně genetické identifikaci je MALDI – TOF MS neboli hmotnostní spektrometrie s ionizací/desorpcí laserem za účasti matrice s analyzátozem doby letu. Výhodou této metody je její rychlost, nízké náklady na vzorek a nízké nároky na odbornost personálu.

3.3.1 Hmotnostní spektrometrie

Počátky hmotnostní spektrometry sahají na konec 19. století, kdy byly prozkoumány principy pohybu nabitých částic v elektrickém a magnetickém poli. Zakladatelem hmotnostní spektrometrie je uváděn Sir Joseph J. Thomson, který ji předpověděl jako metodu použitelnou pro chemické analýzy. Během druhé světové války byla hmotnostní spektrometrie využita v projektu „Manhattan“ při výrobě atomové bomby. Velký posun a význam pro využití v analýze složitých směsí organických látek bylo spojení hmotnostní spektrometrie s plynovou a kapalinovou chromatografií v 60. letech minulého století. Další průlom byl v 80. letech, kdy byla zavedena ionizace elektrosprejem a MALDI, které umožnili ionizaci i vysoce polárních látek a biomakromolekul. V posledních desetiletích se možnosti hmotnostní spektrometrie stále rozšiřují. Zvyšuje se citlivost měření, a především je zlepšení v robustnosti, která je důležitá pro provoz v rutinní laboratorní praxi. V současnosti se hmotnostní spektrometrie využívá v lékařství, farmacii, kontrole potravin a životního prostředí, v průmyslu i zemědělství (Friedecký a Lemr 2012).

Hmotnostní spektrometrie je separační metoda, kde dochází k separaci nabitých částic, které reagují na elektrické nebo magnetické pole ve vakuu. Existuje a používá se několik různých technických řešení. Každé řešení má svá pozitiva i úskalí, proto se využívají na základě vhodnosti pro daný analyt nebo typ kvantitativní či kvalitativní analýzy. V základě se však skládají ze tří základních částí – iontový zdroj, analyzátor a detektor částic (Friedecký a Lemr 2012).

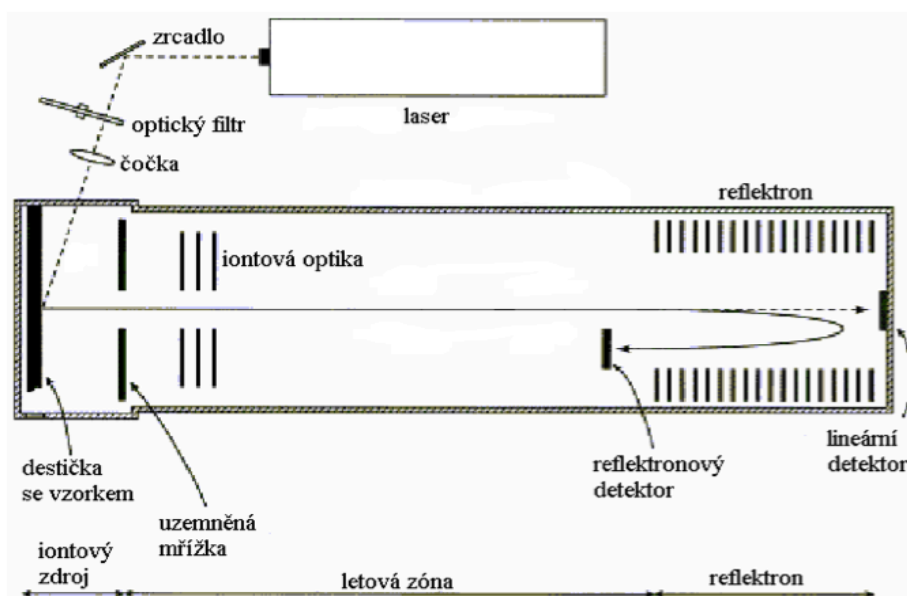
3.3.2 MALDI-TOF princip metody

MALDI – TOF je zkratka anglického Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization s analyzátozem time of flight tedy doby letu. Jedná se o metodu hmotnostní spektrometrie s měkkou ionizací, kdy je vzorek ionizován pomocí laseru za přítomnosti matrice. Za tuto techniku získal v roce 2002 K. Tanaka Nobelovu cenu (Norková et al. 2013). MALDI má široké využití v hmotnostní spektrometrii velkých netěkavých biomolekul, konkrétně peptidů, proteinů, oligonukleotidů a oligosacharidů (Zenobi a Knochenmuss 1999). V současné době je tato metoda úspěšně využívána v klinických mikrobiologických laboratořích k rychlé a účinné identifikaci patogenních bakterií a kvasinek (Clark et al. 2013; Stein et al. 2018). Metoda identifikace mikroorganismů, zejména bakterií je založena na rozlišnosti ribozomálních RNA proteinů (Sugawara et al., 2016)

Ionizace laserem za účasti matrice – z názvu je zřejmé, že se matrice účastní procesu ionizace. Předává energii laseru molekulám analytu, který je takto ionizován. Vzorek s matricí

je aplikován na destičku ideálně z inertního kovu. V iontovém zdroji je po zaschnutí aplikován laserový puls. Po předání energie skrz matrici ke vzorku se ionizované molekuly uvolní do plynné fáze. Jedná se o měkkou ionizační techniku, zpravidla tedy nedochází k fragmentaci molekul. Ionty jsou vypuzeny pomocí elektrického pole, usměrněny iontovou optikou. Následně jsou podle m/z v analyzátoru rozděleny a poté v jasném pořadí dopadají na detektor. (Clark et al. 2013).

Ionizace pomocí MALDI probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku je povrch matrice a analytu ozařován laserovým paprskem v krátkých pulsech v řádu nanosekund. Matrice absorbuje energii laserového pulsu, čímž dochází k její desorpci. Matrice v malých částicích přechází do plynného stavu a s sebou strhává i molekuly analytu. V druhém kroku jsou molekuly analytu dále ionizovány přenosem protonů excitovaných molekul matrice. Vznikají tak pseudomolekulární ionty analytu $[A+H]^+$ (Clark et al. 2013).



Obr. 2 Schéma přístroje MALDI – TOF

https://is.muni.cz/el/1431/podzim2014/C9320/um/navod_MALDIMS_2014.pdf?lang=en

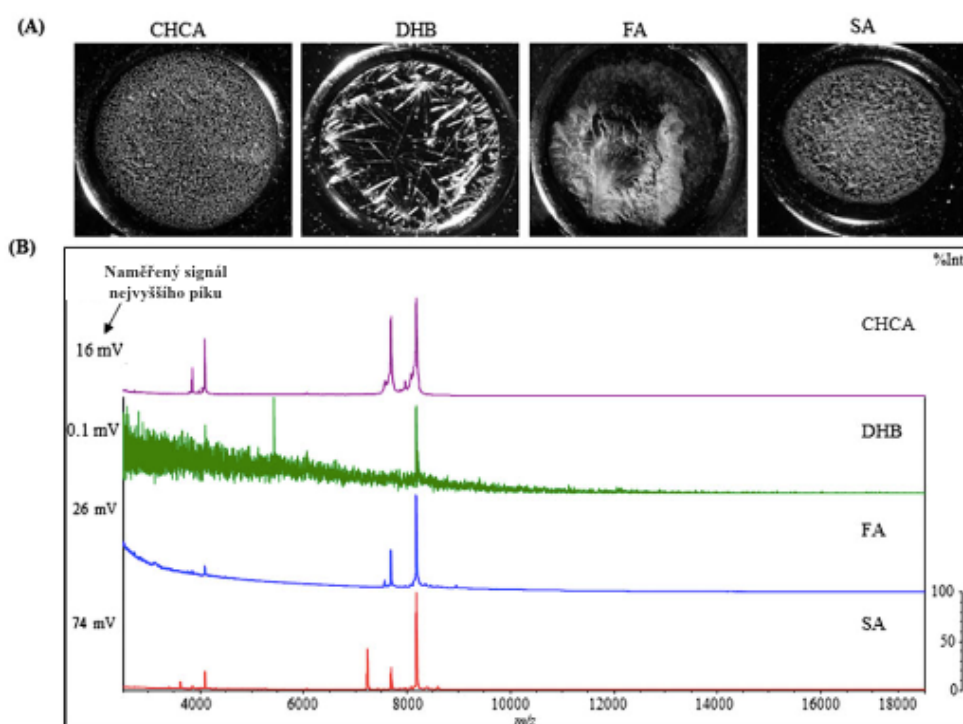
3.3.2.1 Maldí matrice

Při ionizaci vzorku laserem napřímo tj. bez matrice, se molekuly mohou štěpit nežádoucím způsobem (Havliš 1999). Vzorek by měl mít vysoký absorpční koeficient pro vlnovou délku laseru, přičemž nejběžněji jsou používány ultrafialové (UV) lasery. Což není pro mnoho významných biomolekul typické, a proto vznikla idea spojení analytu s dobrým absorbentem (Vertes et al. 1993).

Výběr matrice je pro úspěšné experimenty na MALDI klíčový (Zenobi & Knochenmuss 1999; Clark et al. 2013). Nejběžněji je analyt krystalizován s velkým množstvím matrice v podobě derivátu benzoové kyseliny rozpuštěné ve vodě a vhodném rozpouštědle (Zenobi a Knochenmuss 1999; Ubik 2000). Vhodnými maticemi jsou kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA), 4-hydroxy-3-metoxyskořicová (ferulová, FA) 4'-hydroxyazobenzen-2-karboxylová kyselina (HABA), 3,5-dihydroxybenzoová (gentisová, DHB), dimetoxy-4-hydroxyskořicová (sinapová, SA). Pro peptidy, proteiny aglykoproteiny do 250 kDa je jako matrice vhodná HABA, menší proteiny také dobře ionizuje SA, vysokomolekulární látky pak DHB (Karas et al. 2000). Zdá se, že jako vhodné matrice jsou využívány karboxylové kyseliny, ovšem jako vhodná matrice pro analýzu oligonukleotidů se ukázal 2,4,6-trihydroxy acetofenem (Zenobi a Knochenmuss 1999).

Volba matrice závisí na parametrech, jako je absorpce při vlnové délce použitého laseru a během působení pulsu musí být fotostabilní, dále na tvorbě krystalů s analytem a kyselém charakteru matrice (ionizace přenosem protonu na analyt). Matrice by neměla se vzorkem reagovat (Karas et al. 2000).

Da Silva Amaral et al. (2018) ve své studii optimalizace metody identifikace pro rod *Xylaria* (dřevnatka) z třídy *Ascomycetes* porovnávají použití různých matic a to DHB, CHCA, FA a SA v organickém rozpouštědle (acetonitril, destilovaná voda, trifluoroctová kyselina). Na Obr. 3 (B) jsou znázorněna hmotnostní spektra *X. arbuscula* za použitých různých matic, ze kterých vyplývá, že nejvhodnější maticí v této studii byla SA (30 mg/mL).



Obr. 3 (A) snímky spotů ze světelného mikroskopu s matricí CHCA (10 mg/mL), DHB (10 mg/mL), FA (30 mg/mL) and SA (30 mg/mL). (B) MALDI hmotnostní spektra *X. arbuscula* za použití různých matric. Upraveno z.(da Silva Amaral et al. 2018).

3.3.2.2 Laser

Dalším významným prvkem celé analýzy je laser. Ozáření probíhá v krátkém čase, aby se předešlo poškození nebo degradaci vzorku, které by mohlo být způsobeno nadměrným zahřátím (Karas et al. 2000). Paprsek je zaměřen na malý bod povrchu zkrystalizované matrice se vzorkem. Současné lasery dosahují rozlišení až 0,05 mm. Puls paprsku je velmi krátký, obvykle 1-5 ns (Brown a Lennon 1995). V laserové optice je použit atenuátor paprsků pro nastavení intenzity záření (definováno jako intenzita na jednotku povrchu). Tlumení laseru se nastavuje individuálně při každém měření v závislosti na typu vzorku, obvykle je však pro rutinní aplikaci výrobcem standardizováno. Vlnové délky laseru jsou v rozpětí od UV záření po infračervené (IR). Nejběžnější je N2 laser s vlnovou délkou 337 nm, dále lasery excimerové s vlnovou délkou 355, pak méně často IR lasery (Clark et al. 2013).

