

SZEMLE**Review****MALDI-TOF MS alkalmazása a tudományos kutatásban és a mezőgazdasági gyakorlatban**

KALINA HELLA - NAGY JÁNOS

Debreceni Egyetem MÉK

Földhasznosítási, Műszaki és Precíziós Technológiai Intézet, Debrecen

Összefoglalás

Ma a MALDI-TOF MS kulcsfontosságú eszköz a proteomikában, a mikrobiológiában, az orvosi diagnosztikában, valamint széles körben alkalmazzák az élelmiszerbiztonság és az anyagtudomány területén. A technológia az elmúlt években forradalmi fejlődésen ment keresztül: új mátrixanyagokat fejlesztettek ki, amelyek javították az ionizáció hatékonyságát, valamint fejlettebb adatfeldolgozási algoritmusokat dolgoztak ki az elemzések pontosságának növelésére. Gyorsasága, költséghatékonysága és megbízhatósága miatt egyre inkább a hagyományos azonosítási módszerek alternatívájaként jelenik meg.

A MALDI-TOF MS egy innovatív és sokoldalú eszköz, amely fontos lehet a növénytermesztésben és az élelmiszeripari minőségellenőrzésben. Nemcsak a genetikai tisztaság vizsgálatában és a toxinelemzésben nyújt megbízható eredményeket, hanem hozzájárul a növényélettani kutatásokhoz és a növényvédelmi stratégiák fejlesztéséhez, a növényi fehérjék expressziós mintázatainak részletes feltérképezéséhez. A módszer alkalmazásával lehetőség nyílik új stresszválasz-fehérjék azonosítására, amelyek jelentős szerepet játszhatnak a jövőbeni növénynemesítési programokban. A proteomikai kutatások fejlődése lehetőséget teremt arra, hogy a különböző környezeti hatásokra adott fehérjeváltásokat részletesebben feltárjuk.

A MALDI-TOF MS és az intelligens adatelemzés kombinációja új távlatokat nyithat a betegségek diagnosztikájában, a precíziós orvoslás fejlődésében az élelmiszerbiztonság, mezőgazdaság és a környezeti analitika területén is.

Kulcsszavak: MALDI-TOF, spektrometria, fehérjeazonosítás, módszerinnováció

Application of MALDI-TOF MS in scientific research and agricultural practice

H. KALINA – J. NAGY

University of Debrecen, Faculty of Agricultural and Foods Sciences and Environmental Management, Institute of Land Use, Engineering and Precision Farming Technology, Debrecen

Summary

Today, MALDI-TOF MS is a key tool in proteomics, microbiology, medical diagnostics, and is widely used in food safety and materials science. This technology has undergone revolutionary developments in the recent years: new matrix materials have been developed that improve ionisation efficiency, and more advanced data processing algorithms have been developed to increase the accuracy of analyses. Due to its speed, cost-effectiveness, and reliability, this technology is increasingly emerging as an alternative to traditional identification methods.

MALDI-TOF MS is an innovative and versatile tool that may be important in plant breeding and food quality control. Not only does it provide reliable results in genetic purity testing and toxin analysis, but it also contributes to plant physiology research and the development of plant protection strategies, as well as the detailed mapping of plant protein expression patterns. The method enables the identification of new stress response proteins that may play an important role in future plant breeding programs. Advances in proteomics research are opening up opportunities to explore protein changes in response to different environmental influences in greater detail.

The combination of MALDI-TOF MS and intelligent data analysis may open new horizons in disease diagnostics, the development of precision medicine, food safety, agriculture, and environmental analytics.

Keywords: MALDI-TOF, spectrometry, protein identification, method innovation

A MALDI-TOF MS eredete

A tömegspektrometria (MS) egy analitikai technika, amely a vizsgált minták tömeg-töltés arányának mérésén alapul, lehetővé téve a bennük található vegyületek azonosítását (*Sparkman* 2000). A korai tömegspektrometriás technikák az ionizációhoz elektronnyalábokat alkalmaztak, amelyek jelentős mértékben fragmentálták a vizsgált molekulákat. Ez az úgynevezett „kemény ionizációs” módszer megnehezítette a nagyobb, érzékeny biomolekulák vizsgálatát, mivel ezek a folyamat során töredezték és elvesztették eredeti szerkezetüket (*Karas et al.* 1985).

Az 1980-as évek közepén Franz Hillenkamp és Michael Karas német kutatók egy új, „lágy ionizációs” technikát dolgoztak ki, amely lehetővé tette a biomolekulák károsodás nélküli ionizációját (*Karas et al.* 1987). Felfedezték, hogy az alanin aminosav könnyen ionizálható, ha triptofánnal keverik és 266 nm hullámhosszúságú lézersugárával kezelik. Ezt a módszert továbbfejlesztve rájöttek, hogy más peptidek is ionizálhatók egy megfelelő „mátrix” jelenlétében (*Karas et al.* 1987). A mátrix segítette a minták védelmét az ionizáció során fellépő fragmentációval szemben, így kialakult a későbbiekben széles körben elterjedt mátrix-asszisztált lézer deszorpció/ionizációs (MALDI) technika. Ez a felfedezés forradalmasította a tömegspektrometriás elemzéseket, különösen a biológiai makromolekulák, például fehérjék és peptidek vizsgálatában, amelyeket korábban nehéz volt elemezni tömegspektrometriás módszerekkel.

Koichi Tanaka japán kutató továbbfejlesztette a módszert, és nagyobb molekulák sikeres ionizációját is megvalósította nitrogénlézer segítségével. Tanaka 2002-ben megosztott kémiai Nobel-díjat nyert a biológiai makromolekulák tömegspektrometriás vizsgálatához kifejlesztett új ionizációs technikájáért (*Markides és Gräslund* 2002). Bár Karas és Hillenkamp munkája szintén alapvető fontosságú volt, a Nobel-díjat végül Tanaka kapta a

technológia továbbfejlesztéséért. Ennek ellenére a MALDI technológia fejlődése folyamatosan zajlott, és az 1990-es évekre a módszer széles körben elérhetővé vált a tudományos közösség számára.

A MALDI technika önmagában is forradalmi volt, azonban az igazi áttörést az hozta, amikor ezt kombinálták a Time-of-Flight (ToF) technológiával. A ToF technikát már az 1950-es évek végén kifejlesztették, de kezdetben alacsony felbontása miatt nem talált széles körű alkalmazásra a tömegspektrometriában (*Hillenkamp és Karas 2000*). Az Time-of-Flight technológia lényege, hogy a vizsgált ionokat egy egyenáramú elektromos tér segítségével gyorsítják fel, és azok repülési idejét mérve határozzák meg tömegüket. A MALDI és a ToF kombinációja viszont olyan rendkívüli érzékenységgű és szelektivitású eljárást eredményezett, amely ma MALDI-TOF MS néven vált ismertté. Ez a készülék már alkalmas volt 10 kDa molekulatömegű minták analízisére is. A ToF különösen hatékony a visszaverődési mód (reflectron mode) alkalmazásakor, amely növeli a tömeganalízis pontosságát és csökkenti az ionok szétszóródását, ezáltal javítva a mérés felbontását (*Karas et al. 1987*).

A MALDI-TOF MS bevezetése óta számos területen forradalmasította az analitikai kémiai kutatásokat, lehetővé téve fehérjék, peptidek, szénhidrátok és egyéb makromolekulák gyors és pontos azonosítását. A technika rendkívüli előnye, hogy minimális mintaelőkészítést igényel, és nagy érzékenységgel képes akár komplex biológiai minták elemzésére is. Ez tette lehetővé a proteomikai kutatások robbanásszerű fejlődését, hiszen a MALDI-TOF MS képes volt hatékonyan és gyorsan azonosítani fehérje- és peptidmintákat.

A MALDI-TOF MS készülék működési elve

A Mátrix-Asszisztált Lézer Deszorpció/Ionizáció Time-of-Flight Tömegspektrometria (MALDI-TOF MS) egy rendkívül gyors, pontos és költséghatékony módszer a mikroorganizmusok azonosítására és karakterizálására. Ez a technológia a minták tömegspektrum-alapú ujjlenyomatainak generálásával működik, amelyek egyediek minden mikroorganizmusra, így lehetővé teszik azok genus- és fajsztípusú azonosítását, valamint potenciálisan törzsek tipizálását és azonosítását is (*Anhalt és Fenselau 1975*). A tömegspektrometriát évtizedek óta alkalmazzák a kémiában, de csak 1975-ben javasolták először, hogy baktériumok azonosítására is használható (*Anhalt és Fenselau 1975*). Megfigyelték, hogy a

különböző baktériumnemzetségek és fajok egyedi tömegspektrumokat produkálnak.

Az 1980-as években a deszorpciós/ionizációs technikák, mint a plazma-deszorpció (PD), lézeres deszorpció (LD) és gyors atom-bombázás (FAB) kifejlesztése lehetővé tette a mikroorganizmusokból származó biomarkerek ionizációját és tömegspektrometriás profilozását. Kezdetben főként alacsony molekulatömegű bakteriális lipidek elemzésére korlátozódtak a vizsgálatok, mivel az alkalmazott ionizációs technikák túl nagy energiájúak voltak a biomolekulák stabil ionizálásához. Az 1980-as évek végén kifejlesztett lágy ionizációs technikák, mint a MALDI és az elektropray ionizáció (ESI), lehetővé tették a nagyobb biomolekulák, például az intakt fehérjék MS-análízisét.

