

SLIKOVNA MASNA SPEKTROMETRIJA

Petra Malavašič

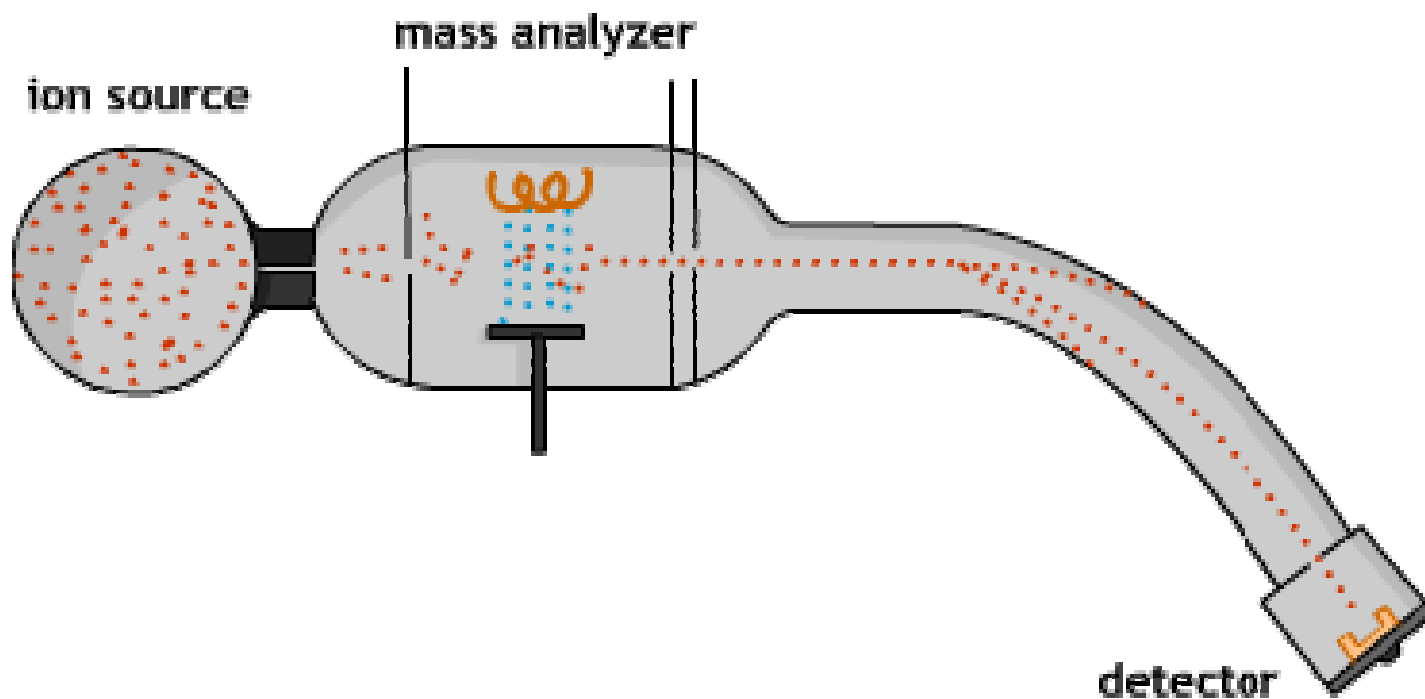
Ines Kerin

Petra Zgaga

Masna spektrometrija

- glavna metoda za strukturno analizo kompleksnih proteinskih zmesi
- učinkovita tehnika za identifikacijo proteinov na osnovi analize ioniziranih molekul v plinski fazi