3.3.2.3 TOF analyzátor

Ionizátor MALDI je obvykle spojen s analyzátozem TOF – time of flight, kde jsou ionty analyzovány průletovým analyzátozem. Je měřen čas, kdy se iont pohybuje od iontového zdroje k detektoru. Měrná hmotnost iontu m/z se vypočítá ze vztahu:

$$\frac{m}{z} = 2eU \frac{t^2}{L^2}$$

kdy m je hmotnost a z náboj, L je letová zóna, e elementární náboj, t čas a U značí urychlovací napětí. Rychlejší ionty – s menším m/z , způsobují silnější odezvu oproti pomalejším iontům, proto má TOF analyzátor větší citlivost pro menší molekuly.

TOF má vysokou citlivost, je rychlý a má teoreticky neomezenou maximální hodnotu m/z . Pro větší rozlišení se používá pulzní extrakce, která koriguje nerovnoměrnost počátečních kinetických energií iontů. Nevýhodou je nutná kalibrace podle poměru m/z . Dalším prvkem pro zvýšení rozlišení je reflektor, který funguje jako iontové zrcadlo a zdvojnásobí dobu letu (Hortin 2006).

3.3.3 MALDI biotyping

MALDI biotyping je identifikace druhů založená na specifickém proteinovém profilu organismu. Je možné identifikovat bakteriální druhy a kmeny na základě jejich typického

iontového m/z profilu proteinů či peptidů. Hmotnostní spektra vzorku jsou porovnávána s knihovnou referenčních spekter například MALDI Biotyper (Bruker) či SARAMIS (Shimadzu), a tak mohou být mikroorganismy identifikovány na úrovni rodu, druhu a často i kmenu. Shodu či neshodu program Biotyper vyhodnocuje pomocí logaritmického číselného skóre v hodnotách 1 - 3, dále v základním nastavení používá barevné rozlišení pro znázornění úspěšnosti (červená- žádná shoda, žlutá- částečná shoda, zelená- plná shoda) (Huong & Kopel 2014).

Komerční MALDI systémy jsou používány k určování bakterií, ale i pro určování hub, převážně plísni, bylo vyvinuto mnoho experimentálních strategií. Úspěšně bylo pomocí MALDI identifikováno mnoho druhů hub např. *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* a několik druhů kvasinek. MALDI se ukázala jako vhodný nástroj pro rychlou identifikaci a klasifikaci bakterií, kvasinek i plísni. Ovšem není znám optimální protokol zpracování vzorku, který by byla pro *Fungi* universální (Chalupová et al. 2014).

MALDI se jeví jako rychlý nástroj pro identifikaci bakteriálních a kvasinkových patogenů. Proteinové spektrum – hmotnostní spektrum je specifické jako otisk prstu, toto specifické proteinové spektrum izolátu je porováno s referenční spektrální databází pro identifikaci. Studie uvádějí míru identifikace druhů 92-99 % u souborů kvasinek (Marklein et al. 2009; Stevenson et al. 2010; De Carolis et al. 2014). Výsledky studií nejsou zcela porovnatelné, jelikož u studií byly použity různé přístupy k přiřazování druhů – porovnávání spektra izolátu s referenčními spektry v databázích, ale také studie se specifickými databázemi rozšířené o „in-house“ spektra. Je tedy stále potřeba, aby se referenční databáze spekter pro MALDI rozšiřovala (Pinto et al. 2011).

Tato metoda je úspěšně přizpůsobena pro rutinní identifikaci mikrobiálních druhů, převážně na základě rozlišnosti ribozomálních RNA proteinů. Ovšem aplikace na makroskopické houby je omezena na mycelární formu. Některé databáze umožňují identifikaci kvasinek a mikroskopických hub, ale nejsou zaměřeny na makroskopické houby či jejich plodnice (Sugawara et al. 2016).

3.3.3.1 Biotyping u bakterií

Výhodou metody MALDI-TOF MS při práci s mikroorganismy je, že buňky mohou být přímo bez přípravy vzorku analyzovány během několika minut (Bright et al. 2002). Této přímé analýze se říká IC (intact cell). Buňky jsou převáděny přímo z agaru sterilní kličkou na MALDI destičku nebo z peletu po centrifugaci tekutého média. V jiném případě jsou proteiny z bakterií

extrahovány pomocí různých rozpouštědel, fyzikálních nebo enzymatických metod. Metody přípravy vzorků a použití maticí se laboratoř od laboratoře liší (Šedo et al. 2011).

Mellmann et al. (2008) ve své studii hodnotí metodu identifikace nefermentujících bakterií pomocí MALDI v porovnání s 16S rRNA genové sekvenace. Zároveň byla genová sekvenace jako referenční metoda. Přičemž metoda MALDI–TOF MS se prokázala jako vhodný nástroj pro rutinní detekci, a navíc výsledky ukázaly tuto metodu jako přesnější oproti 16S rRNA genové sekvenaci u druhové identifikace některých druhů. Z celkového počtu známých bakterií (78) bylo pomocí MALDI správně identifikováno 85,9 %, chybně 11,5 % a u 2,6 % nebyla žádná identifikace.

3.3.3.2 Systémy MALDI

Pro identifikaci mikroorganismů jsou dostupné dva komerční systémy MALDI. Bruker Daltronics (Leipzig, Germany) nabízí Microflex LT se softwarem BioTyper. Pak výrobce bioMérieux, který nabízí Vitek MS se softwarem Vitek MS (Deak et al. 2015). Dalším výrobcem je Shimadzu Corporation, který nabízí soupravu Axima se softwarem Shimadzu Launchpad a databází SARAMIS (Cherkaoui et al. 2010).

V porovnávací studii systémů Microflex LT a Vitek MS bylo testováno 477 organismů. V identifikaci těmito systémy nebyl prokázán statisticky významný rozdíl (Deak et al. 2015).

Cherkaoui et al. (2010) ve studii porovnávají systémy Bruker a Shimadzu. Celkový počet identifikovaných organismů byl 720, Bruker správně identifikoval 680 a špatně 6, systém od Shimadzu správně identifikoval 639 a špatně 3. Autoři uvádějí, že pozorované rozdíly mohou být zčásti způsobeny rozdíly v databázích poskytovanými výrobci. V další studii, která porovnává Bruker a Shimadzu/SARAMIS od Justesen et al. (2011) systém Bruker opět identifikoval více organismů správně a více organismů špatně oproti Shimadzu/SARAMIS (celkový počet vzorků byl 290). Podobných výsledků dosáhla i studie od Veloo et al. (2011), která porovnávala tyto dva systémy (Bruker a Shimadzu).

3.3.4 MALDI biotyping u hub

Kromě klinické bakteriologie se MALDI používá v mykologii, v současné době v praxi u kvasinek a vláknitých hub (Singhal et al. 2015). Vzhledem k robustnosti buněčné stěny hub, která obsahuje velké množství polysacharidů, například chitinu, je potřeba buněčnou stěnu rozrušit organickou kyselinou, aby bylo možné získat proteinové spektrum (Chalupová et al. 2014).

Tomé et al. (2019) se ve své studii zabývali identifikací a hmotnostními spektry proteinů u stopkovýtrusných hub (*Basidiomycota*), konkrétně hub z čeledí *Hymenochaetaceae* a *Polyporaceae*. Ve studii byl hodnocen vliv různých postupů extrakce proteinu z mycelia a přímé aplikace buněk na MALDI destičku (metoda IC-intact cell), vliv kultivačního média a stáří kultivovaného mycelia na výsledná spektra. Výsledky byly porovnávány s identifikací na základě morfologických znaků a sekvenací rDNA regionu ITS. Závěry studie ukazují, že MALDI se jeví jako vhodná metoda pro identifikaci na druhové úrovni. Nejvhodnějším postupem přípravy vzorku se překvapivě (vzhledem k robustnosti buněčné stěny hub) ukázalo přímé nanesení neporušených buněk na destičku. Nebyl prokázán vliv kultivačního média. Pro získání kvalitního spektra je podle jejich zkoumání důležité použití čerstvých kultur (stáří 5–10 dní).

Sugawara et al. (2016) uvádějí, že identifikace hub pomocí MALDI je limitována na jejich mycelární podobu. Jsou sice dostupné databáze pro kvasinky a plísně, ale nikdy nebyly takto zkoumány plodnice hub. Až oni ve své studii získávali pomocí MALDI spektra z různých částí plodnic – klobouku, třeně, lupenů. Pro studii bylo sesbíráno 157 vzorků volně rostoucích hub, z nichž byla vytvořena databáze. Dále byly použité houby zakoupené v obchodě s potravinami-*Lentinula edodes*, tři vzorky zakoupené v různých dnech měli shodu $2,50 \pm 0,10$, $n = 3$. Nejlepší spektra byla získána z klobouků. Nasbírané houby byly předběžně identifikovány na základě morfologických znaků a následně bylo na základě DNA sekvenční analýzy identifikováno 134 ze 157 hub na druhové nebo rodové úrovni. Analýzou MALDI bylo správně identifikováno 110 vzorků. Touto metodou se dokázalo úspěšně rozlišit morfologicky i geneticky velmi podobné houby – jedovatá *Hypholoma fasciculare* (třepeňka svazčitá) od jedlé *H. sublateritium* (třepeňka cihlová).

Crossay et al. (2017) uvádějí, že MALDI biotyping je efektivní metoda pro identifikaci arbuskulárně mykorhizních hub – AM hub, dosavadní metody pro identifikace AM hub bylo pozorování morfologických znaků jejich spor a identifikace sekvencí DNA, která umožnila sledování evolučních vztahů AM hub. Ovšem tyto metody se neobejdou bez velmi odborných znalostí a pro rutinní praxi nejsou příliš vhodné. Ve studii bylo pomocí biotypizace MALDI zřetelně identifikováno na druhové úrovni všech 19 vzorků náležitých 14 druhům, 7 rodům a 5 čeledím. Ve studii byla hodnocena i finanční a časová náročnost identifikace vzorku pomocí sekvence DNA a pomocí MALDI viz Obr. 4.

DNA analýza (Sanger)		MALDI-TOF MS	
čas lidské práce	čas bez lidské práce	čas lidské práce	čas bez lidské práce
Doba zpracování			
Extrakce DNA		Extrakce proteinu	
20 min	0 min		
PCR		1 min	5 min
40 min	5 hod		
Klonování		MALDI odběr vzorku	
3-4 hod	1-2 dny		
Sekvenční reakce		10 min	5 min
25 min	4 hod		
Čištění sekvencí		Sběr dat	
30 min	0 hod		
Sanger sekvenování		5 min	1 min
5 min	1 hod		
Celkový čas			
Celkový čas/vzorek		Celkový čas/vzorek	
5-6 hod	34-58 hod	16 min	11 min
Přibližné náklady - chemikálie a materiál			
Cena/vzorek		Cena/vzorek	
s klonováním	17 US \$	3 US \$	
bez klonování	9,5 US \$		
Přibližné náklady na přístrojové vybavení			
95000 US \$		155000 US \$	

Obr. 4 Časová a finanční náročnost metod sekvenování DNA a MALDI na jeden vzorek. Upraveno podle (Crossay et al. 2017).

Lopes et al. (2014) zjišťovali použitelnost identifikace druhů pomocí MALDI na houbové patogeny hmyzu rodu *Metarhizium*. Metodu ověřovali a porovnávali s DNA sekvencí na základě regionu TEF-1 α . Celkem bylo k analýze použito 51 kmenů. Nejdříve vytvořili referenční knihovnu devíti taxonomicky odlišných druhů. Do druhé referenční knihovny byly přidány další dva izoláty. Tato referenční knihovna s 11 taxony umožnila téměř perfektní shodu identifikace druhů MALDI na základě DNA identifikace i pro zbývajících 40 izolátů. MALDI vyhodnocují jako užitečnou metodu obzvláště pro sběr kultur, jen je zapotřebí vytvoření knihovny spekter, což ale není náročné.

Beck et al. (2017) porovnávají metodu ITS-PCR-RFLP s MALDI pro identifikaci dřevokazných hub z rodu *Ganoderma*. Pomocí analýzy MALDI byla získána dobře definovaná

spektra všech zkoumaných druhů s m/z hodnotami v rozmezí 3000 až 15 000, přičemž každý druh měl specifickou m/z hodnotu. Uvádějí, že výsledný dendrogram prokazuje, že analýzou MALDI je možné získat druhově specifická spektra hub rodu *Ganoderma* a následně tak vybrané druhy hub od sebe jednoznačně odlišit.

Použití metody MALDI na odlišení tří rodů dřevokazných hub se již zabývali ve studii Schmidt a Kallow (2005). Rozeznávali rody *Serpula*, *Coniophora* a *Antrodia*. Metoda MALDI úspěšně rozlišila druhy *Serpula himantioides* od *S. lacrymans* i další.