Számos kutató bizonyította, hogy a MALDI-TOF alkalmas fehérjeprofilok létrehozására sejtexttrakciót és tisztítást követően (*Girault et al.* 1996). *Holland et al.* (1996) volt az első, aki kimutatta, hogy MALDI-TOF spektrális ujjlenyomatok előállíthatók teljes bakteriális sejtekből előkezelés nélkül. Ezt az eljárást azóta számos kutató alkalmazta baktériumok genus- és fajsintű azonosítására (*Claydon et al.* 1996, *Haag et al.* 1998, *Pribil és Fenselau* 2005, *Vargha et al.* 2006). Az 1990-es évek végétől kezdődően a módszer sikerességét bizonyították baktériumok, gombák és élesztők gyors azonosításában is, amint azt a technológiával kapcsolatos publikációk számának exponenciális növekedése is tükrözi.

A MALDI-TOF MS-t különféle mikroorganizmusok, köztük baktériumok, gombák és vírusok karakterizálására alkalmazták (*Giebel et al.* 2010). Gyors mikrobiális karakterizációs képességei miatt a módszer alkalmazható orvosi diagnosztikában, biovédelmi kutatásokban, környezeti monitoringban és élelmiszerbiztonsági ellenőrzésekben. A MALDI-TOF MS gyors, nagy áteresztőképességű azonosítást tesz lehetővé alacsony költségek mellett, alternatívát kínálva a hagyományos biokémiai és molekuláris azonosítási rendszerekkel szemben.

A technika alapelve szerint a tömegspektrométer három fő egységből áll: (1) egy ionforrásból, amely a minta molekuláit ionizálja és gázfázisba juttatja, (2) egy tömeganalizátorból, amely az ionokat tömeg/töltés arányuk (m/z) szerint szétválasztja, valamint (3) egy detektorból, amely rögzíti az elkülönített ionokat és a megfelelő szoftver segítségével elemzi a kapott tömegspektrumokat (*Emonet et al.* 2010). A mintát egy mátrixoldattal keverik, amely lehetővé teszi az energia elnyelését és az ionizációs folyamatot. A leggyakrabban

alkalmazott mátrixanyagok közé tartozik a 2,5-dihidroxi-benzoésav (DHB), az α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav (CHCA) és a sinapinsav (SA) (Fenselau és Demirev 2001). A mátrix szerepe, hogy megvédje az analyte molekulákat a túlzott fragmentációtól, így biztosítva az intakt biomolekulák detektálását. A mátrixot és a mintát egy fém céllemeze helyezi, majd a keverék kristályosodik. Ez biztosítja a megfelelő ionizációt és stabilitást a mérés során (Lay 2001).

Miután a céllemezt a tömegspektrométerbe helyezték, egy lézerpulzus hatására a mátrixmolekulák energiát nyelnek el, amely az analyte ionizációját és deszorpcióját eredményezi. Az ionizált részecskéket egy elektromos tér gyorsítja és egy vákuumcsőbe juttatja. Az ionok repülési ideje arányos a tömeg/töltés arányukkal, így a kisebb tömegű ionok gyorsabban érik el a detektort, míg a nagyobb tömegűek később. A detektor által rögzített jelekből egy tömegspektrum jön létre, amely lehetővé teszi a minta komponenseinek azonosítását és relatív mennyiségeik meghatározását (Cotter 1997). Az így kapott spektrum egyedi „ujjlenyomatként” szolgál az adott mikroorganizmus számára, és egy referencia-adatbázissal való összehasonlítás révén azonosítható. A módszert az 1. ábra szemlélteti.

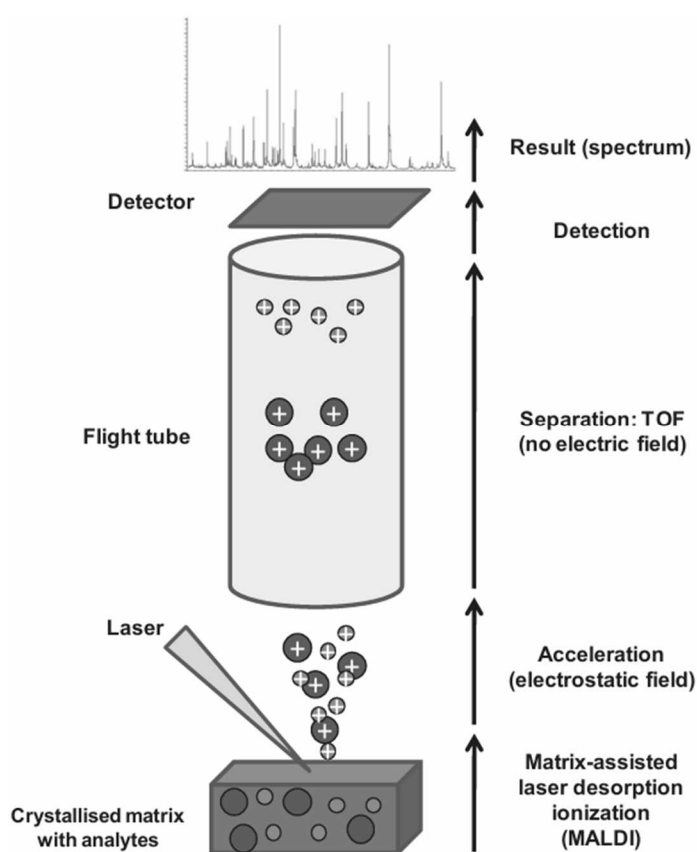
A mintát egy mátrixszal keverik össze egy vezető fémlapon. A mátrix és a mikrobiális anyag kristályosodása után a fémlapot a tömegspektrométerbe helyezik, ahol rövid lézerpulzusokkal bombázzák. Az így deszorbeált és ionizált molekulákat egy elektrosztatikus tér gyorsítja fel, majd egy vákuummal ellátott fém repülési csővön keresztül jutnak el a detektorhoz, ahol a kisebb tömegű ionok gyorsabban, míg a nagyobb tömegűek lassabban érkeznek meg. Így a bioanalitikák a repülési idejük (TOF) alapján szétválnak, és egy tömegspektrumot alkotnak, amely tömeg/töltés (m/z) arányú csúcsokból áll, eltérő intenzitással. Ez a spektrum egy egyedi mikrobiális ujjlenyomatként szolgál, amely egy referencia-adatbázissal összehasonlítva lehetővé teszi a minta azonosítását faj- vagy nemzetségszinten (Croxatto et al. 2012) (1. ábra).

Spektroszkópiai technikák

A spektroszkópia olyan analitikai módszerek összessége, amelyek az anyag és az energia közötti kölcsönhatások vizsgálatán alapulnak. A különböző spektroszkópiai technikák segítségével meghatározható egy anyag szerkezete, összetétele és fizikai tulajdonságai. Ezeket a módszereket széles körben

alkalmazzák a kémiai, biológiai és anyagtudományi kutatásokban, valamint az ipari és orvosi diagnosztikai eljárásokban. A legfontosabb ilyen technikák az elektromágneses sugárzáson alapuló spektroszkópiák, a magmágneses rezonancián alapuló spektroszkópiák, valamint a tömegspektrometriás technikák.

1. ábra. A MALDI-TOF MS működésének sematikus ábrázolása



Croxatto et al. (2012)

Figure 1. Schematic representation of the operation of MALDI-TOF MS. Croxatto et al. (2012)

A tömegspektroszkópia csoportjába tartozik a dolgozat által tárgyalt MALDI-TOF MS is. A tömegspektrometria (MS) egy rendkívül érzékeny analitikai módszer, amelyet molekulák tömegének meghatározására, szerkezetének elemzésére és összetételének azonosítására alkalmaznak (Cotter 1997). Az MS kiemelkedő jelentőségű a gyógyszerkutatásban és a biokémiai analitikában, különösen a biomolekulák azonosítása és kvantifikálása terén (Glish és Vachet 2003). Az eljárás három fő szakaszból áll: az ionizációból, a tömeg/töltés arány (m/z) méréséből és az adatok kiértékeléséből. A módszer széles körben alkalmazható, beleértve a proteomikát, a metabolomikát és a klinikai diagnosztikát (Cooks *et al.* 2006).

A tömegspektrometriás módszerek közötti legfontosabb különbség az ionizáció módjában rejlik. A MALDI (mátrix-asszisztált lézer deszorpció/ ionizáció) technika egy lágymódszer, amelyet gyakran biomolekulák, például fehérjék, peptidok és lipidek vizsgálatára használnak. A MALDI során egy minta kristályos mátrixba ágyazódik, majd lézer segítségével ionizálják (Karas és Hillenkamp 1988). A generált ionokat egy Time-of-Flight (TOF) analizátor segítségével választják szét, amely a töltött részecskék repülési idejét méri az elektromos térben (Kaufmann 1995). A TOF spektrometria kiválóan alkalmazható nagy tömegű biomolekulák analízisére (Weickhardt *et al.* 1996).

