

ANGEWANDTE NATURWISSENSCHAFTEN

CHARAKTERISIERUNG VON ALGEN AUS DER „ALTEN ELBE“ BEI MAGDEBURG MITTELS MALDI-TOF-MS UND SEQUENZIERUNG

Characterization of algae from a backwater of the river Elbe („Alten Elbe“) using
MALDI-TOF-MS and sequencing

Jessica Zwanzig*¹, Christiana Cordes¹ & Bernd Feuerstein²

¹Hochschule Anhalt, Strenzfelder Allee 28, 06406 Bernburg

²Hochschule Magdeburg-Stendal, Osterburger Straße 25, 39576 Stendal

Eingegangen am 11.01.2011; Überarbeitet eingereicht am 26.04.2011; nicht peer-reviewed

Korrektorat: Nicoletta Wojtera

Zusammenfassung

Die „Alte Elbe“ bei Magdeburg ist ein Altwasser, das durch die Abtrennung und Isolierung von der Stromelbe entstanden ist und einem natürlichen Alterungsprozess unterliegt. Mehrere biotische und abiotische Faktoren bestimmen dabei das jeweilige Erscheinungsbild der Planktonbiodiversität, wobei erhebliche jahreszeitliche Schwankungen um das Jahresmittel von etwa $3 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ Phytoplankton-Gesamtbiovolumen auftreten. Nach Lüderitz et al. (2009) waren im Jahr 2006 im Phytoplankton vor allem Cyanophyceae mit den Arten *Limothrix redecki*, *Microcystis flosaquae* und *Planktothrix agardhi*, gefolgt mit deutlichem Abstand von Chryptophyceae, Chrysophyceae und Dinophyta die dominierenden Klassen.

MALDI-TOF-MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*) ist schon seit vielen Jahren eine vielseitig verwendete Methode. Diese Technik erlaubt eine sehr schnelle Analyse verschiedenster Biomoleküle, z.B. Proteine, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate (Bonk & Humeny, 2001).

Ziel dieses Projektes ist es, eine Datenbank mit massenspektrometrischen Daten (sog. *Peptid Mass Fingerprints*) für aus der „Alte Elbe“ stammende Algen aufzubauen. Damit soll die Möglichkeit einer sehr schnellen Identifizierung dieser Algen eröffnet werden. Als Identifizierungsmethodik soll die MALDI-TOF-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) etabliert werden. Für den Aufbau einer entsprechenden Datenbank müssen parallel die mittels MALDI-TOF-MS für jede Spezies ermittelten „Fingerprints“ durch molekularbiologische Untersuchungen verifiziert werden. Dies erfolgt durch Kombination von PCR (*Polymerase chain reaction*) und Sequenzierungsanalyse.

Mit Hilfe eines universellen Primerpaares konnte ein Teil der 18S rDNA der untersuchten Algen amplifiziert und sequenziert werden. Nach Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit den hinterlegten Sequenzen in der BLAST-Datenbank wurden die Algen eindeutig identifiziert. Die Erstellung von Massenspektren der vorliegenden Algenproben mittels MALDI-TOF-MS ist möglich. Zurzeit werden weiterhin Spektren verschiedener Algenproben gesammelt, um bei

genügender Anzahl Referenzspektren in der Datenbank zu hinterlegen. Somit wird eine schnelle und einfache Bestimmung unbekannter Algen möglich.

Schlüsselwörter: MALDI-TOF | Identifizierung von Algen | Sequenzierung

Abstract

The river „Alte Elbe“ at Magdeburg is characterized as a backwater which was formed by separation and isolation from the river Elbe. It underlies a natural aging process. Different biotic and abiotic factors determine the appearance of the plankton community. High seasonally variabilities occur about the annual average of $3 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ phytoplankton complete bio volume. In 2006 there were mainly found Cyanophyceae (*Limothrix redecki*, *Microcystis flosaquae* and *Planktothrix agardhi*) and several species of Chryptophyceae, Chrysophyceae and Dinophyta (Lüderitz et al., 2009).

MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*) is an already multifunctional used method. This technology allows a very fast analysis of different biomolecules, e.g. proteins, nucleic acids and carbohydrates (Bonk & Humeny, 2001).