Vzhledem přednostem metody MALDI jako je rychlost, nízká cena a nenáročnost, ji El Karkouri et al. (2019) zkoušeli využít pro rychlou identifikaci hub rodu *Tuber* (lanýžů), u kterých často, vzhledem k jejich ceně, dochází k falšování. Jelikož dochází k falšování mezi druhy stejného rodu, je odhalení náročné. Ve studii bylo identifikováno 34 vzorků lanýžů sesbíraných na různých místech v Evropě a Asii. Vzorky byly nejdříve identifikovány metodou ITS regionů, poté metodou MALDI. MALDI rozlišila všech 7 druhů, celkem bylo špatně identifikováno 26 % vzorků. Při kontrole robustnosti metody byly analyzovány slepé vzorky a porovnávány jak s domácí databází, tak s databází od Bruker. Vzorky byly rychle identifikovány se skóre ≥ 2 . Autoři označili MALDI jako spolehlivou metodou, která by mohla být využívána jak pro kontrolu falšování, tak pro certifikaci lanýžových inokulátů pro aplikaci do ekosystémů.

3.3.4.1 Protokol extrakce proteinu

Ve studiích se objevují různé protokoly pro extrakci proteinu ze vzorku i hodnocení různých protokolů mezi sebou. Již bylo zmíněno, že ve své studii Tomé et al. (2019) vyhodnotili jako nejlepší způsob nanesení neporušených buněk přímo – metoda IC (intact cell), tato metoda byla použita i u studie rozlišující dřevokazných hub od Schmidt a Kallow (2005). Tomé et al. (2019) IC porovnávali s dalšími protokoly jako je například příprava vzorku podle Bruker Daltonics – extrakce pomocí etanolu a kyseliny mravenčí (FA) nebo extrakce pomocí kyseliny trifluoroctové (TFA). Beck et al. (2017) ve své již dříve zmiňované studii použili obohacený protokol extrakce pomocí etanolu a FA podle Bruker Daltonics, s tím, že mycelium suspendované v destilované vodě inkubovali 5 min při teplotě 95 °C.

Taktéž Lopes et al. (2014) použili pro přípravu etanol a FA, vzorek přenesli do mikrozkuhavky do 75% etanolu, nejdříve směs promíchali vortexováním, poté centrifugovali 2 min a odebrali supernatant, na vzduch usušený pelet byl uchováván v mrazu do doby použití. Pro analýzu vzorku bylo k peletu napipetováno 50 μ L FA (70%), vortexováno 1 min a vloženo na 15 min do ultrazvukové lázně. Přidáno stejné množství acetonitrilu (100%)

a byl zopakován proces vortexování a ultrazvuku. Supernatan byl zředěn deionizovanou vodou (1 : 10) a 1 μL supernatantu bylo nanášeno na spot destičky.

Sugawara et al. (2016) použili jako biologický materiál klobouk houby nebo nohu z plodnice. Skalpelem byl odebrán vzorek o rozměrech 5 mm³. V uzavíratelné zkumavce byl vzorek smíchán s 400 μL směsi FA a acetonitrilu v poměru 1 : 1, byly přidány skleněné kuličky – 300 mg kuliček o průměru 0,1 mm a 2 kuličky o průměru 5 mm. Vzorek byl homogenizován při 2000 r.min⁻¹ po dobu 3 min v laboratorním mixéru. Poté centrifugován při maximálních otáčkách po dobu 2 min. Přibližně 50 μL vzniklého supernatantu bylo převedeno do nové zkumavky, takto připravený vzorek je připraven k aplikaci na destičku.

4 Metodika

Cílem práce byla optimalizace metody extrakce vzorku pro identifikaci hub rodu *Pleurotus*. Pomocí MALDI je identifikováno proteinové spektrum organismu. Metoda je v praxi aplikovaná při identifikaci bakterií, proto se používá metoda IC, u složitějších organismů, které mají složitější buňku, je přistupováno k extrakci pomocí organických kyselin jako je kyselina mravenčí a kyselina trifloroctová. V literatuře je dohledatelných několik protokolů extrakce (Beck et al., 2017; Tomé et al., 2019; Sugawara et al., 2016), které se liší buď použitím rozlišných již zmíněných kyselin, inkubační vzorku při vysokých teplotách, či metodami homogenizace vzorku v extrakčním činidle.

V praktické části diplomové práce jsou porovnávány různé protokoly, 2 protokoly s nejlepší opakovatelností a přesností jsou dále použity pro vytvoření domácí knihovny spekter pro druhy, případně kmeny, hub rodu *Pleurotus*.

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

Pro analýzu bylo k dispozici celkem 55 kmenů 8 různých druhů hub rodu *Pleurotus*. Jedná se o druhy *Pleurotus eryngii* (hlíva máčková), *P. ostreatus* (hlíva ústříčná), *P. calyptratus* (hlíva čepičkatá) *P. djamor* (hlíva růžová), *P. cornucopiae* (hlíva miskovitá), *P. cystidiosus*, *P. dryinus* (hlíva dubová), *P. pulmonarius* (hlíva plicní). Houby byly namnoženy na pěstebním agaru ze Sbírký kultur basidiomycetů (CCBAS – Culture Collection of Basidiomycetes) uchovávaných v Mikrobiologickém ústavu AV ČR. Přehled kmenů v Tab. 1.

Tab. 1 Přehled analyzovaných druhů

Číslo kmenu ze sbírky	Rod	Druh	Číslo kmenu ze sbírky	Rod	Druh
CCBAS238	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>	CCBAS515	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS278	<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>	CCBAS518	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS450	<i>Pleurotus</i>	<i>calyptratus</i>	CCBAS519	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS459	<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>	CCBAS544	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS461	<i>Pleurotus</i>	<i>djamor</i>	CCBAS564	<i>Pleurotus</i>	<i>cornucopiae</i>
CCBAS462	<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>	CCBAS354	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS463	<i>Pleurotus</i>	<i>cornucopiae</i>	CCBAS637	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS464	<i>Pleurotus</i>	<i>cornucopiae</i>	CCBAS652	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS465	<i>Pleurotus</i>	<i>cornucopiae</i>	CCBAS666	<i>Pleurotus</i>	<i>djamor</i>
CCBAS466	<i>Pleurotus</i>	<i>cystidiosus</i>	CCBAS675	<i>Pleurotus</i>	<i>cornucopiae</i>
CCBAS467	<i>Pleurotus</i>	<i>dryinus</i>	CCBAS684	<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>
CCBAS468	<i>Pleurotus</i>	<i>dryinus</i>	CCBAS685	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS469	<i>Pleurotus</i>	<i>dryinus</i>	CCBAS687	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS470	<i>Pleurotus</i>	<i>dryinus</i>	CCBAS691	<i>Pleurotus</i>	<i>citrinopileatus</i>
CCBAS471	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>	CCBAS692	<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>
CCBAS472	<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>	CCBAS734	<i>Pleurotus</i>	<i>djamor</i>
CCBAS473	<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>	CCBAS741	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS474	<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>	CCBAS747	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS475	<i>Pleurotus</i>	<i>pulmonarius</i>	CCBAS754	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS476	<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>	CCBAS757	<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>
CCBAS477	<i>Pleurotus</i>	<i>cornucopiae</i>	CCBAS766	<i>Pleurotus</i>	<i>ostreatus</i>
CCBAS478	<i>Pleurotus</i>	<i>pulmonarius</i>	CCBAS785	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS480	<i>Pleurotus</i>	<i>pulmonarius</i>	CCBAS789	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS481	<i>Pleurotus</i>	<i>pulmonarius</i>	CCBAS815	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS485	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>	CCBAS819	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS502	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>	CCBAS830	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS503	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>	CCBAS831	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>
CCBAS507	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>	CCBAS843	<i>Pleurotus</i>	<i>eryngii</i>

Vzorky byly nejdříve kultivovány v termoboxu při 25 °C, poté skladovány v lednici při teplotě 4 °C. K analýze byl použit nárůst mycelia v petriho miskách na agaru.

4.2 MALDI analýza

V rámci snahy o optimalizaci metody bylo vyzkoušeno několik protokolů extrakce, většinou metody z přehledu literatury a jejich mírné modifikace. Byl testován protokol extrakce pomocí TFA, extrakce etanolem a FA bez homogenizace vzorku, extrakce etanolem a FA s homogenizací vzorku a metoda přímého nanesení buněk mycelia na terčik.

4.2.1 Chemikálie

Pro přípravu vzorků dle různých protokolů, pro kalibraci a přípravu roztoku matrice byly použity tyto chemikálie, pro hmotnostní spektrometrii je důležité použití chemikálií při maximální čistotě.

Acetonitril 100%, Honeywell

Etanol 96%, VWR Chemicals

Mravenčí kyselina (FA), Acros organics

α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CHCA), Sigma-Aldrich

Trifluoroctová kyselina (TFA), Sigma-Aldrich

Ultra čistá voda, Mili-Q systém

4.2.2 Vybavení laboratoře

Vír – vortexer RS-VF 10, Pheonix Instrument

Centrifuga mini spin plus, Eppendorf

Oscilační mlýn MM 200, Retsch

MALDI destička MTP ground steel, Bruker

Automatické pipety research plus (0,1-2,5 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L), Eppendorf

MALDI-TOF Autoflex speed, Bruker

4.3 Optimalizace extrakce

Při prvních zkušebních měřeních byly na třech různých náhodně vybraných vzorcích ze sbírky vyzkoušeny 4 extrakční protokoly – kyselinou mravenčí s homogenizací v mlýně a bez homogenizace, kyselinou trifluoroctovou s homogenizací v mlýně a bez homogenizace. Pro každý vzorek ve třech opakováních.

Pro analýzu všech vzorků pro tvorbu knihovny spekter byla dále aplikována extrakční metoda FA s homogenizací vzorku v oscilačním mlýně a metoda přímého přenosu buněk.

4.3.1 Extrakční protokol

4.3.1.1 Extrakce etanolem a kyseliny mravenčí

Tento protokol vychází z návodu od Bruker pro přípravu vzorků pro identifikaci mikroorganismů. Do čisté mikrozkušavky typu Eppendorf (2 mL) bylo napipetováno 300 μL destilované vody. Z petriho misky bylo do zkumavky skalpelem odebráno cca 5 mm^3 mycelia. Vzorek byl s vodou vortexován po dobu jedné minuty. Následně bylo přidáno 900 μL etanolu a vortexováno cca 30 vteřin. Centrifugováním po dobu 2 minut při maximálních otáčkách se vzorek usadil na dně a supernatant slit. Po dalším centrifugování bylo odpipetováno zbylé množství supernatantu a pelet byl ponechán 30 min schnout při laboratorní teplotě. Po vyschnutí bylo k peletu napipetováno 30 μL 70% FA, krátce vortexováno a přidáno stejné množství 100% acetonitrilu. Ke vzorku s extrakčním činidlem byla vložena zirkonová kulička o průměru 12 mm, mikrozkušavka byla vložena do teflonové kapsle oscilačního mlýnu. Vzorek byl takto homogenizován při frekvenci 20 Hz po dobu 3 minut. Posledním krokem byla centrifugace po dobu 2 minut při maximálních otáčkách. Vzniklý supernatant byl co nejdříve přenesen na destičku, nebo odpipetován do čisté mikrozkušavky a použit v stejném dni.

Při optimalizaci metody byl vyzkoušen i protokol, kdy vzorek nebyl s FA a acetonitrem homogenizován v oscilačním mlýně, pouze promísen vortexováním.

Supernatant byl nanesen na 8 spotů (po 1 μL) na destičku kolem kalibračního bodu. Po zaschnutí byl spot překryt 1 μL připravené matrice.

4.3.1.2 Přímé nanesení buněk – Intact cell

Druhý protokol je poněkud jednodušší, bylo použito pouze párátko balené po jednom kuse. Párátkem bylo odebráno mycelium z petriho misky a bylo nanesen na 8 spotů destičky kolem kalibračního bodu. Mycelium bylo aplikováno tak, aby na destičce byl vidět povlak mycelia. Vzorek byl následně překryt 1 μL matrice.

4.3.1.3 Extrakce kyselinou trifluoroctovou

Při optimalizaci metody byl vyzkoušen i protokol extrakce pomocí TFA. K očištěnému vzorku v etanolu a po vysušení vzorku při laboratorní teplotě, jako v předešlém protokolu extrakce, byl přidán 80% vodný roztok TFA. Vyzkoušeny byly opět obě metody, jak metoda s homogenizací v mlýně, tak promísení vortexováním.