A Electrospray Ionization (ESI) egy másik lágymódszer, amely folyadékfázisból származó ionok generálására szolgál. Az ESI különösen hasznos nagy molekulatömegű biopolimerek, például fehérjék és nukleinsavak vizsgálatára, és gyakran folyadékkromatográfiával (LC-MS) kombinálják (Fenn *et al.* 1989). Az ESI képes stabilizálni nem-kovalens komplexeket, így kulcsszerepet játszik fehérje-ligand kölcsönhatások vizsgálatában (Smith *et al.* 1997). Az ESI egyik hátránya azonban az ionelnyomás jelensége, amely bizonyos mátrixok esetében befolyásolhatja az analízis pontosságát (Glish és Vachet 2003). A Tandem Tömegspektrometria (MS/MS) egy fejlett technika, amely több egymás utáni tömeganalízist alkalmaz. Az első tömeganalizátor kiválaszt egy prekursor iont, amelyet fragmentáció követ, majd a második analizátor az így létrejött termékionokat vizsgálja (Mann *et al.* 2001). A módszer kulcsfontosságú az olyan alkalmazásokban, mint a fehérjefelderítés, a gyógyszerkutatás és a metabolomikai elemzés (Aebbersold és Mann 2003). Az MS/MS továbbfejlesztett változatai, például az MSⁿ analízis lehetővé teszik

többlépcsős fragmentációs vizsgálatok elvégzését, amelyek különösen hasznosak komplex keverékek vizsgálatában (*Busch et al.* 1988).

A Quadrupole Ion Trap (QIT) és Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) spektrométerek nagy felbontást biztosítanak a pontos tömegméréshez. A QIT tömeganalizátor elektromos tér segítségével csapdázza az ionokat és szekvenciálisan szabadítja fel őket tömeganalízis céljából (*March* 1997). Az FT-ICR spektrometria egy mágneses térben történő ioncsapdázást alkalmaz, amely különösen hasznos nagy felbontású tömeganalízishez és pontos tömeg meghatározáshoz (*Marshall et al.* 1998). Az FT-ICR előnyei közé tartozik a kivételes tömegpontosság, amely lehetővé teszi az izotópos eloszlások precíz elemzését (*Marshall és Comisarow* 1974). A Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) az egyik legérzékenyebb elemanalitikai technika, amelyet nyomelemek meghatározására és izotóparányok mérésére használnak (*Becker* 2007). A plazma hőmérséklete lehetővé teszi az erősen kötött elemek ionizációját, így a módszert széles körben alkalmazzák környezetanalitikában, klinikai diagnosztikában és élelmiszerbiztonsági vizsgálatokban (*Montaser* 1998). Az ICP-MS jelentős előnye, hogy képes egyidejűleg több elem pontos mennyiségi meghatározására (*Becker* 2007).

A tömegspektrometria folyamatos fejlődése új lehetőségeket nyitott meg az analitikai kémia területén. Az érzékenység és felbontás növekedésével a technika egyre szélesebb körben alkalmazható biológiai és ipari kutatásokban, valamint klinikai diagnosztikában. Az MS-alapú módszerek kombinációja, például a kromatográfiás technikákkal való integráció, tovább növeli az analitikai teljesítményt és alkalmazhatóságot (*Glish és Vachet* 2003).

Az elektromágneses sugárzáson alapuló technikák egyik legfontosabb képviselője a RAMAN spektroszkópos technika. A Raman-szórás egy olyan jelenség, amelyben a mintára eső fotonok inelasztikusan szóródnak, miután kölcsönhatásba léptek a rezgő molekulákkal. A hatást Chandrasekhara Venkata Raman fedezte fel 1928-ban, amelyért 1930-ban Nobel-díjat kapott (*Raman* 1928). Eredetileg a Raman-spektroszkópiát a fizika és kémia terülein alkalmazták, főként molekuláris rezgések és szerkezetek vizsgálatára (*Hibben* 1939, *Herzberg* 1945). Korai korlátozó tényezője a Raman-spektroszkópia terjedésének az volt, hogy a szórási jel nagyon gyenge, ezért nagy intenzitású monokromatikus fényre volt szükség a kimutatható jel generálásához. Az 1960-as években a lézerek felfedezése lehetővé tette a Raman-spektroszkópia hatékonyabb alkalmazását (*Porto és Wood* 1962,

Kogelnik és *Porto* 1963). Ezzel párhuzamosan a technika fejlődését segítette a digitális spektrumok megjelenése a CCD-ekkel, valamint a konfokális Raman-mikroszkóp bevezetése (*Delhaye* és *Dhamelincourt* 1975). Az 1990-es évek elejétől a Raman-spektroszkópiát széleskörűen alkalmazzák a biológiai minták vizsgálatára (*Puppels et al.* 1990, 1991). Az egyik legfontosabb előnye, hogy nem rombolja a mintát, és előkészítéssel is alkalmazható, így *in vivo* mérésekre is alkalmas. Raman-spektroszkópiával biomolekulák, pl. lipidek, fehérjék, szénhidrátok és nukleinsavak relatív koncentrációja is meghatározható (*Beier et al.* 2010). A Raman-spektroszkópia fontos diagnosztikai lehetőséget is jelent, mivel lehetőséget ad bakteriális azonosításra (*Walter et al.* 2011, *Samek et al.* 2015) és betegségek diagnosztizálására (*Diem et al.* 2013, *Kong et al.* 2015). Az egyik jelentős korlátozó tényező azonban, hogy a Raman-jel gyengesége miatt a mérések hosszú ideig tarthatnak, különösen hiperspektrális képek készítésekor. Ennek megoldására fejlesztették ki a koherens Raman-technikákat, mint a koherens anti-Stokes Raman-szórás (CARS) és a stimulated Raman-szórás (SRS), amelyek jelentősen erősebb jelet biztosítanak (*Evans és Xie* 2008, *Camp és Cicerone* 2015). Egy másik lehetőség a felszíni n-növelt Raman-szórás (SERS), amely fémfelületeket alkalmaz a jel erősítésére, lehetővé téve nyomelemzéseket is (*Xie és Schlücker* 2013, *McAughtrie et al.* 2014).

Mágneses rezonancián alapuló spektroszkópos technika, a nukleáris mágneses rezonancia (NMR) spektroszkópia egy sokoldalú technika, amelyet biológiai makromolekulák szerkezetének, dinamikájának és kölcsönhatásainak vizsgálatára használnak (*Mittermaier és Kay* 2009). Az NMR jelenségét függetlenül fedezte fel Felix Bloch és Edward Purcell a második világháború után, amelyért 1952-ben Nobel-díjat kaptak. A módszer fizikai alapokon nyugszik, de idővel a kémia és a biológia területére is kiterjedt (*Bloch et al.* 1946, *Purcell et al.* 1946). Az első kémiai alkalmazásokat *Proctor* és *Yu* (1950) vezette be, amikor megfigyelték a kémiai eltolódást. Az 1960-as években a szupravezető mágnesek és a Fourier-transzformált (FT) NMR jelentősen növelte a technika érzékenységét (*Ernst és Anderson* 1966).

Az NMR egyik legfontosabb alkalmazása a biomolekulák oldatfázisú szerkezeti meghatározása, amely kulcsfontosságú az olyan flexibilis fehérjék esetében, amelyek nehezen kristályosíthatók (*Williamson et al.* 1985). A kétdimenziós (2D) NMR megjelenésével lehetővé vált bonyolult molekuláris rendszerek elemzése (*Aue et al.* 1976). A ^{15}N és ^{13}C jelölt fehérjékkel végzett NMR kísérletek révén a nagyobb biomolekulák szerkezetének vizsgálata is

lehetővé vált (Bax 1994). Az évek során az NMR spektroszkópia nemcsak a fehérjeszerkezet-meghatározásra, hanem az intrinszikusan rendezetlen fehérjék (IDP-k) vizsgálatára is kiterjedt (Dyson és Wright 2004). A technika különböző spektrális paramétereket használ a molekuláris szerkezet és kölcsönhatások jellemzésére. A kémiai eltolódás az atomok elektronikus környezetétől függ (Wishart 2011), míg a J-kapcsolódás a kovalensen kötött atommagok közötti csatolás mérésére szolgál (Karplus 1963). A nukleáris Overhauser-effektus (nOe) térbeli kölcsönhatásokat detektál (Neuhaus és Williamson 1989), míg a maradék dipoláris csatolások (RDC) a molekulák orientációjáról szolgáltatnak információt (Tjandra és Bax 1997).

Az NMR fontos szerepet játszik a fehérjék dinamikus viselkedésének feltárásában, beleértve a konformációs változásokat és kölcsönhatásokat (Kay *et al.* 1989). Az EXSY módszer lehetővé teszi a lassú kicserélődési folyamatok tanulmányozását, míg a CPMG relaxációs diszperziós technika a gyors dinamikai folyamatokat segíti feltárni (Skrynnikov *et al.* 2002). Az NMR spektroszkópia rendkívül sokoldalú eszköz a biomolekulák vizsgálatára. Noha a fehérjeszerkezet-meghatározás területén az röntgenkristallográfia dominál, az NMR egyedülálló betekintést nyújt a biomolekulák dinamikájába és kölcsönhatásaiba.

A MALDI-TOF MS készülék technológiai, gyakorlati alkalmazása

A MALDI-TOF MS technológia az elmúlt években forradalmasította a mikrobiológiai azonosítás és karakterizáció területét. A módszer gyorsasága, pontossága és költséghatékonysága révén egyre szélesebb körben alkalmazzák különféle minták vizsgálatára, legyen szó klinikai, élelmiszeripari, környezeti vagy kutatási célú analízisről. A következőkben részletesen bemutatjuk, hogyan használható a MALDI-TOF MS különböző minták elemzésére, és milyen előnyökkel, illetve kihívásokkal jár alkalmazása.