Aim of this project is the development of a database with so called peptid mass fingerprints of algae which were isolated from the „Alte Elbe“. Therewith a fast identification of algae will be possible. The method MALDI-TOF-MS shall be established for identification. For developing the appropriate database the determined fingerprints have to be verified by molecular biology methods, a combination of PCR (Polymerase chain reaction) and sequencing analysis is used.

A fragment of the 18S rDNA of the algae could be amplified and sequenced by a universal primer pair. The identification of the algae were definitely shown after an alignment of the determined sequences with sequences of the BLAST database. The creation of mass spectra of the algae using MALDI-TOF-MS is possible. Currently mass spectra of different algae were collected to deposit reference spectra into the database. Therefore a fast and easy determination of unknown algae will be possible.

keywords: MALDI-TOF-MS | Identification of algae | sequencing

*s.weinholz@loel.hs-anhalt.de; 0049/3471/355/1198

Die „Alte Elbe“ bei Magdeburg ist ein Altwasser, das durch die Abtrennung und Isolierung von der Stromelbe entstanden ist und einem natürlichen Alterungsprozess unterliegt. Mehrere biotische und abiotische Faktoren bestimmen dabei das jeweilige Erscheinungsbild der Planktonbionose, wobei erhebliche jahreszeitliche Schwankungen um das Jahresmittel von etwa $3 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ Phytoplankton-Gesamtbiolumen auftreten. Nach Lüderitz et al. (2009) waren im Jahr 2006 im Phytoplankton vor allem Cyanophyceae mit den Arten *Limothrix redecki*, *Microcystis flosaquae* und *Planktothrix agardhi*, gefolgt mit deutlichem Abstand von Chryptophyceae, Chrysophyceae und Dinophyta die dominierenden Klassen.

MALDI-TOF-MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*) ist schon seit vielen Jahren eine vielseitig verwendete Methode. Diese Technik erlaubt eine sehr schnelle Analyse verschiedenster Biomoleküle, z.B. Proteine, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate (Bonk & Humeny, 2001).

Ziel dieses Projektes ist es, eine Datenbank mit massenspektrometrischen Daten (sog. *Peptid Mass Fingerprints*) für aus der „Alte Elbe“ stammende Algen aufzubauen. Damit soll die Möglichkeit einer sehr schnellen Identifizierung dieser Algen eröffnet werden. Als Identifizierungsmethodik soll die MALDI-TOF-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) etabliert werden. Für den Aufbau einer entsprechenden Datenbank müssen parallel die mittels MALDI-TOF-MS für jede Spezies ermittelten „Fingerprints“ durch molekularbiologische Untersuchungen verifiziert werden. Dies erfolgt durch Kombination von PCR (*Polymerase chain reaction*) und Sequenzierungsanalyse.

METHODEN UND ERGEBNISSE

Die verwendeten Algen wurden von Bernd Feuerstein (Hochschule Magdeburg-Stendal) zur Verfügung gestellt, in einem speziellen Algenmedium (*Bold's Basal*) sowohl in Flüssig- als auch auf Festkultur (Zugabe von 2% Agar-Agar) angezogen und unter definierten Temperatur- und Lichtbedingungen kultiviert.

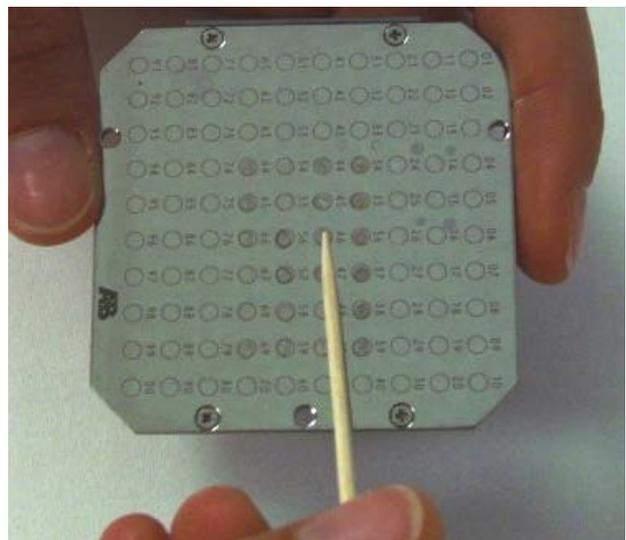
Zur Optimierung der DNA-Extraktion aus Algen wurden verschiedene Aufschlussmethoden hinsichtlich ihrer Eignung, Zeitbedarf und Qualität der resultierenden DNA untersucht. Dabei erwies sich die Behandlung mit Glasperlen als erfolgreich. Die isolierte DNA diente dann als Template für die PCR, bei der ein universelles Primerpaar zur Amplifikation eines Teiles der 18S rDNA genutzt wurde (Diez et al., 2001). Anschließend konnten die generierten PCR-Fragmente sequenziert (CEQ 8000, Beckman Coulter, Krefeld) und mit Hilfe der BLAST-Datenbank (Basic Local Alignment Search Tool) identifiziert werden.