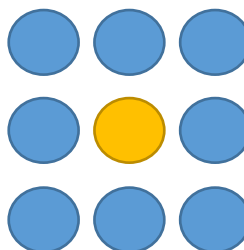
4.3.1.4 Matrice

Když byl připravený vzorek nanesen na terčík destičky, tak byl ihned po uschnutí překryt 1 μL matrice. Pro tuto analýzu byl jako matrice použit nasycený roztok kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CHCA) v organickém rozpouštědle (OR). Pro 1 mL OR je zapotřebí 500 μL acetonitrilu, 475 μL destilované vody a 25 μL TFA. Tekutiny jsou v tomto pořadí napipetovány do mikrozkuřavky a vortexováním promíchány. Pro přípravu nasyceného roztoku HCCA je potřeba navážit HCCA a přidat odpovídající množství OR (1 mg: 10 μL).

4.3.1.5 Kalibrace

Metoda MALDI biotyper s detektorem TOF zaznamenává hmotnost proteinů pomocí doby letu iontů, tato doba letu se pak pomocí kalibračních konstant přepočítá na hmotnost jednotlivých proteinů. Na dobu letu a tím pádem i na kalibrační konstanty má vliv například teplota, stabilita zdrojů napětí v přístroji a další. Proto je důležité ideálně před každým měřením kalibrovat.

Součástí našeho měření byla kalibrace pro každý vzorek, podle kalibračního schéma, kdy jeden vzorek byl nanesen na 8 terčíků destičky kolem jednoho kalibračního bodu – podle kalibračního schéma (**Obr. 5**). Pro kalibraci byl použit Bruker Bacterial Standard (Part No. 8255343), který byl rozpuštěn v 50 μL OR.



Obr. 5 Kalibrační schéma

4.4 Měření a vyhodnocení

Destička s připravenými vzorky byla vložena do přístroje MALDI Autoflex speed a v programu flexControl bylo spuštěno automatické měření podle nastavení 2000 výstřelů na terčík a byla získávána spektra v rozpětí 2000-20000 Da. Ze získaných spekter bylo v programu MALDI Biotyper Compass Explorer vytvořeno jedno hlavní referenční spektrum (MSP) pro každý vzorek. Předtím byla provedena úprava spekter. V jednom kroku „Batch procesing“ byly provedeny všechny dostupné úpravy a to – vyhlazení šumu, srovnání

se základní linií, normalizace a peak picking. Získaná MSP spektra pak byla ukládána a pomocí nich byla vytvořena domácí knihovna.

Dále byla v biotyperu používána funkce identifikace, kdy na základě MSP spekter v domácí databázi a MSP či hrubého spektra neznámého nebo kontrolního vzorku bylo vypočítáno logaritmické skóre shody. Maximální skóre je 3, skóre ≥ 2.0 lze považovat za pravděpodobnou klasifikaci.

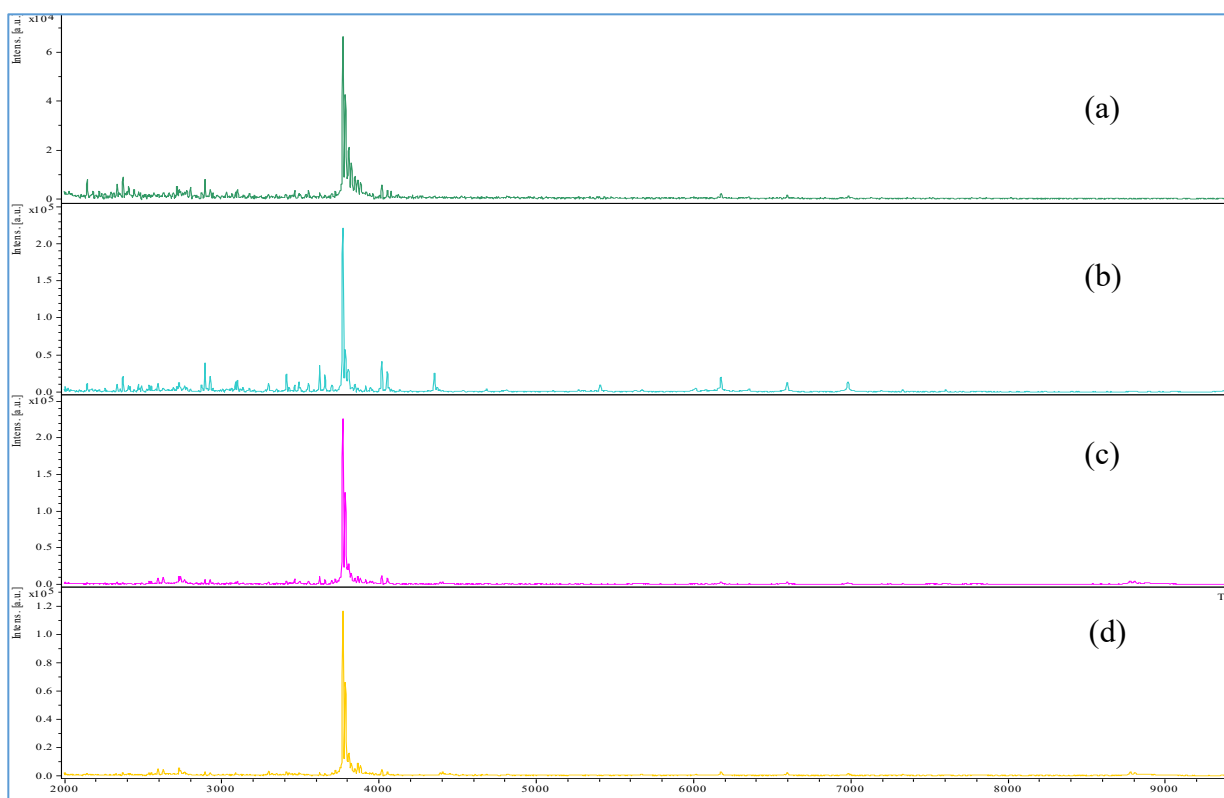
Tab. 2 Význam hodnot skóre podle Bruker Biotyperu

Rozsah loq skóre	Význam
2,300 – 3,000	Vysoká pravděpodobnost identifikace druhu
2,000 – 2,299	Spolehlivá identifikace rodu, pravděpodobnost identifikace druhu
1,700 -1,999	Pravděpodobná identifikace rodu
0,000 - 1,699	Nespolehlivá identifikace

5 Výsledky

5.1 Výsledky optimalizace extrakce

Různé protokoly extrakce ovlivnily kvalitu spekter. Spektra vzorků extrahovaných v TFA byla příliš plochá, byl zachován pouze dominantní pík spektra, kdyžto při extrakci FA jsou zřetelné i jiné píky typické pro daný druh. Nejvyšší spektra a nejvíce opakovatelná spektra byla získána extrakcí FA s homogenizací v mlýně a spektra získaná přímým přenosem. Spektra extrahovaných vzorků k porovnání na Obr. 6.



Obr. 6 Spektra vzorku *Pleurotus ostreatus* CCBAS 459 získaná různými metodami extrakce. (a)FA (b)FA + mlýn (c)TFA (d)TFA + mlýn

5.2 Validace a verifikace metody

Pro analýzu všech vzorků byly použity dvě metody přípravy vzorku, extrakce etanolem a kyselinou mravenčí s homogenizací vzorků v oscilačním mlýně, což je modifikací univerzálního protokolu extrakce používané např. u kvasinek a metoda přímého přenosu buněk, která je používána u bakterií.

Obě metody byly validovány a verifikovány u vybrané série vzorků pomocí intraday a interday variability. Pro robustnost MALDI analýzy byly porovnány shody mezi odlišnými protokoly přípravy vzorků. K validaci metody byla dále použita analýza slepých vzorků.

Intraday variabilita byla zjišťována měřením 8 spotů stejného vzorků 3krát v rámci jednoho dne u 17 vybraných vzorků, které bylo úspěšné. Pro účel zjištění opakovatelnosti přípravy vzorku, v rámci interday variability, byla porovnána spektra získaná v různých dnech pro obě metody přípravy. Byly dodrženy stejné postupy a podmínky.

Tab. 3 Porovnání vybraných vzorků s vytvořenou domácí databází (pro metodu extrakce kyseliny mravenčí)

Vzorek (ext FA)	Shoda s databází (extrakce FA)				
<i>Pl. calyptratus</i> CCBAS450	<i>Pl. calyptratus</i> CCBAS450	<i>Pl. djamor</i> CCBAS461	<i>Pl. djamor</i> CCBAS666	<i>Pl. djamor</i> CCBAS734	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS485
	2,240	2,160	1,420	1,380	1,360
<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS463	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS463	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS675	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS464	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS465	<i>Pl. calyptratus</i> CCBAS450
	2,260	2,040	1,950	1,770	1,760
<i>Pl. cystidiosus</i> CCBAS466	<i>Pl. cystidiosus</i> CCBAS 466	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS518	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS754	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS687	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS485
	2,080	1,570	1,520	1,490	1,490
<i>Pl. djamor</i> CCBAS461	<i>Pl. djamor</i> CCBAS461	<i>Pl. calyptratus</i> CCBAS450	<i>Pl. djamor</i> CCBAS666	<i>Pl. djamor</i> CCBAS734	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS465
	2,380	1,960	1,770	1,750	1,270
<i>Pl. dryinus</i> CCBAS467	<i>Pl. dryinus</i> CCBAS467	<i>Pl. dryinus</i> CCBAS469	<i>Pl. dryinus</i> CCBAS470	<i>Pl. dryinus</i> CCBAS468	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS476
	2,300	2,130	1,920	1,690	1,390
<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS757	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS766	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS476	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS757	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS462	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS459
	2,060	2,060	2,040	1,950	1,820
<i>Pl. eryngii</i> CCBAS 685	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS819	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS747	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS741	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS238	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS685
	2,490	2,460	2,410	2,390	2,290
<i>Pl. pulmonarius</i> CCBAS480	<i>Pl. pulmonarius</i> CCBAS480	<i>Pl. Pulmonarius</i> CCBAS478	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS459	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS741	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS789
	2,190	1,930	1,780	1,710	1,610

Tab. 4 Porovnání vybraných vzorků s vytvořenou domácí databází (pro metodu přímého přenosu)

Vzorek (IC)	Shoda s databází (IC)				
<i>Pl. calyptratus</i> CCBAS450	<i>Pl. calyptratus</i> CCBAS450	<i>Pl. djamor</i> CCBAS461	<i>Pl. djamor</i> CCBAS666	<i>Pl. djamor</i> CCBAS734	<i>Pl. pulmonarius</i> CCBAS480
	2,41	2,27	1,83	1,73	1,19
<i>Pl. cornucocopiae</i> CCBAS463	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS463	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS675	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS464	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS465	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS502
	2,34	2,26	2,12	1,8	1,29
<i>Pl. cystidiosus</i> CCBAS466	<i>Pl. cystidiosus</i> CCBAS 461	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS830	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS515	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS519	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS518
	2,58	1,19	1,16	1,06	1,03
<i>Pl. djamor</i> CCBAS461	<i>Pl. djamor</i> CCBAS461	<i>Pl. calyptratus</i> CCBAS450	<i>Pl. djamor</i> CCBAS666	<i>Pl. djamor</i> CCBAS734	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS747
	2,46	2,33	2,05	1,8	0,93
<i>Pl. dryinus</i> CCBAS467	<i>Pl. dryinus</i> CCBAS467	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS463	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS754	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS502	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS467
	2,5	1,38	1,36	1,34	1,32
<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS757	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS462	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS476	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS757	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS766	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS684
	2,62	2,55	2,49	2,36	2,08
<i>Pl. eryngii</i> CCBAS 685	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS831	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS843	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS819	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS502	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS685
	2,44	2,43	2,4	2,37	2,25

Metodou přímého přenosu bylo dosaženo vyšších skóre shody, ne jenom u stejných vzorků, ale celkově. Z metody přímého přenosu je dosaženo vyšší homogenity spekter.