A mikroorganizmusok azonosítására szolgáló MALDI-TOF MS technológia alapvetően két fő megközelítésen alapul: az egyik a tömegspektrumok közvetlen összehasonlítása referencia-adatbázisokkal, a másik pedig a biomarkerek fehérjeadatbázisokkal történő egyeztetése (Demirev *et al.* 1999). Az első módszer a gyakorlati alkalmazásban elterjedtebb, mivel egyszerűbb és gyorsabb, hiszen a kapott spektrumokat azonnal egy adatbázishoz illesztik. A második megközelítés mélyebb elemzést tesz lehetővé, hiszen az azonosított

fehérjék biokémiai tulajdonságait is figyelembe veszi (*Pineda et al.* 2000). Az utóbbi években folyamatos fejlesztések zajlanak annak érdekében, hogy mindkét megközelítés egyre pontosabb és szélesebb körben alkalmazható legyen.

A MALDI-TOF MS egyik legnagyobb áttörése a baktériumok gyors azonosításának területén történt. A mikrobiológiai diagnosztika hagyományos módszerei, mint például a biokémiai tesztek, gyakran időigényesek és laboratóriumi munkát igényelnek. Ezzel szemben a MALDI-TOF MS lehetővé teszi, hogy néhány percen belül azonosítsák a baktériumokat közvetlenül tenyésztetből. Ez különösen előnyös olyan kórokozók esetében, amelyek gyors azonosítása elengedhetetlen a megfelelő kezelés kiválasztásához, például szepszis vagy súlyos bakteriális fertőzések esetén (*Seng et al.* 2009). A módszer kiemelkedően hatékony az Enterobacteriaceae család tagjainak, a nem fermentáló Gram-negatív baktériumoknak, a staphylococcusoknak és a streptococcusoknak azonosításában, de folyamatosan fejlesztik az egyéb mikroorganizmusok felismerésének pontosságát is.

A hemokultúrákból történő azonosítás az egyik legfontosabb klinikai alkalmazási területe a MALDI-TOF MS-nek. A véráramfertőzések, mint például a szepszis, gyors diagnózisa kritikus a betegek túlélési esélyeinek növelése érdekében. A hagyományos hemokultúrás azonosítási módszerek gyakran hosszú időt vesznek igénybe, mivel a baktériumokat először tenyésztetni kell, majd biokémiai tesztekkel vagy molekuláris biológiai módszerekkel kell azonosítani őket. A MALDI-TOF MS alkalmazásával azonban a baktériumok akár közvetlenül a hemokultúrából is azonosíthatók, jelentősen lerövidítve a diagnosztikai időt (*La Scola és Raoult* 2009). Ennek a technológiának a sikeressége nagyban függ a megfelelő mintapreparálási technikáktól. A sejtkoncentráció és a háttérben lévő egyéb fehérjék jelenléte befolyásolhatja az azonosítás hatékonyságát, ezért különféle előkezelési módszereket dolgoztak ki a hemokultúrákból történő megbízhatóbb azonosítás érdekében (*Prod'hom et al.* 2010).

A vizeletminták MALDI-TOF MS alapú elemzése szintén ígéretes megoldás a húgyúti fertőzések gyors diagnosztizálására. A húgyúti fertőzések kórokozóinak azonosítása hagyományosan hosszadalmas folyamat, mivel a vizeletmintát először tenyésztetni kell, majd az izolált baktériumokat biokémiai módszerekkel azonosítják. A MALDI-TOF MS azonban lehetővé teszi a baktériumok gyors azonosítását közvetlenül a vizeletből is, bizonyos előkészítési lépések – például centrifugálás és sejtkoncentráció – alkalmazásával. Egyes

tanulmányok szerint a megfelelő módszertan alkalmazásával akár 94%-os pontosság érhető el (*Ferreira et al.* 2010). Ugyanakkor a módszer megbízhatósága nagyban függ a mintában található baktériumok mennyiségétől: alacsony sejtszám esetén az azonosítási hatékonyság csökkenhet.

A MALDI-TOF MS az élesztőgombák és más mikroszkopikus gombák azonosításában is egyre nagyobb szerepet kap. Különösen a *Candida* spp. és a *Cryptococcus neoformans* esetében értek el jelentős sikereket a módszer alkalmazásával, mivel ezek a gombák gyakran okoznak opportunist fertőzéseket immunkompromittált betegekben (*Bader et al.* 2010). A fonális gombák azonosítása azonban még mindig kihívást jelent, főként a referencia-adatbázisok korlátozott volta miatt. A MALDI-TOF MS alkalmazása a mikobaktériumok azonosítására szintén ígéretes, különösen a *Mycobacterium tuberculosis* komplex tagjainak azonosítása terén, mivel a hagyományos tenyésztési módszerek rendkívül időigényesek. A módszer jelentősen lerövidíti a diagnózishoz szükséges időt, azonban az azonosítás sikere nagyban függ a minta előkészítési módjától és a megfelelő adatbázisok elérhetőségétől (*Lotz et al.* 2010).

A MALDI-TOF MS alkalmazható élelmiszerbiztonsági és környezeti minták elemzésére is. Az élelmiszeripari alkalmazások során a technológiát gyakran használják élelmiszer-szennyező baktériumok és gombák gyors kimutatására és azonosítására, amely hozzájárul az élelmiszerbiztonság növeléséhez. A környezeti minták analízise során pedig lehetővé teszi a mikrobiális közösségek gyors és pontos karakterizációját, például víz minták vizsgálatakor (*Ruelle et al.* 2004).

MALDI-TOF MS kukorica vizsgálat módszere

A modern tömegspektrometriai technikák közül az egyik legsokoldalúbb és legszélesebb körben alkalmazott módszer a mátrix-asszisztált lézerdeszorpciós ionizációs időfüggő repülési tömegspektrometria (MALDI-TOF MS), amely lehetőséget biztosít a fehérjék, peptidok és más makromolekulák gyors és pontos azonosítására. A technológia egyre nagyobb szerepet kap a mezőgazdasági és élelmiszeripari alkalmazásokban, különösen a kukoricatermesztés és a vetőmagvizsgálatok területén. Magyarországon évente 5–8 millió tonna kukoricát termelnek, így a genetikai tisztaság ellenőrzése és a toxikológiai vizsgálatok kiemelt jelentőséggel bírnak az iparág számára (*Simon és Lovász* 2016).

A vetőmagok genetikai tisztaságának meghatározása hagyományosan izoelektromos fókuszálással (IEF) történik, amely egy elektroforézises módszer, de

ennek korlátai miatt újabb, hatékonyabb alternatívákra van szükség. A MALDI-TOF MS technológia gyorsabb és érzékenyebb elemzést tesz lehetővé, amely minimalizálja a környezeti tényezők okozta torzításokat (Adams *et al.* 2004). A módszer során a kukoricaszemekből kivont fehérjéket mátrixanyagok segítségével ionizálják, majd az így keletkező ionokat tömeganalizátorral detektálják. Az így kapott fehérjespektrum lehetőséget nyújt a genetikai markerek azonosítására és a hibridek tisztaságának ellenőrzésére (Postu *et al.* 2019).

A vizsgálatok során különös figyelmet kap a zein fehérjecsoport, amely a kukorica egyik legfontosabb raktározott fehérjéje. A zeinek szerkezeti és funkcionális jellemzőik miatt kulcsszerepet játszanak a növény beltartalmi értékének és genetikai tulajdonságainak meghatározásában. A MALDI-TOF MS technika alkalmazása nemcsak a fő zeinosztályok pontos azonosítását teszi lehetővé, hanem eddig nem dokumentált molekulatömegű fehérjék kimutatását is eredményezte. Az eljárás során végzett részletes vizsgálatok során új zein variánsokat sikerült azonosítani, különösen a δ -zein, β -zein és γ -zein osztályokban, amelyek genetikai variabilitást mutattak az elemzett dél-afrikai kukorica hibridek és azok szülői vonalai között (Adams *et al.* 2004, O'Kennedy *et al.* 2017). Az α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) és 2-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid (HABA) mátrixok kombinációja kulcsfontosságúnak bizonyult a fehérjék detektálásában, mivel így minden jelentős zeinosztály jól láthatóvá vált a tömegspektrométeres analízis során. Az élelmiszer-feldolgozás szempontjából is jelentőséggel bír, hogy az azonosított fehérjék eltérő szerkezeti és kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek befolyásolhatják a kukoricaliszt viselkedését különböző technológiai folyamatok során. A zeinfehérjék arányának és összetételének ismerete hozzájárulhat a feldolgozási hatékonyság növeléséhez, például a sütő- és extrudált termékek gyártása során. Az ilyen irányú kutatások eredményei így nemcsak tudományos szempontból fontosak, hanem közvetlen gyakorlati alkalmazásokat is kínálnak mind a vetőmagipar, mind az élelmiszeripar számára.