Die MALDI-TOF-Analysen wurden mit dem Voyager DE Pro (Applied Biosystems, Forster, USA) durchgeführt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde etwas Algenprobe von der Agar-Platte entnommen, auf das MALDI-Target übertragen und für die Co-Kristallisation mit $0,3 \mu\text{L}$ DHB-Matrix (2,5-Dihydroxy-Benzoesäure) überschichtet (siehe Abb. 1).

Der Probenentferner wird in das Voyager DE PRO System überführt und mit Laserenergie beschossen, wobei die Matrix explosionsartig verdampft. Die Analytmoleküle werden in die Gasphase überführt, bei einer Spannung



(a)



(b)

Abb. 1: (a) Probenentnahme von der Agar-Platte und (b) Übertragung auf das MALDI-Target.

von 20 kV beschleunigt und im Massenanalysator entsprechend ihres Masse/Ladungsverhältnisses getrennt. Dabei wird die Flugzeit ermittelt, die ein Ion benötigt, um eine definierte Driftstrecke zu durchfliegen. Molekül-Ionen mit kleinerem Masse/Ladungsverhältnis durchfliegen den TOF-Analysator schneller als Moleküle mit größerem Masse/Ladungsverhältnis (Hortin, 2006).

Am Detektor werden die ankommenden Ionen in elektrische Signale umgewandelt und in Form von Massenspektren dargestellt. Unmittelbar werden die erstellten Spektren in der Analysensoftware Data Explorer 4.0 (Applied Biosystems, Forster, USA) mittels Basislinienkorrektur und Peakglättung

bearbeitet sowie die Peaks beschriftet (siehe Abb. 2). Die Auswertung der Massenspektren erfolgt anschließend mit Hilfe des Softwareprogrammes SARAMIS¹.

ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Mit Hilfe des universellen Primerpaares wurde ein Teil der 18S rDNA der untersuchten Organismen amplifiziert und sequenziert. Nach Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit den hinterlegten Sequenzen in der BLAST-Datenbank konnten die Algen eindeutig identifiziert werden.

Die Erstellung von Massenspektren der vorliegenden Algenproben mittels MALDI-TOF-MS ist möglich. Zurzeit werden weiterhin Spektren verschiedener Algenproben gesammelt, um bei genügender Anzahl Referenzspektren in der Datenbank zu hinterlegen. Somit wird eine schnelle und einfache Bestimmung unbekannter Algen möglich.

REFERENZEN

- Bonk T & Humeny A (2001):** MALDI-TOF-MS analysis of protein and DNA. *The Neuroscientist* 7(1): 6–12.
- Diez B, Pedros-Alio C, Marsh T & Massana R (2001):** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl Environ Microbiol* 67(7): 2942–2951.
- Hortin G (2006):** The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin Chem* 52(7): 1223–1237.
- Lüderitz V, Langheinrich U & Kunz C (2009):** Flussaltwässer. Vieweg + Teubner Verlag GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden.

Zu zitieren als: **Zwanzig J, Cordes C & Feuerstein B (2011):** Charakterisierung von Algen aus der „Alten Elbe“ bei Magdeburg mittels MALDI-TOF-MS und Sequenzierung. *Zeitschrift für Nachwuchswissenschaftler* 2011/3(2): S. 5–7

Please cite as: **Zwanzig J, Cordes C & Feuerstein B (2011)** Characterization of algae from a backwater of the river Elbe („Alten Elbe“) using MALDI-TOF-MS and sequencing. *German Journal for Young Researchers* 2011/3(2): pp. 5–7

¹ www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/home. Archiviert durch WebCite®: www.webcitation.org/5yEBsOF7m; Zugriff 04.03.2011