

SLIKOVNA MASNA SPEKTROMETRIJA

Masna spektrometrija je glavna metoda za strukturno analizo kompleksnih proteinskih zmesi – določimo lahko strukturo molekul, izmerimo njihovo molekulsko maso in opredelimo molekulsko formulo. Je učinkovita tehnika za identifikacijo proteinov na osnovi analize ioniziranih molekul v plinski fazi. Slikovna masna spektrometrija je tehnika, ki se uporablja v masni spektrometriji za vizualizacijo prostorske razporeditve določenih spojin, biomarkerjev, metabolitov, peptidov in proteinov s pomočjo molekulske mase. Izvajamo jo z uporabo dveh različnih pristopov, microprobe in microscope.

LMMS – LASER MICROPROBE MS : Vzorec razdelimo na več delov in vsakega od njih analiziramo posebej, dobimo več masnih spektrov in le-te združimo, da dobimo masni spekter celotnega vzorca.

LAMMA – LASER MICROPROBE MASS ANALYSIS : Vzorec obstreljujemo z laserjem v več pulzih, pri tem ob vsakem merjenju dobimo spekter celotnega vzorca.

Za ionizacijo bioloških molekul pri MSI se uporablja desorpcijska ionizacija, kamor prištevamo SIMS (sekundarna ionska masna spektrometrija), MALDI (ionizacija v matriksu z lasersko desorpcijo) in DESI (desorpcijska elektrosprej masna spektrometrija). To so t.i. »mehke« tehnike ionizacije. **SIMS**: Ta tehnika ionizacije se uporablja predvsem za detekcijo lipidov ter majhnih molekul v vzorcih tkiva. Primarne ione se z določeno intenziteto usmeri na površino vzorca. Ti ioni iz vzorca vzbudijo sekundarne ione, katere naprej analizira masni analizator. Od intenzitete primarnih ionov ločimo med statičnim in dinamičnim SIMSom. **MALDI**: Ta tehnika ionizacije se uporablja za detekcijo velikih biomolekul, predvsem proteinov. Večina vzorcev ne vsebuje kromoforov, zato se uporabi matriks, ki se ga vmeša med vzorec. Ta absorbira v UV spektru in to energijo prenese na vzorec. **DESI**: Analiza biomolekul poteka direktno iz vzorca, brez predhodne obdelave. Proces ionizacije se izvaja pri normalnem tlaku. Z uporabo elektrospreja se elektroaerosol cilja na površino vzorca. Tu se analit desorbira in naprej analizira v masnem analizatorju. Nastale ione se loči v masnem analizatorju. Pri Tehniki MALDI se najbolj pogosto uporablja TOF analizator. Novejše tehnike so MALDI FT-ICR, MALDI FT-Orbitrap in Tandemska masna spektrometrija.

Pri pripravi vzorca moramo biti pozorni tudi na sam odvzem vzorca in ustrezno obdelavo biološkega materiala pred analizo. Slednja je nujna za preprečevanje degradacije in prostorske prerazporeditve molekul. Za MS imaging potrebujemo tanke plasti tkiva. Le-te pridobimo na dva načina:

Sekcioniranje z zamrzovanjem (cryo-sectioning)

Temperatura, pri kateri sekcioniramo, je odvisna od tipa tkiva (pri maščobnem tkivu moramo uporabiti nižje temperature kot pri tkivih z več vode).

Metoda raztegovanja vzorca (sample stretching method)

Tkivno rezino odložimo na steklene kroglice in jo homogeno raztegnemo v dveh smereh.

Pri obeh metodah bomo morda morali vzorec še nadaljnje obdelati – spiranje, encimska razgradnja [Lahko izboljšamo detekcijo proteinov in sposobnost identifikacije.] in nalaganje matriksa.

Če sodi naš analit med soli ali lipide je odsvetovano kakršnokoli spiranje, ker bi ga s standardnimi topili odstranili iz vzorca. Pri peptidih in proteinih se poslužujemo enega ali več ciklov spiranja pred nalaganjem matriksa. Za odstranjevanje površinskih lipidov in soli najpogosteje uporabimo 70% - 80% etanol (4°C). Odstranitev soli omogoča homogeno kristalizacijo matriksa, kar poveča učinkovitost ionizacije peptidov in proteinov. Soli in lipide zlahka ioniziramo, zato lahko pride do saturacije na detektorju.

Obdelava površine za SIMS

Metal assisted SIMS (Meta-SIMS) : Vzorec obložimo s tanko plastjo (1-5 mm) kovine (zlato). S tem povečamo ionizacijo nekaterih molekul (holesterol in lipidi).

Matrix – enhanced SIMS (ME-SIMS) : Uporabljen je MALDI matriks (organske kisline), katerega naložijo na površino vzorca.

Izbira matriksa in nalaganje za MALDI in ME-SIMS

Nalaganje matriksa mora biti homogeno (da se izognemo lokalnim razlikam v desorpciji in ionizaciji), ponovljivo, enostavno in mora zagotavljati zadostno mero občutljivosti. Matriks ne sme reagirati z analitom in ne sme biti podvržen sublimaciji. Prav tako moramo pri izbiri matriksa upoštevati molekulsko maso analita. Matriks lahko nalagamo v trdnem stanju ali pa v raztopini.