O'Kennedy és csoportja 2017-es kutatásának egyik kiemelkedő megállapítása az volt, hogy a különböző kukorica hibridek eltérő zeinfehérje-profilal rendelkeznek, amely közvetlen hatással lehet a kukoricaszem keménységére, ipari feldolgozhatóságára és táplálkozásbiológiai értékére. A vizsgálatok során egyértelmű összefüggés mutatkozott a hibridek és szülői vonalaik között a zeinfehérje-profilok tekintetében, ami genetikai öröklődési mintázatokra utal. A kutatók kimutatták, hogy bizonyos zeinvariánsok kizárólag az egyik szülői vonalból

származnak, míg mások a hibridekben keverednek, ami igazolja a MALDI-TOF MS, mint genetikai markervizsgálati eszköz hatékonyságát. A módszer segítségével olyan fehérjéket is sikerült azonosítani, amelyek korábbi SDS-PAGE vizsgálatok során nem voltak jól elkülöníthetők, különösen az α -zeinek esetében, amelyek széles molekulatömeg-tartományban jelentek meg a spektrumokban. Az egyik legfontosabb gyakorlati eredmény az volt, hogy a kutatók igazolták a 27 kDa γ -zein érzékenységét a kiválasztott mátrixokra. Kiderült, hogy a megfelelő detektálás érdekében a CHCA mátrix elengedhetetlen, mivel ez a fehérje sokkal vízzoldékonyabb, mint más zeinosztályok, és ennek megfelelően eltérő kristályosodási tulajdonságokat mutat a minták előkészítése során. Amennyiben a CHCA nem volt jelen a mátrixoldatban, a 27 kDa γ -zein csúcsai vagy teljesen hiányoztak, vagy csak alacsony intenzitással jelentek meg, ami azt jelzi, hogy a megfelelő mátrix-kiválasztás alapvető fontosságú az ilyen típusú fehérjék tömegspektrométeres vizsgálatában. Ezen kívül a kutatók új, eddig nem azonosított zeinfehérjevariánsokat is észleltek, amelyek a hibridekben és azok szülői vonalaiban egyaránt előfordultak, de korábbi vizsgálatokban nem kerültek detektálásra.

Ez a kutatás nemcsak a kukoricafehérjék szerkezeti és genetikai sajátosságainak jobb megértéséhez járul hozzá, hanem új lehetőségeket nyit meg a zeinfehérje-profilok felhasználására a növénynemesítés és az ipari feldolgozás területén. A MALDI-TOF MS technika nagyfelbontású fehérjeprofílelemzése pontos képet nyújt a különböző kukorica hibridek összetételéről, lehetővé téve olyan genetikai markerek azonosítását, amelyek hozzájárulhatnak a kívánt agronómiai és élelmiszeripari tulajdonságok fejlesztéséhez. A módszer segítségével a nemesítő célok célzottan választhatják ki azokat a szülői vonalakat, amelyek kívánatos zeinfehérjeprofíllal rendelkeznek, így hatékonyabban állíthatók elő olyan kukorica hibridek, amelyek jobb malomipari tulajdonságokat, magasabb fehérjeértéket vagy kedvezőbb textúrát biztosítanak.

A technológia alkalmazási köre túlmutat a genetikai tisztaság ellenőrzésén, mivel hatékony eszköz lehet a mikotoxin-fertőzöttség vizsgálatában is. A *Fusarium verticillioides* által termelt fumonizinek súlyos élelmiszerbiztonsági kockázatot jelentenek, ezért gyors és pontos kimutatásuk kulcsfontosságú az élelmiszerlánc védelme érdekében (Chang *et al.* 2016). A hagyományos toxinvizsgálati módszerek, például a HPLC és az ELISA mellett a MALDI-TOF MS lehetőséget nyújt mind a toxintermelő gombafajok azonosítására, mind pedig a toxintermelési aktivitás követésére (Castañeda-Ovando *et al.* 2010).

Az eljárás előnye, hogy a toxikus vegyületek kimutatása mellett a gombák által termelt fehérjék spektrális mintázata alapján is felismerhető a fertőzés jelenléte. A megfelelő mintaelőkészítés kiemelten fontos a megbízható eredmények elérése érdekében. Az extrakciós eljárások során különböző oldószereket, például alkoholos és vizes puffereket alkalmaznak, hogy a fehérjék oldékonyságát optimalizálják (Simon és Lovász 2016). Az analízis során leggyakrabban α -ciano-4-hidroxifahéjsavat (α -HCCA) használnak mátrixként, mivel ez elősegíti az ionizációs folyamat hatékonyságát (Postu et al. 2019). Az így nyert spektrumokat speciális számítógépes szoftverek segítségével dolgozzák fel, amelyek lehetőséget biztosítanak a kapott adatok pontos értelmezésére és az egyedi fehérjeprofílok azonosítására.

A MALDI-TOF MS hatékonyságát tovább növeli az adatelemzés fejlesztése. A mesterséges intelligencián alapuló algoritmusok és adatbázisok lehetővé teszik a spektrális mintázatok gyors és pontos összehasonlítását, ami különösen fontos lehet a fajtaazonosítás és a vetőmagok minőségellenőrzése során (Ocaña et al. 2007). A gépi tanulási modellek alkalmazása elősegíti az ismeretlen fehérjeprofílok automatikus osztályozását, valamint a toxintermelő törzsek gyors detektálását.

A kutatások szerint a MALDI-TOF MS-alapú adatbázisok fejlesztése elengedhetetlen a módszer mezőgazdasági alkalmazásának széleskörű elterjedéséhez. Egyes tanulmányok kimutatták, hogy a 'deep learning' modellek integrálása jelentősen javíthatja a minták osztályozási pontosságát és az analitikai folyamatok automatizálását (Pattemore et al. 2010). A hagyományos elektroforézises és kromatográfias módszerekkel szemben a MALDI-TOF MS előnye, hogy gyorsabb, kevesebb mintát igényel, és minimalizálja az analízis során fellépő környezeti hatások okozta hibákat. Az izoelektromos fókuszálás és az SDS-PAGE laboratóriumi módszerek ugyan megbízható fehérjeazonosítást tesznek lehetővé, de időigényesek és nagyobb mennyiségű reagenseket igényelnek. Ezzel szemben a MALDI-TOF MS alkalmas nagy áteresztőképességű analízisekre, és egyszerre több száz minta feldolgozását teszi lehetővé (Adams et al. 2004).

Kukorica hibridek zöldnövényi fehérjéinek vizsgálata MALDI-TOF MS készülékkel

A növényi proteomika egyik kulcsfontosságú eszköze a mátrix-asszisztált lézereszorpció/TOF tömegspektrometria (MALDI-TOF MS), amely lehetőséget

kínál a fehérjék azonosítására és expressziós változásainak nyomon követésére különböző környezeti hatások alatt (Mehta és Silva 2015). Ez a technológia nem csupán mikroorganizmusok azonosítására alkalmas, hanem a növényi fehérjeprofílok vizsgálatában is egyre nagyobb szerepet kap (Albrethsen 2011). A MALDI-TOF MS lehetőséget teremt az egyes biológiai állapotok és környezeti hatások által indukált változások pontos és gyors feltérképezésére (Sidransky et al. 2003).

A kukorica hibridek fehérjeösszetételének meghatározása során a MALDI-TOF MS profilozás révén megállapítható, hogy az abiotikus stressz különböző típusai hogyan befolyásolják a növények fehérjéinek expresszióját (Kim et al. 2015). Például a vízhiány hatására a kukorica leveleiben és gyökereiben számos fehérje expressziója megváltozik, amelyek közül kiemelkednek a metabolikus folyamatokban részt vevő fehérjék, a stresszválaszban szereplő fehérjék, valamint az ismeretlen funkciójú fehérjék (Xin et al. 2018). Egy másik fontos tényező a hő sokkfehérjék (HSP-k) expressziója, amely meghatározó szerepet játszik a kukorica hőstressz elleni védekezésében (Abou-Deif et al. 2019).

A Rubisco aktivázó (RCA) fehérjék is kulcsszerepet játszanak a kukorica fotoszintézisében, hiszen ezek az ATP-függő szabályozó fehérjék biztosítják a Rubisco hatékony működését. Yin et al. (2014) kutatásaiban MALDI-TOF MS segítségével azonosította a ZmRCA α és ZmRCA β fehérjéket, amelyek közül a β -izofорма domináns expressziót mutatott a levelekben. Az RCA fehérjék mennyisége és aktivitása közvetlen összefüggést mutatott a terméshozammal, ami arra utal, hogy ezek a fehérjék kulcsszerepet játszanak a fotoszintézis hatékonyságának szabályozásában. Az expressziós szintek napszakos változása is kimutatható volt, ami arra enged következtetni, hogy a Rubisco szabályozása dinamikus folyamatként működik a növényekben.

A MALDI-TOF MS technológia alkalmazása során a növényi minták előkészítése és a megfelelő fehérjekivonási módszerek kulcsszerepet játszanak a pontos és reprodukálható eredmények elérésében (Wu et al. 2013). A proteomikai elemzések kimutatták, hogy az egyes növényi hormonok, például a szalicilsav (SA) és az abszcizinsav (ABA) jelentősen befolyásolják a kukorica proteomját, ami az adott környezeti hatásokhoz való alkalmazkodásban játszik szerepet (Wu et al. 2013). Az ilyen jellegű vizsgálatok segítenek feltárni a növények stresszválaszának molekuláris mechanizmusait és meghatározni azokat a biomarkereket, amelyek a szelektív nemesítés szempontjából relevánsak lehetnek (Ahmad et al. 2012).

A vízhiány és a hőstressz mellett más abiotikus tényezők, például a talaj magas sótartalma és az elárasztás is jelentős hatással van a kukorica fehérjéinek összetételére. A sóstressz által kiváltott proteomikai változásokat kétirányú elektroforézissel és MALDI-TOF MS-sel vizsgálták, amely során számos fehérjét azonosítottak, amelyek expressziója szignifikánsan megváltozott a stressz hatására (Caruso *et al.* 2008). Hasonlóan, az elárasztás okozta stresszreakciók vizsgálata során kimutatták, hogy a programozott sejthalál (PCD) egyfajta adaptációs mechanizmusként működhet a kukoricában (Chen *et al.* 2014).