5.2.1 Robustnost metody MALDI

U všech vzorků byla získána 2 MSP spektra, která vznikla za odlišných podmínek přípravy vzorku. Jedna sada MSP spekter vznikla ze vzorků, které byly naneseny na terčík destičky přímo z petriho misky párátkem. Druhá sada vznikla ze vzorků, které byly nejprve čištěny etanolem a poté extrahovány do kyseliny mravenčí a acetonitrilu, na destičku byl už aplikován jen supernatant po extrakci. Pro zjištění robustnosti MALDI byla porovnána MSP spektra z obou příprav. U porovnávání spekter docházelo k vysokým hodnotám skóre shody. V Tab. 5 jsou znázorněny shody MSP spekter IC metody s knihovnou MSP spekter metody

extrakce FA pro vybrané vzorky 8 analyzovaných druhů. U všech vzorků došlo ke správné identifikaci na druhové úrovni, u některých i rozlišení v rámci druhů (viz 5.5).

Tab. 5 Výsledná skóre z porovnání MSP spekter přímého přenosu a extrakce kyseliny mravenčí

Vzorek (IC)	Shoda s databází (extrakce FA)				
<i>Pl. calyptratus</i> CCBAS450	<i>Pl. calyptratus</i> CCBAS450	<i>Pl. djamor</i> CCBAS461	<i>Pl. djamor</i> CCBAS666	<i>Pl. djamor</i> CCBAS734	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS462
	2,290	2,010	2,010	1,940	1,060
<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS463	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS463	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS464	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS675	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS465	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS238
	2,380	2,120	2,090	1,590	1,340
<i>Pl. cystidiosus</i> CCBAS466	<i>Pl. cystidiosus</i> CCBAS 466	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS785	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS503	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS507	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS471
	2,220	1,380	1,300	1,270	1,200
<i>Pl. djamor</i> CCBAS666	<i>Pl. djamor</i> CCBAS666	<i>Pl. djamor</i> CCBAS734	<i>Pl. djamor</i> CCBAS461	<i>Pl. calyptratus</i> CCBAS450	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS476
	2,570	2,390	1,950	1,550	0,960
<i>Pl. dryinus</i> CCBAS469	<i>Pl. dryinus</i> CCBAS469	<i>Pl. dryinus</i> CCBAS468	<i>Pl. dryinus</i> CCBAS470	<i>Pl. dryinus</i> CCBAS467	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS766
	2,530	2,370	2,360	1,760	1,330
<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS474	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS474	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS472	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS692	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS684	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS843
	2,350	2,250	2,120	2,050	1,930
<i>Pl. eryngii</i> CCBAS471	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS471	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS515	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS652	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS785	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS507
	2,540	2,460	2,360	2,340	2,280
<i>Pl. pulmonarius</i> CCBAS481	<i>Pl. pulmonarius</i> CCBAS481	<i>Pl. Pulmonarius</i> CCBAS478	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS843	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS637	<i>Pl. eryngii</i> CCBAS747
	2,430	1,540	1,410	1,320	1,290

5.2.2 Analýza slepých vzorků

Byly náhodně vybrány 3 vzorky ze sbírky hub a bylo zaznamenáno pořadové číslo vzorku pro zpětnou kontrolu. Z obou získaných sad MSP spekter byly vytvořeny dvě knihovny. Slepé

vzorky byly připraveny k analýze oběma metodami, byla získána spektra a ta pak byla v programu Biotyper identifikovány podle vytvořených knihoven. U všech vzorků i v obou provedení bylo dosaženo spolehlivé identifikaci na druhové úrovni, nebylo dosaženo správné identifikaci na úrovni kmenů. Výsledky identifikace zaznamenány v Tab. 6 a Tab. 7.

Tab. 6 Identifikace neznámých vzorků podle domácí knihovny u metody extrakce kyselinou mravenčí.

Neznámý vzorek	Shoda s databází (extrakce FA)					Vzorek podle čísla ze sbírky
1 (vzorek číslo 6)	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS465	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS464	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS463	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS675	<i>Pl. dryinus</i> CCBAS467	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS464
	2,390	2,190	2,120	2,020	1,350	
2 (vzorek číslo 17)	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS473	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS757	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS476	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS474	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS477	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS692
	2,310	2,110	2,010	1,950	1,710	
3 (vzorek číslo 32)	<i>Pl. djamor</i> CCBAS666	<i>Pl. djamor</i> CCBAS734	<i>Pl. djamor</i> CCBAS461	<i>Pl. calyptratus</i> CCBAS450	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS692	<i>Pl. djamor</i> CCBAS461
	2,660	2,540	2,320	1,770	0,930	

Tab. 7 Identifikace neznámých vzorků podle domácí knihovny u metody přímého přenosu.

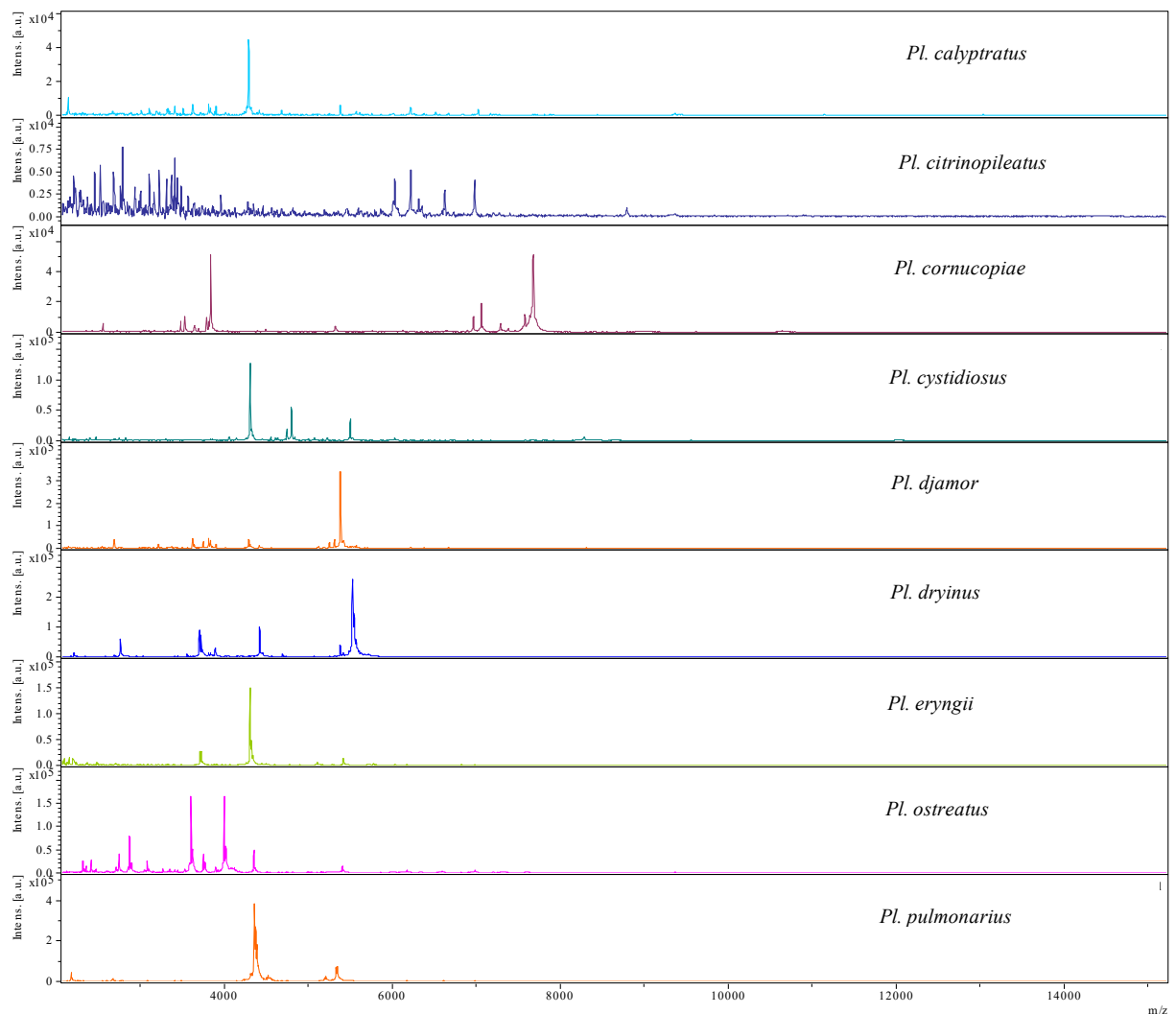
Neznámý vzorek	Shoda s databází (IC)					Vzorek podle čísla ze sbírky
1 (vzorek číslo 6)	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS465	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS464	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS675	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS463	<i>Pl. citrinopileatus</i> CCBAS691	<i>Pl. cornucopiae</i> CCBAS464
	2,340	2,200	2,150	1,790	1,150	
2 (vzorek číslo 17)	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS473	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS278	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS476	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS472	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS692	<i>Pl. ostreatus</i> CCBAS692
	2,520	2,460	2,100	2,030	2,030	
3 (vzorek číslo 32)	<i>Pl. djamor</i> CCBAS666	<i>Pl. djamor</i> CCBAS734	<i>Pl. djamor</i> CCBAS461	<i>Pl. calyptratus</i> CCBAS450	<i>Pl. pulmonarius</i> CCBAS692	<i>Pl. djamor</i> CCBAS461
	2,650	2,550	2,100	2,050	1,120	

5.3 Ověření databáze

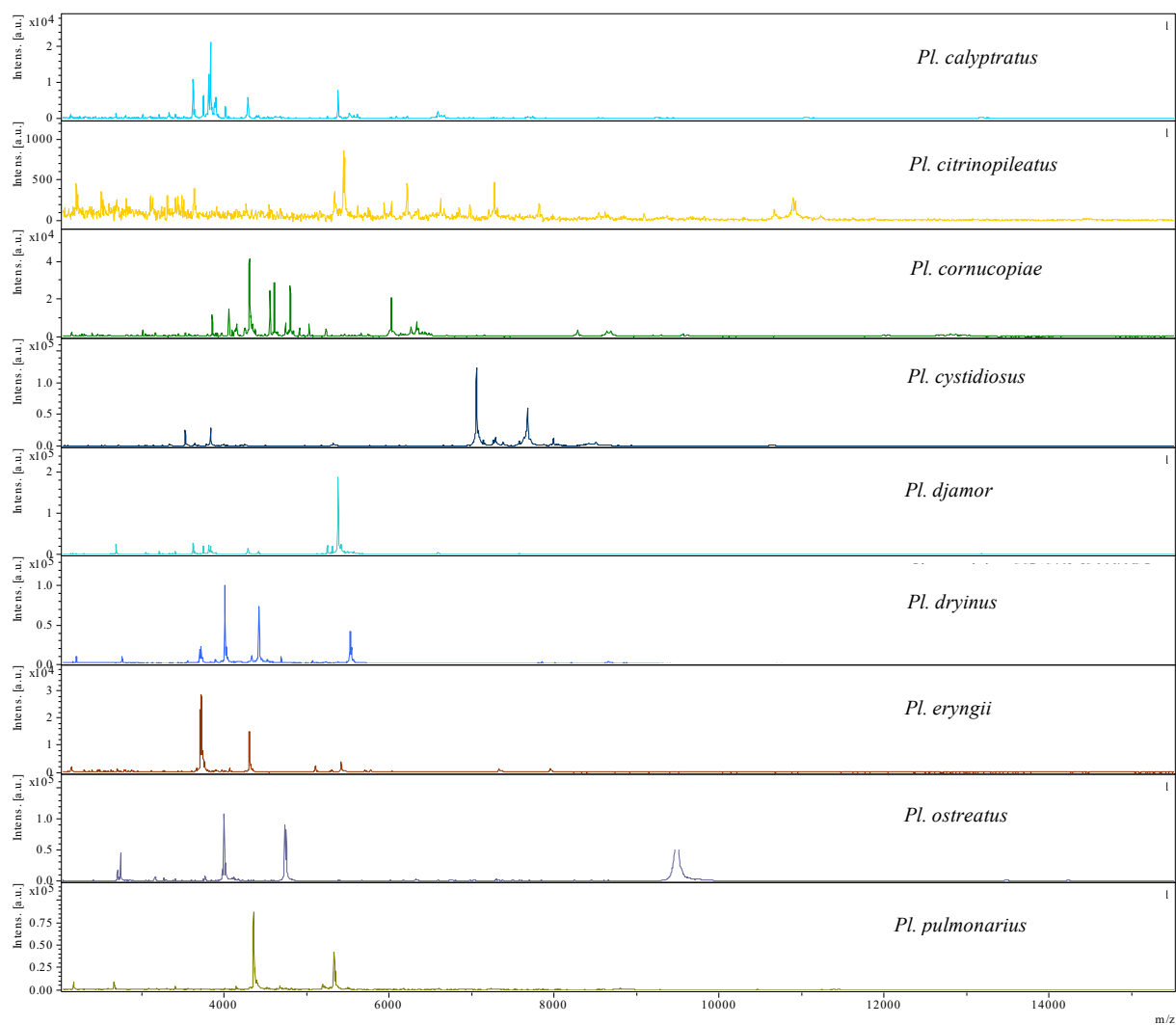
V rámci této práce byly vytvořené dvě domácí databáze pro 56 kmenů rodu *Pleurotus*. Pro ověření, jestli se daná spektra neshodují s již dostupnou databází hub, jsme námi získané MSP spektra porovnali s databází vláknitých dostupnou pro Biotyper, knihovna „Filamentous Fungi library 1.0“ obsahuje 365 MSP spekter. Při porovnání s námi získanými MSP spektry nebylo dosaženo vyššího log skóre než 1,4.