Masni spektrometer

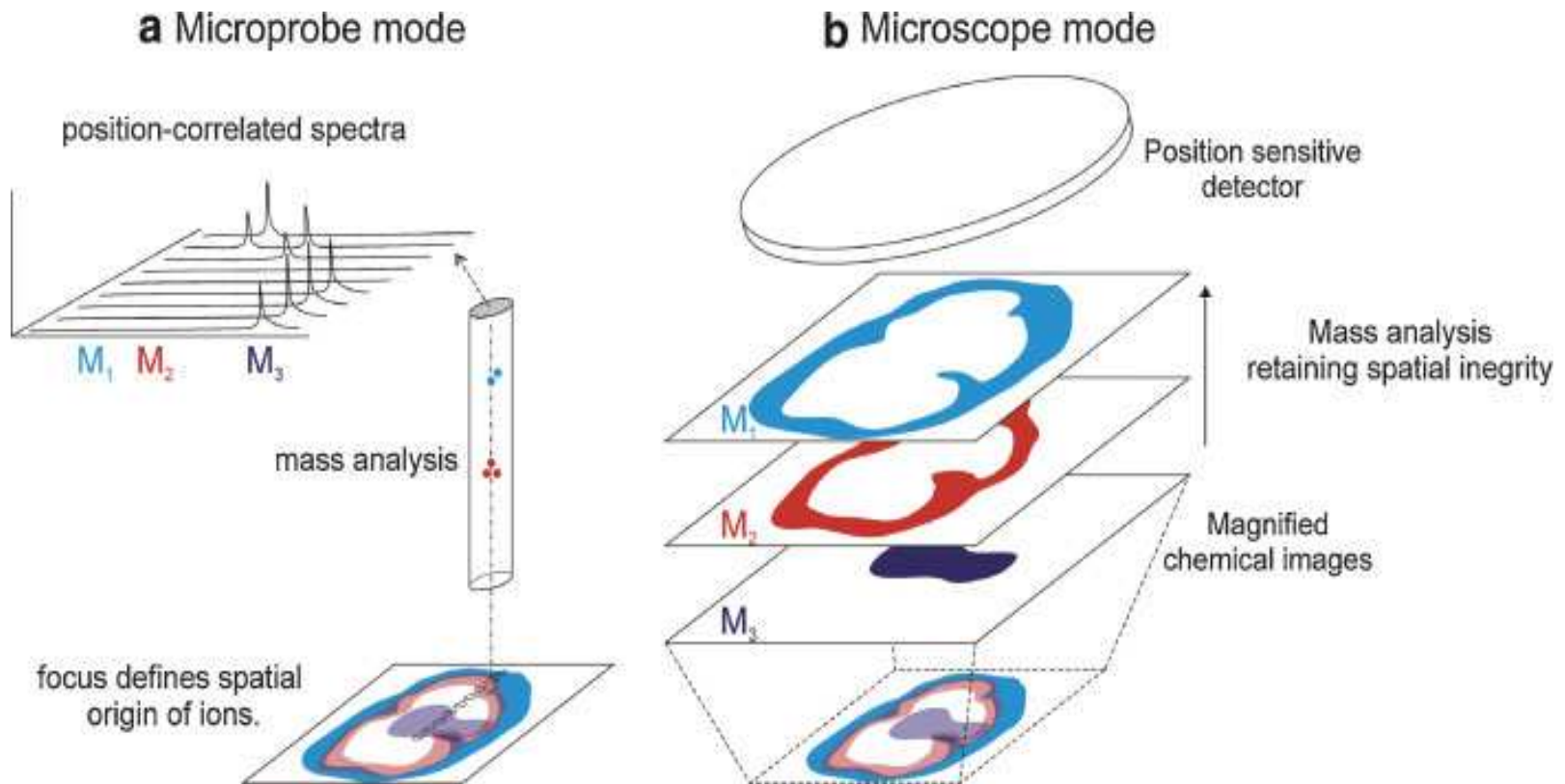


Slika 1: Masni spektrometer

Vir: http://www.nfstc.org/pdi/Subject09/pdi_s09_m03_04.htm

Slikovna masna spektrometrija

- tehnika, ki se uporablja v masni spektrometriji za vizualizacijo prostorske predstavnosti določenih spojin, biomarkerjev, metabolitov, peptidov in proteinov s pomočjo molekulske mase
- Dva različna pristopa: microprobe in microscope



Tehniki microprobe in microscope

Vir: McDonnell A.L., Heeren M.A.R. 2007. Imaging mass spectrometry. Mass spectrometry reviews, 26, 606-643