A biotikus stresszhatások elemzése szintén fontos terület a kukorica proteomikai vizsgálataiban. Zhang *et al.* (2014) kutatásai a *Setosphaeria turcica* fertőzésre adott fehérjeválaszokat vizsgálták MALDI-TOF MS alkalmazásával. A károsítóknak során kimutatták, hogy a rezisztens kukoricavonalak esetében jelentős fehérjeváltozások következnek be a fertőzést követően. A vizsgálatok 137 fehérje expresszióját azonosították, amelyek közül 50 felfelé, 87 pedig lefelé szabályozódott. A fertőzés hatására növekedett a védekezési fehérjék, például a szuperoxid-diszmutáz (SOD), poliamin-oxidáz és HSC70 expressziója, míg a fotoszintézisben részt vevő Rubisco és foszfoenolpiruvát-karboxiláz mennyisége csökkent. Az eredmények azt mutatják, hogy a rezisztens kukoricavonalak a fotoszintézis csökkentésével és a védekezési fehérjék fokozott termelésével reagálnak a kórokozóra, így biztosítva a fertőzés elleni hatékony védekezést.

Legújabb technológiák alkalmazása MALDI-TOF MS vizsgálatokban

A MALDI-TOF MS technológia az elmúlt években forradalmasította a mikrobiológiai azonosítást és karakterizációt. A módszer gyorsasága, pontossága és költséghatékonyasága révén egyre szélesebb körben alkalmazzák különféle minták vizsgálatára, legyen szó klinikai, élelmiszeripari, környezeti vagy kutatási célú analízisről. A következőkben részletesen bemutatjuk, hogyan használható a MALDI-TOF MS különböző minták elemzésére, és milyen előnyökkel, illetve kihívásokkal jár alkalmazása.

A mikroorganizmusok azonosítására szolgáló MALDI-TOF MS technológia alapvetően két fő megközelítésen alapul: az egyik a tömegspektrumok közvetlen összehasonlítása referencia-adatbázisokkal, a másik pedig a biomarkerek fehérjeadatbázisokkal történő egyeztetése (Demirev *et al.* 1999). Az első módszer

a gyakorlati alkalmazásban elterjedtebb, mivel egyszerűbb és gyorsabb, hiszen a kapott spektrumokat azonnal egy adatbázishoz illesztik. A második megközelítés mélyebb elemzést tesz lehetővé, hiszen az azonosított fehérjék biokémiai tulajdonságait is figyelembe veszi (*Pineda et al.* 2000). Az utóbbi években folyamatos fejlesztések zajlanak annak érdekében, hogy mindkét megközelítés egyre pontosabb és szélesebb körben alkalmazható legyen.

A MALDI-TOF MS technológia forradalmi lehetőségeket kínál az orvosi diagnosztikában is, ahol az egyik legnagyobb kihívása mindig is az volt, hogy gyorsan és megbízhatóan azonosítsa a különböző betegségekhez kapcsolódó biomarkereket és kórokozókat. Az antimikrobiális peptidek vizsgálata révén új biomarkerek fedezhetők fel a légzőszervi betegségek monitorozására, míg a fertőző betegségek azonosításában jelentősen csökkentheti a diagnózis idejét és költségeit. A légutak állapotának vizsgálata kulcsfontosságú a különböző légzőszervi betegségek azonosításában és nyomon követésében. Az orrfolyadékban (nasal fluid, NF) található antimikrobiális peptidek (AMP) kiemelt szerepet játszanak az immunrendszer első védelmi vonalaként, hiszen képesek semlegesíteni a légutakba kerülő kórokozókat. A hagyományos diagnosztikai módszerekkel azonban ezeknek a peptideknek az azonosítása időigényes és bonyolult. A MALDI-TOF MS lehetőséget kínál arra, hogy gyorsan és pontosan feltérképezze az orrfolyadék AMP-profilját, amely kritikus információkat nyújthat allergiás és nem allergiás rhinitis, krónikus sinusitis, cisztás fibrózis vagy bakteriális és gombás légúti fertőzések. A technológia egyedülálló előnye, hogy minimális mintából képes részletes fehérje- és peptidprofil generálni, amely segíti az adott betegség lefolyásának megértésében és a terápiás hatékonyság monitorozásában. A MALDI-TOF MS további előnye, hogy a hagyományos módszerekkel szemben rendkívül gyors, mivel a hagyományos mikrobiológiai módszerek – például a tenyésztés és a biokémiai tesztek – napokig, sőt akár hetekig is eltarthatnak. Ezzel szemben a MALDI-TOF MS néhány percen belül képes pontosan meghatározni a kórokozót, jelentősen csökkentve ezzel a diagnózishoz szükséges időt (*Patel* 2015, *Preitano et al.* 2018).

A MALDI-TOF MS egyik legnagyobb áttörése a baktériumok gyors azonosításának területén történt. A mikrobiológiai diagnosztika hagyományos módszerei, mint például a biokémiai tesztek, gyakran időigényesek és laboratóriumi munkát igényelnek. Ezzel szemben a MALDI-TOF MS lehetővé teszi, hogy néhány percen belül azonosítsák a baktériumokat közvetlenül tenyésztésből. Ez különösen előnyös olyan kórokozók esetében, amelyek gyors

azonosítása elengedhetetlen a megfelelő kezelés kiválasztásához, például sepszis vagy súlyos bakteriális fertőzések esetén (Seng *et al.* 2009). A módszer kiemelkedően hatékony az Enterobacteriaceae család tagjainak, a nem fermentáló Gram-negatív baktériumoknak, a staphylococcusoknak és a streptococcusoknak azonosításában, de folyamatosan fejlesztik az egyéb mikroorganizmusok felismerésének pontosságát is.

A MALDI-TOF MS és a mesterséges intelligencia integrációja tovább növelheti a módszer hatékonyságát és alkalmazásának jelentőségét. Ez a kombináció nemcsak a diagnosztikai folyamatokat gyorsítja fel, hanem új lehetőségeket is teremt a betegségek megértésében és kezelésében. Egy kutatásban például egy innovatív, egyszerű és gyors módszert sikerült kidolgozni a kóros fájdalomtípusok kisérteltes modellekben történő kimutatására és osztályozására szérumspektrumok alapján. A kóros fájdalomtípusok két fő kategóriába sorolhatók: neuropátiás fájdalom, amelyet a szomatoszenzoros idegrendszer sérülése vagy betegsége okoz, illetve nociplasztikus fájdalom, amely olyan esetekben alakul ki, amikor nincs bizonyíték a szomatoszenzoros rendszer károsodására. Mivel jelenleg nem létezik arany standard a kóros fájdalomtípusok diagnosztizálására, az egyes betegek helyes besorolása komoly kihívást jelent a klinikusok számára. Noha a jelenlegi biokémiai technikák segítségével az egyes állapotok specifikus biomarkereinek meghatározása rendkívül összetett feladat, a mátrix-asszisztált lézer deszorpció/ionizációs idő-röptetés tömegspektrometria (MALDI-TOF MS) és a mesterséges intelligencia kombinációja lehetővé teszi a kóros fájdalomtípusokra jellemző egyedi molekuláris ujjlenyomatok meghatározását, amelyek diagnosztikai célokra is hasznosíthatók. A fájdalomválaszok elemzése és a MALDI-TOF MS szérumspektrumok ANN alapú kiértékelése lehetőséget biztosít a fájdalomtípusok azonosítására és eredetük meghatározására anélkül, hogy egyedi biomarkerek azonosítására lenne szükség. Ezek az eredmények klinikai környezetben is hasznosíthatók, hiszen a MALDI-TOF MS és az ANN módszertan kombinációja döntéstámogató eszközként szolgálhat a kóros fájdalomtípusok diagnosztizálásában és nyomon követésében. Nem utolsósorban pedig ez a fejlesztett módszer olyan molekulák kimutatására is alkalmazható, amelyek szerepet játszanak a kóros fájdalom kialakulásában és fennmaradásában, így akár lehetséges terápiás célpontokká is válhatnak (Deulofeu *et al.* 2022).

A MALDI-TOF MS az élesztőgombák és más mikroszkopikus gombák azonosításában is egyre nagyobb szerepet kap. Különösen a *Candida* spp. és a

Cryptococcus neoformans esetében értek el jelentős sikereket a módszer alkalmazásával, mivel ezek a gombák gyakran okoznak opportunista fertőzéseket immunkompromittált betegekben (Bader *et al.* 2010). A fonalas gombák azonosítása azonban még mindig kihívást jelent, főként a referencia-adatbázisok korlátozott volta miatt. A MALDI-TOF MS alkalmazása a mikobaktériumok azonosítására szintén ígéretes, különösen a *Mycobacterium tuberculosis* komplex tagjainak azonosítása terén, mivel a hagyományos tenyésztési módszerek rendkívül időigényesek. A módszer jelentősen lerövidíti a diagnózishoz szükséges időt, azonban az azonosítás sikere nagyban függ a minta-előkészítési módjától és a megfelelő adatbázisok elérhetőségétől (Lotz *et al.* 2010).

A MALDI-TOF MS alkalmazható élelmiszerbiztonsági és környezeti minták elemzésére is. Az élelmiszeripari alkalmazások során a technológiát gyakran használják élelmiszer-szennyező baktériumok és gombák gyors kimutatására és azonosítására, amely hozzájárul az élelmiszerbiztonság növeléséhez. A környezeti minták analízise során pedig lehetővé teszi a mikrobiális közösségek gyors és pontos karakterizációját, például vízminták vizsgálatakor (Ruelle *et al.* 2004).