5.4 Druhová identifikace rodu *Pleurotus*

V rámci rodu *Pleurotus* bylo analyzováno 56 různých kmenů, které náležely 9 druhům. Na základě opětovné analýzy některých vzorků bylo ověřeno, že je postup opakovatelný. Mezi jednotlivými druhy byly znatelně rozdílné dominantní píky a spektra celkově, při jejich zpětné identifikaci dle získaných MSP spekter docházelo k jednoznačnému rozlišení na druhové úrovni.

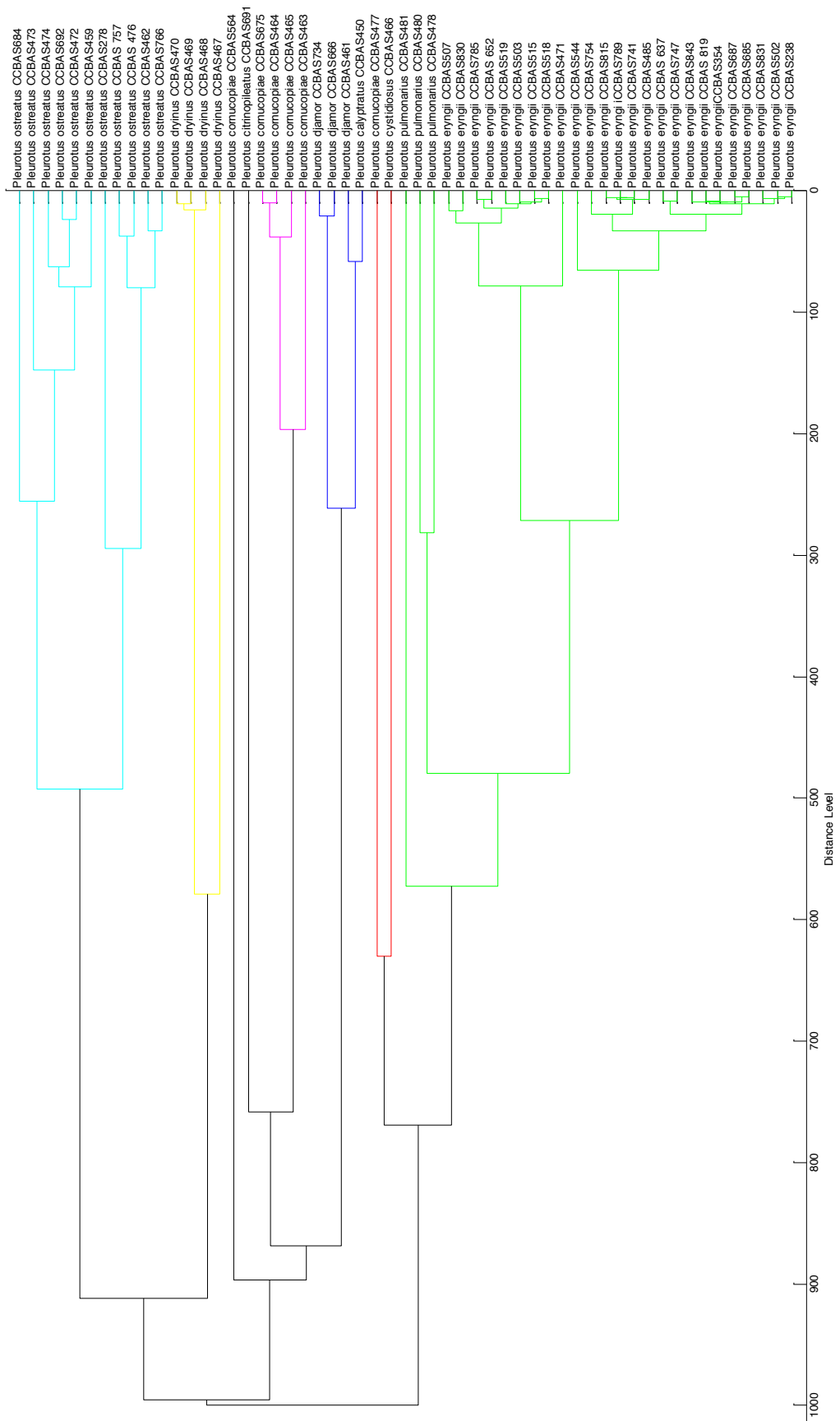


Obr. 7 Přehled spekter 8 různých analyzovaných druhů rodu *Pleurotus* získaných po přímém přenosu buněk na destičku.



Obr. 8 Přehled spekter 8 různých analyzovaných druhů rodu *Pleurotus* získaných po extrakci FA s homogenizací.

Podle shlukové analýzy získaných MSP spekter byl vytvořen dendrogram Obr. 9, který znázorňuje příbuznost jednotlivých kmenů a odlišnost různých druhů.



Obr. 9 Dendrogram všech analyzovaných vzorků. Vytvořeno podle základního nastavení Biotyperu.

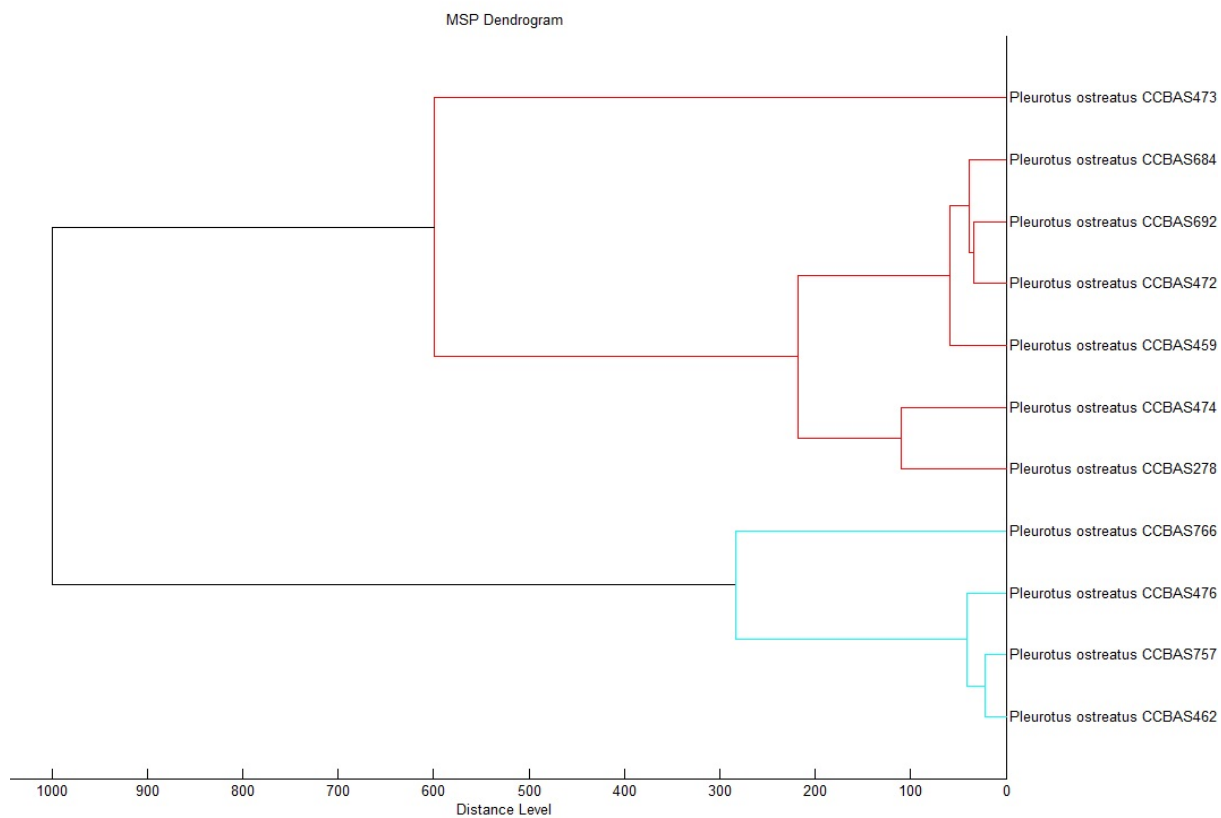
5.5 Identifikace v rámci druhu

Předmětem analýzy bylo několik kmenů od každého druhu, v Tab. 8 jsou zpracované výsledky porovnání MSP spekter obou metod a na základě shody zjištěna úspěšnost pro identifikaci druhu s mezní hodnotou logaritmického skóre 2,299, kterou výrobce určuje jako spolehlivou, v tomto rozmezí byla druhová shoda u 71 % vzorků, při mezní hodnotě logaritmického skóre 1,7 pak u 100 % vzorků. Správná identifikace kmenu při mezní hodnotě 1,7, to znamená, že kmen byl vyhodnocen na prvním místě s nejvyšší shodou, byla u 51 % vzorků.

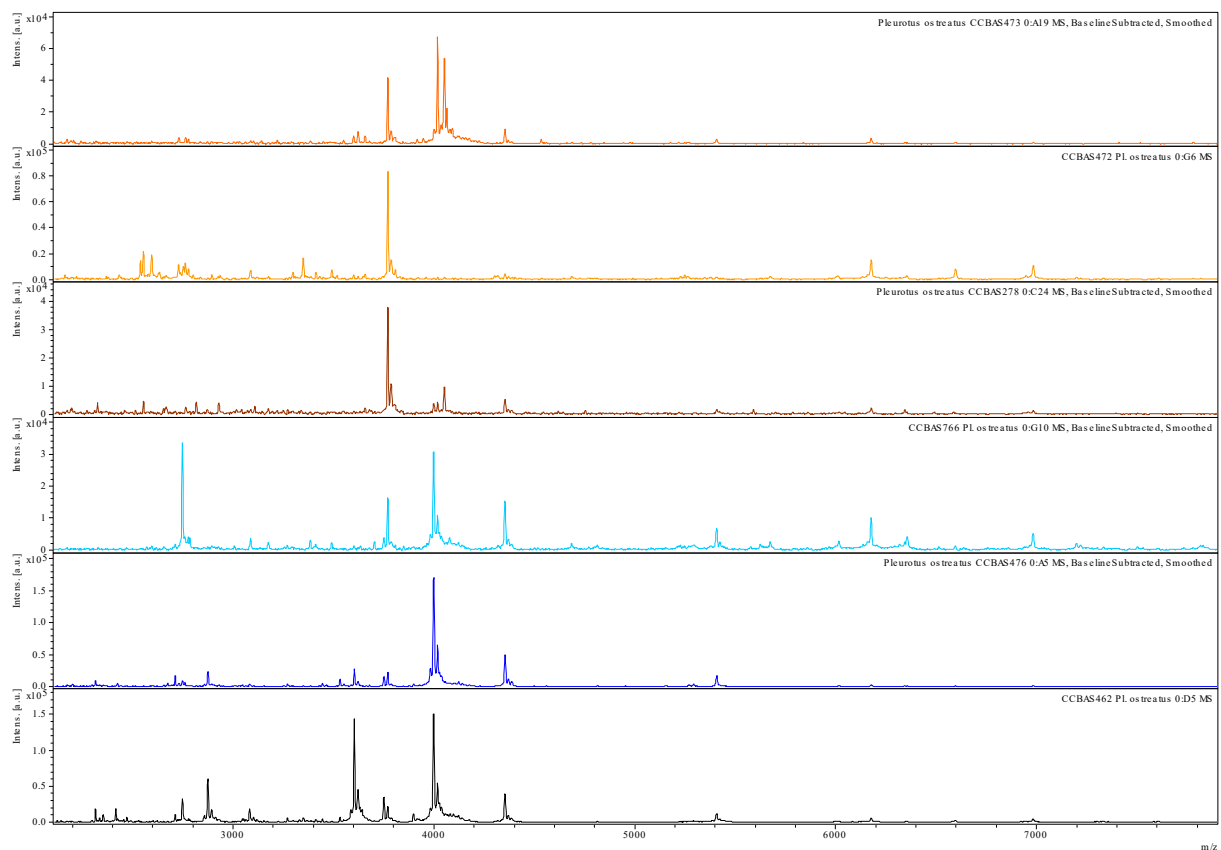
Tab. 8 Výsledky porovnání dvou sad MSP spekter.