METODE IONIZACIJE PRI MSI

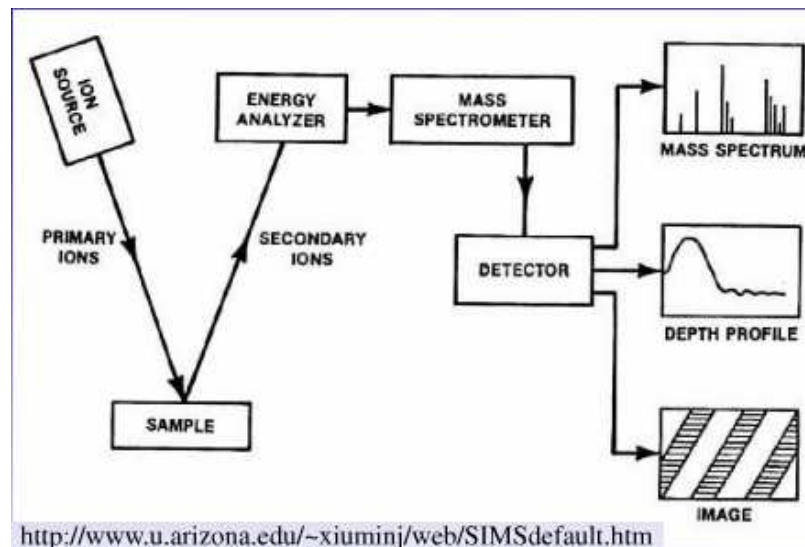
- DESORPCIJSKA IONIZACIJA

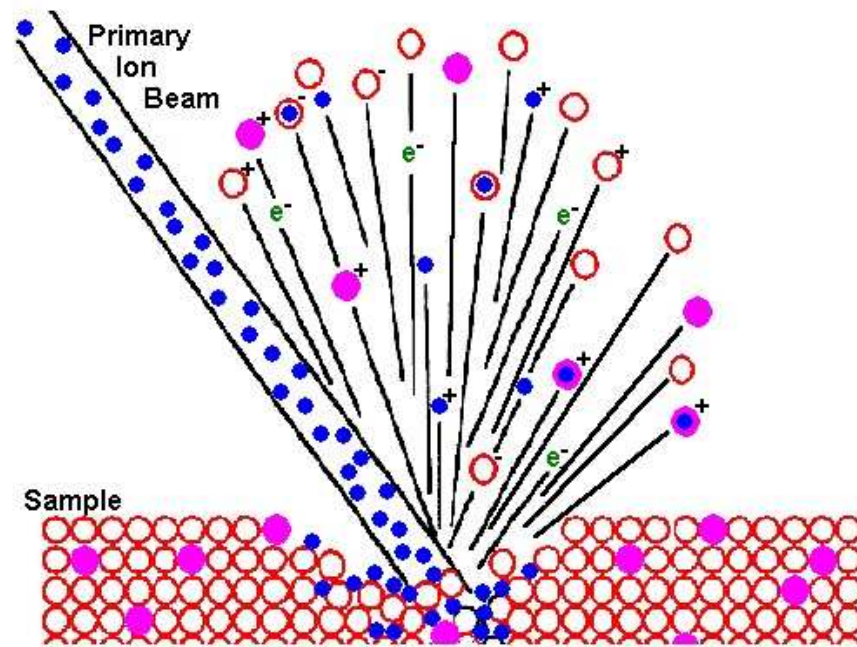
OZNAKA	IME	IONIZACIJA	LOČLJIVOST	LIMITA DETEKCIJE
SIMS	Sekundarna ionska masna spektrometrija	primarni ioni z veliko energijo	pod 1 μm	500 do 1000 Da
MALDI	Ionizacija v nosilcu (matriksu) z lasersko desorpcijo	laserska svetloba	10 do 150 μm	2kDa
DESI	Desorpcijska elektrospej ionizacijska masna spektrometrija	elektrospej	100 do 150 μm	30 do 60 kDa

SIMS (SEKUNDARNA IONSKA MASNA SPEKTROMETRIJA)

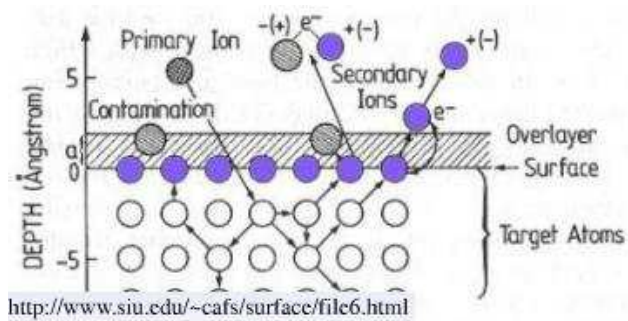
PRIMARNE IONE Z DOLOČENO INTENZITETO USMERIMO NA POVRŠINO VZORCA. TI IONI VZBUDIJO SEKUNDARNE IONE, KATERE ANALIZIRAMO V MASNEM ANALIZATORJU