IRODALOM

- Abou-Deif, M. H.–Rashed, M. A. S.–Khalil, K. M.–Fatma El-Szajed, M.: 2019. Proteomic analysis of heat shock proteins in maize (*Zea mays* L.). Bull. Natl. Res. Cent. 43: 199.
- Adams, W. R.–Huang, S.–Kriz, A. L.–Luethy, M. H.: 2004. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of zeins in mature maize kernels. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52. 7: 1842–1849.
- Aebersold, R.–Mann, M.: 2003. Mass spectrometry-based proteomics. Nature. 422. 6928: 198–207.
- Ahmad, F.–Babalola, O. O.–Tak, H. I.: 2012. Potential of MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid detection technique in plant pathology: identification of plant-associated microorganisms. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 404: 1247–1255.
- Albrethsen, J.: 2011. The first decade of MALDI protein profiling: a lesson in translational biomarker research. J. Proteomics. 74: 765–773.
- Anhalt, J. P.–Fenselau, C.: 1975. Identification of bacteria using mass spectrometry. Analytical Chemistry. 47. 2: 219–225.
- Aue, W. P.–Bartholdi, E.–Ernst, R. R.: 1976. Two-dimensional spectroscopy. Journal of Chemical Physics. 64: 2229–2246.

- Bader, O.–Weig, M.–Taverne-Ghadwal, L.–Lugert, R.–Gross, U.–Kuhns, M.:* 2010. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*. 16. 10: 1576–1583.
- Bax, A.:* 1994. Multidimensional nuclear magnetic resonance methods for protein studies. *Current Opinion in Structural Biology*. 4: 738–744.
- Becker, J. S.:* 2007. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)*. Wiley.
- Beier, B. D.–Quivey, R. G.–Berger, A. J.:* 2010. Identification of different bacterial species in biofilms using confocal Raman microscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 15. 6: 066001.
- Bloch, F.–Hansen, W. W.–Packard, M.:* 1946. The nuclear induction experiment. *Physical Review*. 70: 474–485.
- Busch, K. L.–Glish, G. L.–McLuckey, S. A.:* 1988. *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry: Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry*. VCH.
- Camp, C. H.–Cicerone, M. T.:* 2015. Chemically sensitive bioimaging with coherent Raman scattering. *Nature Photonics*. 9. 5: 295–305.
- Caruso, G.–Cavaliere, C.–Guarino, C.–Gubbiotti, R.–Foglia, P.–Lagana, A.:* 2008. Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 391: 381–390.
- Castañeda-Ovando, A.–Galán-Vidal, C. A.–Pacheco, L.–José, A. R.:* 2010. Characterization of main anthocyanins extracted from pericarp blue corn by MALDI-ToF MS. *Food Anal. Methods*. 3: 12–16.
- Chang, S.–Porto Carneiro-Leão, M.–Ferreira de Oliveira, B.–Souza-Motta, C.–Lima, N.–Santos, C.–Tinti de Oliveira, N.:* 2016. Polyphasic approach including MALDI-TOF MS/MS analysis for identification and characterisation of *Fusarium verticillioides* in Brazilian corn kernels. *Toxins*. 8. 3: 54.
- Chen, Y.–Chen, X.–Wang, H.–Bao, Y.–Zhang, W.:* 2014. Examination of the leaf proteome during flooding stress and the induction of programmed cell death in maize. *Proteome Sci.* 12: 33.
- Claydon, M. A.–Davey, S. N.–Edwards-Jones, V.–Gordon, D. B.:* 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*. 14. 11: 1584–1586.
- Cooks, R. G.–Ouyang, Z.–Takats, Z.–Wiseman, J. M.:* 2006. Ambient mass spectrometry. *Science*. 311. 5767: 1566–1570.
- Cotter, R. J.:* 1997. *Time-of-flight mass spectrometry: Instrumentation and applications in biological research*. ACS Publications. American Chemical Society Professional Reference Books. American Chemical Society. Washington DC. 320.
- Croxatto, A.–Prod'hom, G.–Greub, G.:* 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*. 36. 2: 380–407.

- Delhaye, M.–Dhamelincourt, P.*: 1975. Raman microprobe and microscope with laser excitation. *Journal of Raman Spectroscopy*. 3. 1: 33–43.
- Demirev, P. A.–Ho, Y. P.–Ryzhov, V.–Fenselau, C.*: 1999. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Analytical Chemistry*. 71. 14: 2732–2738.
- Deulofeu, M.–Peña-Méndez, E. M.–Vañhara, P.–Havel, J.–Morán, L.–Pecinka, L.–Bagó-Mas, A.–Verdú, E.–Salvadó, V.–Boadas-Vaello, P.*: 2022. Artificial neural networks coupled with MALDI-TOF MS serum fingerprinting to classify and diagnose pathological pain subtypes in preclinical models. *ACS Chemical Neuroscience*. 14. 2: 300–311.
- Diem, M.–Mazur, A.–Lenau, K.–Schubert, J.–Bird, B.–Miljković, M.–Krafft, C.–Popp, J.*: 2013. Molecular pathology via IR and Raman spectral imaging. *Journal of Biophotonics*. 6. 11–12: 855–886.
- Dyson, H. J.–Wright, P. E.*: 2004. Unfolded proteins and protein folding studied by NMR. *Chemical Reviews*. 104: 3607–3622.
- Emonet, S.–Shah, H. N.–Cherkaoui, A.–Schrenzel, J.*: 2010. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *PubMed. Clinical Microbiology and Infection*. 16. 11: 1604–1613.
- Ernst, R. R.–Anderson, W. A.*: 1966. Application of Fourier transformed spectroscopy to magnetic resonance. *Review of Scientific Instruments*. 37: 93–102.
- Evans, C. L.–Xie, X. S.*: 2008. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 1: 883–909.
- Fenn, J. B.–Mann, M.–Meng, C. K.–Wong, S. F.–Whitehouse, C. M.*: 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 246. 4926: 64–71.
- Fenselau, C.–Demirev, P. A.*: 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 20. 3: 157–171.
- Ferreira, L.–Vega, S. C.–Fernando, S. J.–Sandra, G. C.–Fabiola, M.–Antonio, O. D.–José, M. G. B.–Juan, L. M. B.*: 2010. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Fast and Reliable Identification from Agar Plates and Blood Cultures. *PLoS ONE*. 5. 12: e14235.
- Giebel, R.–Worden, C.–Rozsda, S. M.–Kleinheinz, G. T.–Robbins, M.–Sandrin, T. R.*: 2010. Microbial Fingerprinting using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS): Applications and Challenges. *Advances in Applied Microbiology*. 71: 149–184.
- Girault, S.–Chassaing, G.–Blais, C.–Brunot, A.–Bolbach, G.*: 1996. Coupling of MALDI-TOF Mass Analysis to the Separation of Biotinylated Peptides by Magnetic Streptavidin Beads. *Analytical Chemistry*. 68. 13: 2122–2126.
- Glish, G. L.–Vachet, R. W.*: 2003. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2: 140–150.

- Haag, A. M.–Taylor, S. N.–Johnston, K. H.–Cole, R. B.*: 1998. Rapid identification and speciation of *Haemophilus* bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 33. 8: 750–756.
- Herzberg, G.*: 1945. *Molecular Spectra and Molecular Structure – Vol. II: Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules*. D. Van Nostrand Company Inc. Lancaster Press. USA. 656.
- Hibben, J. H.*: 1939. *The Raman Effect and Its Chemical Applications*. Reinhold Publishing Corporation. USA. 550.
- Hillenkamp, F.–Karas, M.*: 2000. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, an experience. *International Journal of Mass Spectrometry*. 200: 71–77.
- Holland, R. D.–Wilkes, J. G.–Rafii, F.–Sutherland, J. B.–Persons, C. C.–Voorhees, K. J.–Lay, J. O.*: 1996. Rapid identification of intact bacteria using mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 10. 10: 1227–1232.
- Karas, M.–Bachmann, D.–Bahr, U.–Hillenkamp, F.*: 1987. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. 78: 53–68.
- Karas, M.–Bachmann, D.–Hillenkamp, F.*: 1985. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry*. 57: 2935–2939.
- Karas, M.–Hillenkamp, F.*: 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*. 60. 20: 2299–2301.
- Karplus, M.*: 1963. Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *Journal of the American Chemical Society*. 85: 2870–2871.
- Kaufmann, R.*: 1995. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 41: 155–175.
- Kay, L. E.–Torchia, D. A.–Bax, A.*: 1989. Backbone dynamics of proteins studied by ¹⁵N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy. *Biochemistry*. 28: 8972–8979.
- Kim, Y. W.–Changmin, S.–Seulee, L.–Kyoung, J. K.–Yung, H. Y.–Byung, G. K.–Yoo, K. L.–Hee, W. R.–Yun, G. K.*: 2015. MALDI-MS-Based Quantitative Analysis for Ketone Containing Homoserine Lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Analytical Chemistry*. 87. 2: 858–863.
- Kogelnik, H.–Porto, S.*: 1963. Continuous helium-neon red laser as a Raman source. *Journal of the Optical Society of America*. 53: 1446–1447.
- Kong, K.–Kendall, C.–Stone, N.–Nottingham, I.*: 2015. Raman spectroscopy for medical diagnostics – from *in vivo* biofluid assays to *in vivo* cancer detection. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 89: 121–134.
- Krishnamurthy, T.–Philip L. R.*: 1996. Rapid Identification of Bacteria by Direct Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Analysis of Whole Cells. *Journal of Advanced Research*. 10. 15: 1992–1996.