Druh	Počet kmenů	Identifika druhu mezní hodnota 2,299	Identifikace druhu mezní hodnota 1,7	Správná identifikace kmenu (mez 1,7)
<i>Pl. calyptratus</i>	1	1	1	1
<i>Pl. citrinopileatus</i>	1	0	1	1
<i>Pl. cornucopiae</i>	6	1	6	5
<i>Pl. cystidiosus</i>	1	0	1	1
<i>Pl. djamor</i>	3	3	3	3
<i>Pl. dryinus</i>	4	3	4	3
<i>Pl. eryngii</i>	25	25	25	7
<i>Pl. ostreatus</i>	11	4	11	4
<i>Pl. pulmonarius</i>	3	2	3	3
Celkem	55	39 (71 %)	55 (100 %)	28 (51 %)

V dendrogramu Obr. 10 je viditelná podobnost kmenů *Pleurotus ostreatus* podle vytvořených MSP spekter, na Obr. 11 jsou vybraná spektra těchto kmenů pro znázornění rozdílů a podobností.



Obr. 10 Dendrogram na základě MSP spekter kmenů *Pleurotus ostreatus*.



Obr. 11 Přehled spekter vybraných kmenů *Pleurotus ostreatus*.

6 Diskuze

Houby jsou převážně konzumovány kvůli jejich dietnímu složení, kvalitním bílkovinám, obsahu minerálních látek a hlavně bioaktivním látkám jako jsou beta glukany, kterým je přisuzován velmi pozitivní vliv na zdraví člověka (Manzi a Pizzoferrato 2000; Bach et al. 2017; Li et al. 2017). Různé rody a také druhy mají rozlišný obsah žádaných látek a tak se liší jejich účinky na lidský organismus (Manzi a Pizzoferrato 2000; Adebayo et al. 2018). Jiné houby jsou zase konzumovány kvůli jejich chuti, například houby rodu *Tuber* (lanýži) jsou velice luxusním zbožím a tak dochází k falšování (El Karkouri et al. 2019). Některé jedlé žádané houby mohou být relativně snadno zaměněny s jedovatými druhy (Hebert et al. 2003; Shimomura et al. 2008). Vzhledem k těmto důvodům je důležité, aby byla co nejrychlejší a nejdostupnější metoda správné identifikace druhu.

V současnosti je nejvíce používána metoda určování podle taxonomického klíče a metod na základě DNA (Hebert et al. 2003; Sugawara et al. 2016; Crossay et al. 2017; El Karkouri et al. 2019), autoři se ovšem shodují, že tyto metody jsou finančně i časově náročné, rovněž jsou náročné na odbornost personálu. Sugawara et al. (2016) si připisují prvenství v analýze hub pomocí MALDI, uvádějí, že tato metoda byla zatím úspěšně aplikována pouze na vláknité houby a kvasinky (Chalupová et al. 2014; De Carolis et al. 2014). Ovšem Schmidt a Kallow (2005) už dávno před nimi úspěšně použili MALDI pro rozlišení dřevokazných hub, na rozdíl od Sugawara et al. (2016), kteří pracovali s plodnicemi, analyzovali vzorky mycelia. Crossay et al. (2017) jako první přicházejí s alternativní metodou identifikace u arbuskomykorhizních hub na základě proteomiky pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI – TOF. Obě studie potvrzují hypotézu, že houby lze identifikovat metodou MALDI.

MALDI je v praxi běžně používaná pro identifikaci bakterií a kvasinek (Sugawara et al. 2016; Tomé et al. 2019) u kterých jsou ověřené protokoly přípravy vzorků. Identifikace hub je zatím ve fázi studií s vytvářením domácích databází a porovnávání metody s DNA sekvenováním, přičemž se zpravidla drží protokolu extrakce etanolem a kyselinou mravenčí v různých modifikacích (Sugawara et al. 2016; Crossay et al. 2017; Beck et al. 2017; El Karkouri et al. 2019). Ovšem Tomé et al. (2019) porovnávají různé protokoly extrakce, jako tomu bylo v této diplomové práci. Ve studii zkoušeli extrakci kyselinou mravenčí s homogenizací, extrakci kyselinou trifluoroctovou s homogenizací a metodu přímého přenosu buněk. V této diplomové práci i ve studii Tomé et al. (2019) byla získána nejkvalitnější hmotnostní spektra metodou přímého přenosu buněk na terčík destičky. Metoda přímého přenosu má kromě nejlepší spekter významnou výhodu v tom, že je podstatně rychlejší, a i levnější než příprava vzorků podle extrakčních protokolů.

Sugawara et al. (2016) pomocí MALDI úspěšně identifikovali plodnice jedlých druhů hub, které jsou podobné jedovatým druhům. V této diplomové práci byl biologický materiál pro analýzu odebírán pouze z podhoubí kultivovaných hub na agaru, Sugawara et al. (2016) naopak analyzovali volně rostoucí houby a porovnávali spektra získaná z izolátů lamel klobouků a noh. U lamel byla získána lepší spektra. Ve své studii ukázali, že MALDI je použitelná pro identifikaci volně rostoucích hub pomocí plodnic, výhodou je rychlost podobná jako identifikace na základě taxonomického klíče a spolehlivost podobná analýze DNA. Ve studii použili protokol extrakce kyselinou mravenčí s homogenizací skleněnými kuličkami v oscilačním mlýně, v budoucnu by bylo dobré zjistit aplikovatelnost přímého přenosu buněk u analýzy plodnice hub.

Crossay et al. (2017) se shodují s touto diplomovou prací, uvádějí, že při hranici skóre 1,7 lze pomocí MALDI spolehlivě identifikovat houby na druhové úrovni. Přestože s touto mezní hodnotou neurčili všechny vzorky, uvádějí, že u vzorků s menším skóre byl první výsledek správného druhu. Také uvádějí, že jsou většinou znatelné i rozdíly v rámci druhů, což v této práci také, ale přesto docházelo k časté mylné identifikaci na kmenové úrovni. Ovšem ve studii Crossay et al. (2017) analyzovali menší množství vzorků celkově i menší množství vzorků jednoho druhu. U druhů s menším počtem kmenů (*Pl. djamor*, *Pl. dryinus*) docházelo v této práci také ke správné identifikaci kmenů, u druhů *Pl. eryngii*, kde bylo 25 různých kmenů nebo *Pl. ostreatus* většinou správná identifikace kmenu neproběhla. Rozdílnost jejich studie také byla v tom, že analyzovali spory, v této studii bylo analyzováno mycelium.

Již několik studií uvedlo, že MALDI je vhodná metoda pro identifikaci hub na druhové úrovni (Schmidt a Kallow 2005; Sugawara et al. 2016; Crossay et al. 2017; Beck et al. 2017; Tomé et al. 2019), některé uvádějí i rozlišnost v rámci druhů (Schmidt a Kallow 2005; Crossay et al. 2017), Crossay et al. (2017) tvrdí, že některé těžko rozlišitelné kmeny, jsou kvůli silné příbuznosti pomocí DNA sekvence těžko rozlišitelné, jsou naopak proteinovým hmotnostním spektrem rozlišitelné dobře. Někteří autoři tak metodu MALDI označují jako vhodnou doplňkovou metodou k tradičním metodám na základě morfologických znaků a DNA (Beck et al. 2017). Někteří autoři MALDI dokonce označují jako vhodnou alternativní metodu pro určování hub (Crossay et al. 2017).

Na rozdíl od předchozích studií nebyl v této práci brán ohled na stáří kultivovaného podhoubí (Crossay et al. 2017; Tomé et al. 2019). Autoři vyhodnotili, že stáří má vliv na kvalitu spekter. Tomé et al. (2019) uvádějí, že nejlepší spektra byla získána z čerstvých kultur (5 až 10 dní staré). V této práci byly použity vzorky pěstované na agaru po dobu 14 dní. A některé byly analyzovány opakovaně v časovém rozestupu až 30 dní. Stáří mycelia nemělo zásadní vliv

na kvalitu spekter. V některých případech, zejména u rychle rostoucích kmenů, docházelo k vysrážení vlhkosti v petriho misce, přímý přenos se tak stával komplikovanější. Obdobně u kmenů, které rostly pomaleji bylo obtížné odebrat dostatečné množství vzorku pro analýzu, což také mohlo způsobit horší kvalitu spekter. Zvodnatělé mycelium limitovalo metodu přímého přenosu buněk, málo narostlé mycelium naopak limitovalo spíše metodu extrakce kyselinou.

V této diplomové práci nebyla metoda MALDI porovnávána s jinou identifikační metodou, ale byla ověřována robustnost metody v závislosti na protokolu extrakce. Jenom tato práce a Tomé et al. (2019) ověřovala více způsobů extrakce. Tato práce je jedinečná v tom, že porovnává MSP spektra získaná dvěma způsoby. Spektra každého vzorku byla mezi sebou porovnána a byla zjištěna míra shody u každého vzorku. Všechny vzorky se se 100% úspěšností shodovaly na druhové úrovni (mezní hodnota 1,7), v některých případech byla i shoda u konkrétních vzorků (51 % kmenů). Toto zjištění by bylo obzvláště přínosné, kdyby byla vyšší kvalita spekter získaných po extrakci kyselinou mravenčí a proto (nebo z jiného důvodu) by základní knihovna spekter byla vytvořena z takto připravených vzorků, potom bychom věděli, že při nedostatku času je možné udělat rychlou a spolehlivou identifikaci druhu pouze pomocí přímého přenosu. Vytvoření dostupných databází MSP hub a jejich stálé rozšiřování a aktualizace jsou významným krokem bez kterého se biotyping hub neobejde (Sugawara et al. 2016; Tomé et al. 2019).

7 Závěr

V diplomové práci byla zjišťována aplikovatelnost metody MALDI na identifikaci jedlých hub, konkrétně 56 kmenů 9 druhů rodu *Pleurotus*. Hypotéza práce byla potvrzena, na základě shlukové analýzy a log skóre jednotlivých spekter bylo potvrzeno, že metoda produkuje druhově specifická spektra. Slepé vzorky byly správně druhově identifikovány. Cílem práce bylo optimalizovat přípravu vzorků. Na základě dostupné literatury byly testovány různé protokoly, nejkvalitnější spektra byla získána extrakcí etanolem a kyselinou mravenčí s homogenizací vzorku v oscilačním mlýně a metodou přímého přenosu buněk na destičku. Významné zjištění práce bylo to, že spektra metody přímého přenosu, která je jednoznačně nejrychlejší, nejjednodušší i nejlevnější, jsou velice kvalitní, nehomogennější, a navíc kompatibilní se spektry získaných extrakcí kyselinou mravenčí s homogenizací vzorku.

V současné době je metoda a vytvořená databáze využitelná všude tam, kde nejsou k dispozici houby v jejich produkční formě – nemají plodnice a podle morfologických znaků je nelze rozlišit – sbírky a komerční dodavatelé mycelií. Metoda může dobře posloužit i jako validační metoda při nákupu nebo distribuci hub ze sbírek. Do dalších studií bych doporučila rozšíření databáze o vzorky z různých částí plodnice spor a jejich porovnání, dále vytvoření databází MSP spekter hub a jejich rozšiřování.