IONIZACIJA POTEKA V VISOKEM VAKUUMU





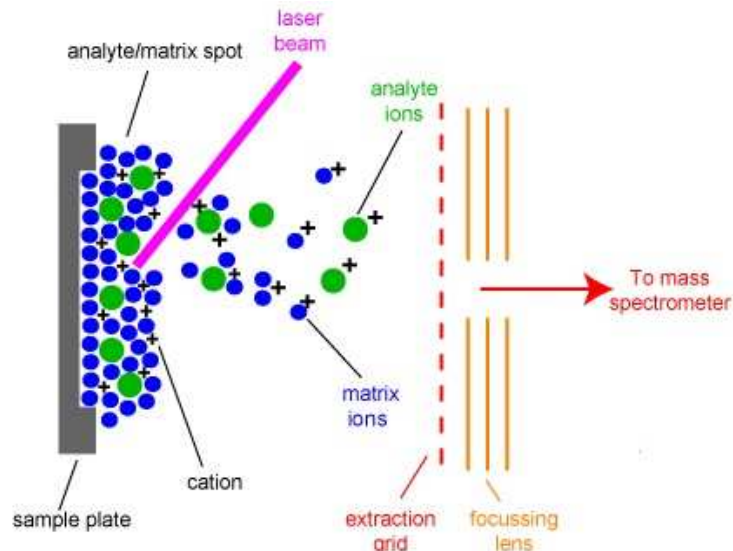
<http://www.nt.ntnu.no/users/floban/KJ%20%203055/Surface/SIMS.htm>



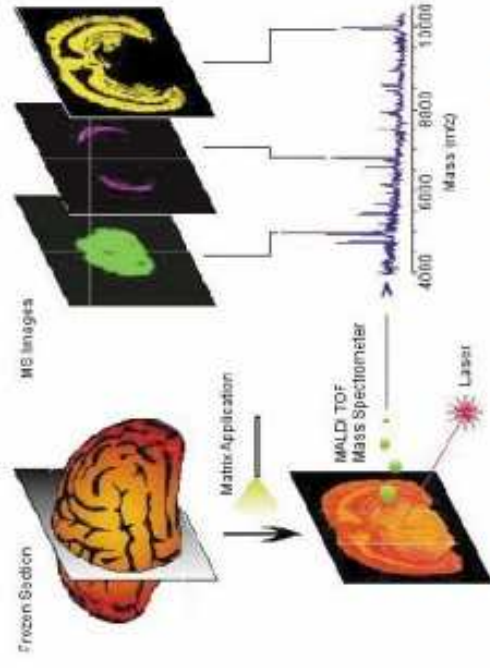
<http://www.siu.edu/~cafs/surface/file6.html>

MALDI (IONIZACIJA V NOSILCU (MATRIKSU) Z LASERSKO DESORPCIJO)

- ZA DETEKCIJO VELIKIH BIOMOLEKUL, PREDVSEM PROTEINOV
- MATRIKS DELUJE KOT PRIMARNI AKCEPTOR LASERSKE ENERGIJE
- IONIZACIJA POTEKA V VISOKEM VAKUUMU



Vir: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/newversion/maldi-ionisation.htm>

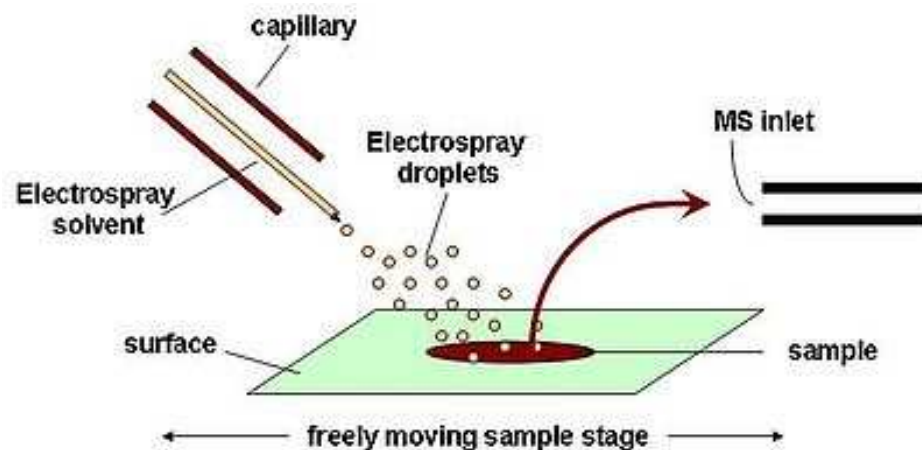


Stoeckli, et al. Nature Medicine (2001).