- La Scola, B.–Raoult, D.*: 2009. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE*. 4. 11: e8041.
- Lay, J. O.*: 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews*. 20. 4: 172–194.
- Lotz, A.–Ferroni, A.–Beretti, J. L.–Dauphin, B.–Carbonnelle, E.–Guet-Revillet, H.–Nassif, X.*: 2010. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 48. 12: 4481–4486.
- Mann, M.–Hendrickson, R. C.–Pandey, A.*: 2001. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*. 70: 437–473.
- March, R. E.*: 1997. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 32. 4: 351–369.
- Markides, K.–Gräslund, A.*: 2002. Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2002. *Royal Swedish Academy of Sciences*. 1–13.
- Marshall, A. G.–Comisarow, M.*: 1974. Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chemical Physics Letters*. 25: 282–283.
- Marshall, A. G.–Marto, J. A.–Forest, M. W.–Seldomridge, S.*: 1998. Structural Characterization of Phospholipids by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 67. 21: 3979: 3684.
- McAughtrie, S.–Faulds, K.–Graham, D.*: 2014. Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS): potential applications for disease detection and treatment. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 21: 40–53.
- Mehta, A.–Silva, L. P.*: 2015. MALDI-TOF MS profiling approach: how much can we get from it? *Frontiers in Plant Science*. 6: 184.
- Mittermaier, A.–Kay, L. E.*: 2009. Observing biological dynamics at atomic resolution using NMR. *Trends in Biochemical Sciences*. 34: 601–611.
- Montaser, A.*: 1998. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. 1008.
- Neuhaus, D.–Williamson, M. P.*: 1989. The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 18: 435–468.
- O’Kennedy, K.–Fox, G. P.–Manley, M.*: 2017. Zein characterisation of South African maize hybrids and their respective parental lines using MALDI-TOF MS. *Food Analytical Methods*. Springer. DOI:10.1007/s12161-016-0725-x
- Ocaña, M. F.–Fraser, P. D.–Patel, R. K.–Halket, J. M.–Bramley, P. M.*: 2007. Mass spectrometric detection of CP4 EPSPS in genetically modified soya and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 21. 3: 319–328.
- Patel, R.*: 2015. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry*. 61. 1: 100–111.

- Pattemore, J. A.–Rice, N.–Marshall, D. F.–Waugh, R.–Henry, R. J.*: 2010. Cereal variety identification using MALDI-TOF mass spectrometry SNP genotyping. *Journal of Cereal Science*. 52. 3: 356–361.
- Pineda, F. J.–Lin, J. S.–Fenselau, C.–Demirev, P. A.*: 2000. Testing the significance of microorganism identification by mass spectrometry and proteome database search. *Analytical Chemistry*. 72. 15: 3739–3744.
- Porto, S.–Wood, D.*: 1962. Ruby optical maser as a Raman source. *Journal of the Optical Society of America*. 52: 251–252.
- Postu, P. A.–Ion, L.–Drochioiu, G.–Petre, B. A.–Glocker, M. O.*: 2019. Mass spectrometric characterization of the zein protein composition in maize flour extracts. *Electrophoresis*. 40. 20: 2747–2758.
- Preianò, M.–Maggisano, G.–Murfunì, M. S.–Vilella, C.–Colica, C.–Fregola, A.–Peláida, C.–Lombardo, N.–Pelaia, G.–Savino, R.–Terracciano, R.*: 2018. Rapid detection and identification of antimicrobial peptide fingerprints of nasal fluid by mesoporous silica particles and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry: From the analytical approach to the diagnostic applicability in precision medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 19. 12: 4005.
- Pribil, P.–Fenselau, C.*: 2005. Characterization of Enterobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 77. 18: 6092–6095.
- Proctor, W. G.–Yu, F. C.*: 1950. The dependence of a nuclear magnetic resonance frequency upon chemical compound. *Physical Review*. 77: 717–717.
- Prod'hom, G.–Bizzini, A.–Durussel, C.–Bille, J.–Greub, G.*: 2010. Affiliations Expand Performance of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *PubMed. Clinical Laboratory*. 55. 7–8: 289–296.
- Puppels, G.–De Mul, F.–Otto, C.–Greve, J.–Robert-Nicoud, M.–Arndt-Jovin, D.–Jovin, T.*: 1990. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy. *Nature*. 347: 301–303.
- Puppels, G.–Garritsen, H.–Segers-Nolten, G.–De Mul, F.–Greve, J.*: 1991. Raman microspectroscopic approach to the study of human granulocytes. *Biophysical Journal*. 60: 1046–1056.
- Purcell, E. M.–Torrey, H. C.–Pound, R. V.*: 1946. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Physical Review*. 69: 37–38.
- Ruelle, V.–El Moulaj, B.–Zorzi, W.–Ledent, P.–Pauw, E. D.*: 2004. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 18. 18: 2013–2019.
- Samek, O.–Bernatová, S.–Ježek, J.–Šiler, M.–Šerý, M.–Krzyžánek, V.–Hrubanová, K.–Zemánek, P.–Holá, V.–Řužička, F.*: 2015. Identification of individual biofilm-forming bacterial cells using Raman tweezers. *Journal of Biomedical Optics*. 20: 051038.

- Seng, P.–Drancourt, M.–Gouriet, F.–La Scola, B.–Fournier, P. E.–Rolain, J. M.–Raoult, D.:* 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*. 49. 4: 543–551.
- Sidransky, D.–Irizarry, R.–Califano, J. A.–Li, X.–Ren, H.–Benoit, N.–Mao, L.:* 2003. Serum protein MALDI profiling to distinguish upper aerodigestive tract cancer patients from control subjects. *J. Natl. Cancer. Inst.* 95: 1711–1717.
- Simon, Zs.–Lovász, Cs.:* 2016. Genetic purity testing of maize hybrids using a MALDI-TOF mass spectrometric method. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*. 62. 2: 1098–1104.
- Skrynnikov, N. R.–Dahlquist, F. W.–Kay, L. E.:* 2002. Reconstructing NMR spectra of invisible excited protein states. *Journal of the American Chemical Society*. 124: 12352–12360.
- Smith, R. D.–Bruce, J. E.–Wu, Q.–Lei, Q. P.:* 1997. New mass spectrometric methods for the study of noncovalent associations of biopolymers. *Chemical Society Reviews*. 26: 191–202.
- Sparkman, O. D.:* 2000. Mass spectrometry desk reference. Global View Publishing. USA. 106.
- Tjandra, N.–Bax, A.:* 1997. Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science*. 278: 1111–1114.
- Vargha, M.–Takáts, Z.–Konopka, A.–Nakatsu, C. H.:* 2006. Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *Journal of Microbiological Methods*. 66. 3: 399–409.
- Walter, A.–Schumacher, W.–Bocklitz, T.–Reinicke, M.–Rösch, P.–Kothe, E.–Popp, J.:* 2011. From bulk to single-cell classification of the filamentous growing *Streptomyces* bacteria by means of Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy*. 65. 10: 1116–1125.
- Weickhardt, C.–Moritz, F.–Grottemeyer, J.:* 1996. Time-of-flight mass spectrometry: State-of the-art in chemical analysis and molecular science. *Mass Spectrometry Reviews*. 3: 139–162.
- Williamson, M. P.–Havel, T. F.–Wüthrich, K.:* 1985. Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by nuclear magnetic resonance and distance geometry. *Journal of Molecular Biology*. 182: 295–315.
- Wishart, D. S.:* 2011. Interpreting protein chemical shift data. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 58: 62–87.
- Wu, L.–Zu, X.–Wang, X.–Sun, A.–Zhang, J.–Wang, S.–Chen, Y.:* 2013. Comparative Proteomic Analysis of the Effects of Salicylic Acid and Abscisic Acid on Maize (*Zea mays* L.) Leaves. *Plant Mol. Biol. Rep.* 31: 507–516.
- Xie, W.–Schlücker, S.:* 2013. Medical applications of surface-enhanced Raman scattering. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 15: 5329–5344.

- Xin, L.-Zheng, H.-Yang, Z.-Guo, J.-Liu, T.-Sun, L.-Xiao, Y.-Yang, J.-Yang, Q.-Guo, L.:* 2018. Physiological and proteomic analysis of maize seedling response to water deficiency stress. *Journal of Plant Physiology*. 228: 29–38.
- Yin, Z.-Zhang, Z.-Deng, D.-Chao, M.-Gao, Q.-Wang, Y.-Yang, Z.-Bian, Y.-Hao, D.-Xu, C.:* 2014. Characterization of Rubisco Activase Genes in Maize: An α -Isoform Gene Functions alongside a β -Isoform Gene. *Plant Physiology*. 164. 4: 2096–2106.
- Zhang, X. L.-Si, B. W.-Fan, C. M.-Li, H. J.-Wang, X. M.:* 2014. Proteomics identification of differentially expressed leaf proteins in response to *Setosphaeria turcica* infection in resistant maize. *Journal of Integrative Agriculture*. 13. 4: 789–803.

A szerzők levelezési címe – Address of the authors:

*Kalina Hella – Dr. Nagy János
Debreceni Egyetem MÉK
Földhasznosítási, Műszaki és Precíziós Technológiai Intézet
Debrecen
Böszörményi út 138.
H-4032
*kalina.hella@agr.unideb.hu