8 Seznam literatury

- Adebayo EA, Martínez-Carrera D, Morales P, Sobal M, Escudero H, Meneses ME, Avila-Nava A, Castillo I, Bonilla M. 2018. Comparative study of antioxidant and antibacterial properties of the edible mushrooms *Pleurotus levis*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* and *P. tuber-regium*. *International Journal of Food Science and Technology* **53**:1316–1330.
- Adedokun OM, Kyalo M, Gnonlonfin B, Wainaina J, Githae D, Skilton R, Harvey J. 2016. Mushroom: Molecular characterization of indigenous species in the Niger Delta Region of Nigeria. *European Journal of Horticultural Science*.
- Bach F, Helm CV, Bellettini MB, Maciel GM, Haminiuk CWI. 2017. Edible mushrooms: a potential source of essential amino acids, glucans and minerals. *International Journal of Food Science and Technology* **52**:2382–2392.
- Beck T, Gáper J, Pristas P, Kvasnová S, Gaperova S. 2017. POROVNANIE ITS-PCR-RFLP A MALDI-TOF MS METÓD PRI IDENTIFIKÁCI DREVOZNEHODNOCUJÚCICH HÚB Z RODU *Ganoderma*. *Chemicke Listy* **111**:388.
- Bozbulut R, Sanlier N. 2019. Promising effects of β -glucans on glyceamic control in diabetes. *Trends in Food Science and Technology* **83**:159–166. Elsevier. Available from <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.018>.
- Bright JJ, Claydon MA, Soufian M, Gordon DB. 2002. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *Journal of Microbiological Methods* **48**:127–138.
- Brown RS, Lennon JJ. 1995. Mass Resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* **67**:1998–2003.
- Chalupová J, Raus M, Sedlářová M, Šebela M. 2014. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances* **32**:230–241.
- Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, Schrenzel J. 2010. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *Journal of Clinical Microbiology* **48**:1169–1175.
- Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. 2013. Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical

- microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* **26**:547–603.
- Crossay T, Antheaume C, Redecker D, Bon L, Chedri N, Richert C, Guentas L, Cavaloc Y, Amir H. 2017. New method for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi by proteomic-based biotyping of spores using MALDI-TOF-MS. *Scientific Reports* **7**:1–16.
- da Silva Amaral L, Rodrigues-Filho E, Kubicek CP, Herwig C, Marchetti-Deschmann M, Allmaier G. 2018. Optimization of sample preparation for intact cell mass spectrometry (matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometry) of endophytic Xylaria. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **32**:815–823.
- De Carolis E, Vella A, Vaccaro L, Torelli R, Posteraro P, Ricciardi W, Sanguinetti M, Posteraro B. 2014. Development and validation of an in-house database for matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based yeast identification using a fast protein extraction procedure. *Journal of Clinical Microbiology* **52**:1453–1458.
- Deak E, Charlton CL, Bobenchik AM, Miller SA, Pollett S, McHardy IH, Wu MT, Garner OB. 2015. Comparison of the Vitek MS and Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS platforms for routine identification of commonly isolated bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **81**:27–33. Elsevier Inc. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.018>.
- Dentinger BTM, Didukh MY, Moncalvo JM. 2011. Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (Agaricomycotina). *PLoS ONE*.
- El Karkouri K, Couderc C, Decloquement P, Abeille A, Raoult D. 2019. Rapid MALDI-TOF MS identification of commercial truffles. *Scientific Reports* **9**:1–9.
- Friedecký D, Lemr K. 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie **20**:152–157.
- Golak-Siwulska I, Każewicz A, Spizewski T, Siwulski M, Sobieralski K. 2018. Bioactive compounds and medicinal properties of Oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.). *Folia Horticulturae* **30**:191–201.
- Hall IR, Yun W, Amicucci A. 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in Biotechnology* **21**:433–438.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **270**:313–321. Available from <http://www.royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2002.2218>.
- Hofrichter R. 2018. Tajný život hub. CPress, Brno.

- Hortin GL. 2006. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clinical Chemistry* **52**:1223–1237.
- Huong TT, Kopel P. 2014. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS:64–66.
- Jablonský I, Koudela M, Novotný D. 2017. Comparing treatment methods of apple tree chips in terms of mycelia growth of oyster Mushroom (*Pleurotus Ostreatus* (JACQ.) P. Kumm). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **65**:1175–1181.
- Jablonský I, Šašek V. 2006. *Jedlé a léčivé houby*. Nakladatelství Brázda, s.r.o., Praha.
- Jayachandran M, Chen J, Chung SSM, Xu B. 2018. A critical review on the impacts of β -glucans on gut microbiota and human health. *Journal of Nutritional Biochemistry* **61**:101–110. Elsevier Inc. Available from <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.06.010>.
- Justesen US, Holm A, Knudsen E, Andersen LB, Jensen TG, Kemp M, Skov MN, Gahrn-Hansen B, Møller JK. 2011. Species Identification of Clinical Isolates of Anaerobic Bacteria: a Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Systems. *Journal of Clinical Microbiology* **49**:4314–4318. Available from <http://jcm.asm.org/>.
- Karas M, Glückmann M, Schäfer J. 2000. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: Singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of Mass Spectrometry* **35**:1–12.
- Krakowska A, Zięba P, Włodarczyk A, Kała K, Sułkowska-Ziaja K, Bernaś E, Sękara A, Ostachowicz B, Muszyńska B. 2020. Selected edible medicinal mushrooms from *Pleurotus* genus as an answer for human civilization diseases. *Food Chemistry* **327**.
- Lepšová A. 2005. *Houby jako elixír života* 2. vydání. Víkend, Český Těšín.
- Li J, He X, Liu X Bin, Yang ZL, Zhao ZW. 2017. Species clarification of oyster mushrooms in China and their DNA barcoding. *Mycological Progress*.
- Lopes RB, Faria M, Souza DA, Bloch C, Silva LP, Humber RA. 2014. MALDI-TOF mass spectrometry applied to identifying species of insect-pathogenic fungi from the *Metarhizium anisopliae* complex. *Mycologia* **106**:865–878. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3852/13-401>.
- Manzi P, Pizzoferrato L. 2000. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* **68**:315–318.
- Marklein G et al. 2009. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass

- Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **47**:2912–2917. *J Clin Microbiol.* Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19571014/> (accessed July 3, 2020).
- Meena DK et al. 2013. Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiology and Biochemistry* **39**:431–457.
- Mellmann A et al. 2008. 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 **46**:1946–1954.
- Norková R, Dyrtrtová JJ, Kašička V. 2013. Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektro-migračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí. *Chemicke Listy* **107**:949–955.
- Pánek M, Wiesnerová L, Jablonský I, Novotný D, Tomšovský M. 2019. What is cultivated oyster mushroom? Phylogenetic and physiological study of *Pleurotus ostreatus* and related taxa. *Mycological Progress* **18**:1173–1186.
- Pinto A, Halliday C, Zahra M, van Hal S, Olma T, Maszewska K, Iredell JR, Meyer W, Chen SCA. 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS ONE* **6**.
- Rop O, Mlcek J, Jurikova T. 2009. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews* **67**:624–631.
- Sakakibara SM, Jones MD, Gillespie M, Hagerman SM, Forrest ME, Simard SW, Durall DM. 2002. A comparison of ectomycorrhiza identification based on morphotyping and PCR-RFLP analysis. *Mycological Research* **106**:868–878. Elsevier. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095375620860132X> (accessed July 6, 2020).
- Sałata A, Lemieszek M, Parzymies M. 2018. The nutritional and health properties of an oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr) P. Kumm.). *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* **17**:185–197.
- Sanguinetti M, Posteraro B. 2017. Identification of molds by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* **55**:369–379.
- Schmidt O, Kallow W. 2005. Differentiation of indoor wood decay fungi with MALDI-TOF mass spectrometry. *Holzforschung* **59**:374–377.
- Šedo O, Sedláček I, Zdráhal Z. 2011. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of

- bacteria. *Mass Spectrometry Reviews* **30**:417–434. Available from <http://doi.wiley.com/10.1002/mas.20287>.
- Seifert KA. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*.
- Shimomura N, Kitamoto Y, Maekawa N, Kawaguchi N, Ochi T, Tokimoto K, Nakaya M, Maeta K, Aimi T. 2008. Rapid Species Identification of Cooked Poisonous Mushrooms by Using Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:3306–3309.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* **6**:1–16.
- Stein M et al. 2018. Evaluation of three MALDI-TOF mass spectrometry libraries for the identification of filamentous fungi in three clinical microbiology laboratories in Manitoba, Canada. *Mycoses* **61**:743–753.
- Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. 2010. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization - Time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *Journal of Clinical Microbiology* **48**:3482–3486.
- Sugawara R, Yamada S, Tu Z, Sugawara A, Suzuki K, Hoshiba T, Eisaka S, Yamaguchi A. 2016. Rapid and reliable species identification of wild mushrooms by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Analytica Chimica Acta* **934**:163–169. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.056>.
- Tomé LMR et al. 2019. Proteomic fingerprinting for the fast and accurate identification of species in the Polyporoid and Hymenochaetoid fungi clades. *Journal of Proteomics* **203**.
- Ubik K. 2000. Fyzikálně-chemické metody. Část 2, Hmotnostní spektrometrie. Akademie věd České republiky.
- Veloo ACM, Knoester M, Degener JE, Kuijper EJ. 2011. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* **17**:1501–1506. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Available from <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03467.x>.
- Vertes A, Gijbels R (Renaat), Adams F (Freddy). 1993. Laser ionization mass analysis. Wiley. Available from https://books.google.cz/books/about/Laser_Ionization_Mass_Analysis.html?id=DTFRA

AAAMAAJ&redir_esc=y (accessed February 16, 2019).

Yang ZL. 2011. Molecular techniques revolutionize knowledge of basidiomycete evolution. *Fungal Diversity* **50**:47–58. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s13225-011-0121-1>.

Zenobi R, Knochenmuss R. 1999. <Mass spectrometry Reviews 1998 Zenobi.pdf>:337–366.

9 Seznam obrázků

Obr. 1	Ilustrace plodnice a mycelia. Upraveno z https://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/biofungos2.php	11
Obr. 2	Schéma přístroje MALDI – TOF https://is.muni.cz/el/1431/podzim2014/C9320/um/navod_MALDIMS_2014.pdf?lang=en...	17
Obr. 3	(A) snímky spotů ze světelného mikroskopu s matricí CHCA (10 mg/mL), DHB (10 mg/mL), FA (30 mg/mL) and SA (30 mg/mL). (B) MALDI hmotnostní spektra <i>X. arbuscula</i> za použití různých matric. Upraveno z.(da Silva Amaral et al. 2018).....	19
Obr. 4	Časová a finanční náročnost metod sekvenování DNA a MALDI na jeden vzorek. Upraveno podle (Crossay et al. 2017).	23
Obr. 5	Kalibrační schéma	30
Obr. 6	Spektra vzorku <i>Pleurotus ostreatus</i> CCBAS 459 získaná různými metodami extrakce. (a)FA (b)FA + mlýn (c)TFA (d)TFA + mlýn.....	32
Obr. 7	Přehled spekter 8 různých analyzovaných druhů rodu <i>Pleurotus</i> získaných po přímém přenosu buněk na destičku.....	37
Obr. 8	Přehled spekter 8 různých analyzovaných druhů rodu <i>Pleurotus</i> získaných po extrakci FA s homogenizací.	38
Obr. 9	Dendrogram všech analyzovaných vzorků. Vytvořeno podle základního nastavení Biotyperu.	39
Obr. 10	Dendrogram na základě MSP spekter kmenů <i>Pleurotus ostreatus</i>	41
Obr. 11	Přehled spekter vybraných kmenů <i>Pleurotus ostreatus</i>	41

10 Seznam tabulek

Tab. 1 Přehled analyzovaných druhů	27
Tab. 2 Význam hodnot skóre podle Bruker Biotyperu	31
Tab. 3 Porovnání vybraných vzorků s vytvořenou domácí databází (pro metodu extrakce kyseliny mravenčí).....	33
Tab. 4 Porovnání vybraných vzorků s vytvořenou domácí databází (pro metodu přímého přenosu)	34
Tab. 5 Výsledná skóre z porovnání MSP spekter přímého přenosu a extrakce kyseliny mravenčí	35
Tab. 6 Identifikace neznámých vzorků podle domácí knihovny u metody extrakce kyselinou mravenčí.	36
Tab. 7 Identifikace neznámých vzorků podle domácí knihovny u metody přímého přenosu.	36
Tab. 8 Výsledky porovnání dvou sad MSP spekter.	40

11 Seznam zkratek

AM	arbuscomykorhizní
CCBAS	sbírka kultur basidiomycetů
DBH	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FA	kyselina mravenčí
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů
HABA	4'-hydroxyazobenzen-2 - karboxylová kyselina
CHCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
IC	„Intact cell“ – přímý přenos buněk
MSP	hlavní referenční spektrum
OR	organické rozpouštědlo
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
SA	sinapová kyselina, 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina
TFA	kyselina trifluoroctová