DESI (DESORPCIJSKA ELEKTROSPREJ IONIZACIJSKA MASNA SPEKTROMETRIJA)

- UPORABLJA SE ZA DETEKCIJO TAKO MAJHNIH KOT VEČJIH BIOMOLEKUL (NAJPOGOSTEJE LIPIDOV)
- IONIZACIJA POTEKA PRI NORMALNEM TLAKU
- Z UPORABO ELEKTROSPREJA CILJAMO ELEKTROAEROSOL NA POVRŠINO VZORCA . TU SE ANALIT DESORBIRA IN NAPREJ ANALIZIRA V MASNEM ANALIZATORJU



Vir: http://en.wikipedia.org/wiki/Desorption_electrospray_ionization

MASNI ANALIZATORJI PRI MSI

- DOLOČITEV m/z
- PRI TEHNIKI MALDI IN STATIČNEM SIMS SE NAJBOLJ POGOSTO UPORABLJA TOF ANALIZATOR Z REFLEKTRONI
- NOVEJŠE TEHNIKE: MALDI FT-ICR , MALDI FT-Orbitrap in Tandemska masna spektrometrija.

PRIPRAVA VZORCA

- **Ustrezen odvzem in obdelava** biološkega materiala – preprečevanje degradacije
- Za MS imaging potrebujemo tanke rezine tkiva:
 - Sekcioniranje z zamrzovanjem (à konduktivna površina à analiza)
 - Metoda raztegovanja vzorca (à steklene kroglice à homogeno raztegnemo v dveh smereh à analiza)

NADALJNJA OBDELAVA VZORCA

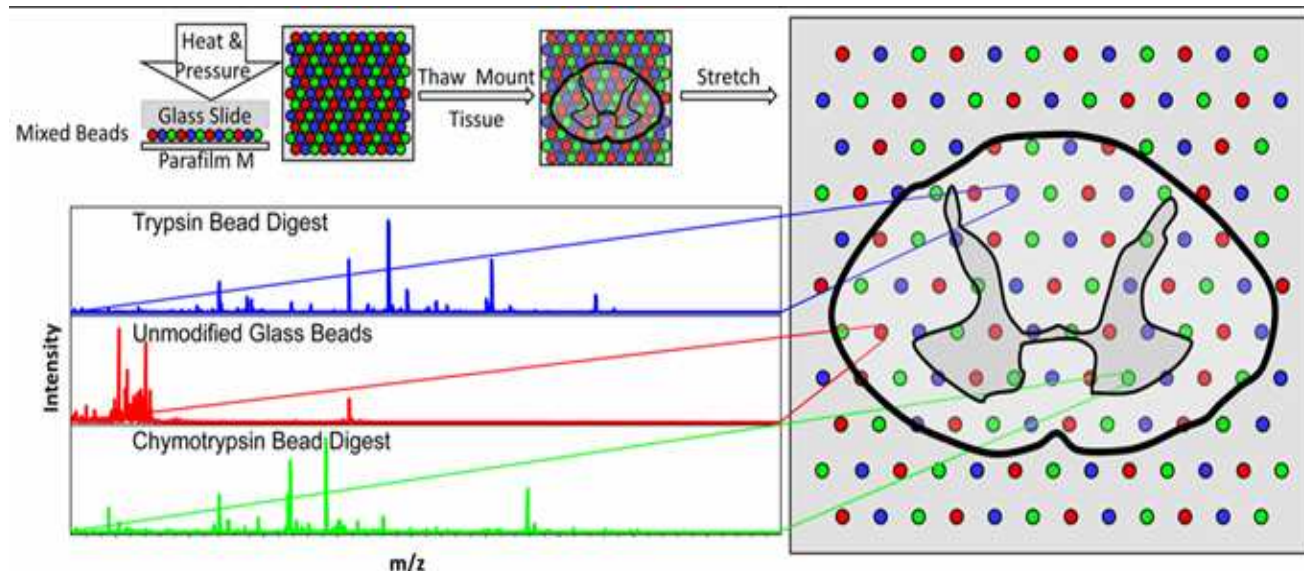
- **SPIRANJE**

- **Analit je peptid/protein:** soli in lipide odstranimo z etanolom (70-80%, 4°C); to omogoča homogeno kristalizacijo matriksa, kar poveča učinkovitost ionizacije peptidov/proteinov. Soli in lipide zlahka ioniziramo → če jih ne bi odstranili bi prišlo do saturacije na detektorju!
- **Analit je sol/lipid:** spiranje je odsvetovano, ker bi ga s standardnimi topili sprali iz vzorca!

NADALJNJA OBDELAVA VZORCA

- **ENCIMSKA RAZGRADNJA**

Lahko izboljšamo detekcijo proteinov in sposobnost identifikacije. **(fragmentacija)**



- **Vir:** Tucker, K. R., Serebryanny, L. A., Zimmerman, T. A., Rubakhin, S. S., & Sweedler, J. V. (2012). NIH Public Access, 2(4), 785–795. doi:10.1039/C0SC00563K.The

NADALJNJA OBDELAVA VZORCA

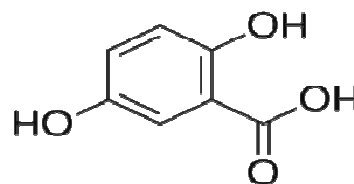
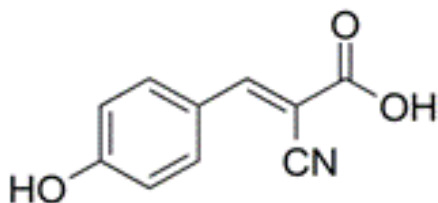
- **OBDELAVA POVRŠINE ZA SIMS**

- MetA-SIMS (metal assisted SIMS)

Vzorec obložimo s tanko plastjo kovine à povečana ionizacija nekaterih molekul (holesterol, lipidi).

- ME-SIMS (matrix enhanced SIMS)

Uporabimo matriks iz organskih kislin; α -ciano-4-hidroksicimetna kislina ali 2,5-dihidroksi benzojska kislina; s tem povečamo masno območje in zaznamo tudi peptide, ki jih pri običajnem SIMS ne bi.



NADALJNJA OBDELAVA VZORCA

- IZBIRA IN NALAGANJE MATRIKSA

- matriks ne sme reagirati z analitom
- ne sme biti podvržen sublimaciji
- Plast matriksa mora biti čim bolj homogena, da se izognemo lokalnim razlikam v desorpciji in ionizaciji.

NALAGANJE MATRIKSA

- **Dried-droplet method** : Raztopino matriksa nanesemo na vzorec ročno s pipeto.
- **Pneumatic nebulization** : Raztopino matriksa nanesemo na vzorec z razprševanjem.
- **chemical inkjet printer** : S piezoelektrično napravo nanašamo majhne kapljice raztopine matriksa.
- **automated vibrational spray coater** : Raztopino matriksa nanesemo na vzorec z razprševanjem.
- **matrix sublimation** : Trden matriks se nahaja na dnu kondenzatorja, vzorec pa je pritrjen na spodnjo stran toplotno prevodnega traku. Sublimacijo matriksa izvajamo pri znižanem tlaku in visoki temperaturi (125°C), pri čemer matriks kondenzira na hladni površini vzorca. Metoda daje visoko čistost matriksa in majhne kristale in homogeno odlaganje.
- **dry-coating** : Fino zdrobljen matriks filtriramo direktno na tkivo skozi sito (20 μm).

VIRI

- **Amstalden van Hove, E. R., Smith, D. F., & Heeren, R. M. a. (2010). A concise review of mass spectrometry imaging. *Journal of chromatography. A*, 1217(25), 3946–54. doi:10.1016/j.chroma.2010.01.033**
- Tucker, K. R., Serebryanny, L. A., Zimmerman, T. A., Rubakhin, S. S., & Sweedler, J. V. (2012). NIH Public Access, 2(4), 785–795. doi:10.1039/C0SC00563K.The
- <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/CPUnit/refId-mb1402.html>
- <http://www.proteochem.com/chca25mg-p-73.html>
- <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/37550?lang=en®ion=US>
- Verbueken, a. H., Vyver, F. L., Visser, W. J., Roels, F., Grieken, R. E., & Broe, M. E. (1987). Use of laser microprobe mass analysis (LAMMA) for localizing multiple elements in soft and hard tissues. *Biological Trace Element Research*, 13(1), 397–416. doi:10.1007/BF02796651
- McDonnell A.L., Heeren M.A.R. 2007. Imaging mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, 26, 606-643
- Watrous D.J., Alexandrov T., Dorrestein P. C. 2011. The evolving field of imaging mass spectrometry and its impact on future biological research. *Journal of mass spectrometry*, 46, 209-222