

3D SLIKOVNA MASNA SPEKTROMETRIJA

Kaja Javoršek

Matevž Ambrožič

Katra Koman

IMS

- molekularna razporeditev v celem organu ali živali
- uporabimo tanke dele tkiva
- desorpcija tega tkiva z laserskim ali ionskim žarkom
- nastanek masnih spektrov

3D OBDELAVA SLIK S SIMS

- z ionskim žarkom obstreljujemo površino
- ejakcija sekundarnih ionov

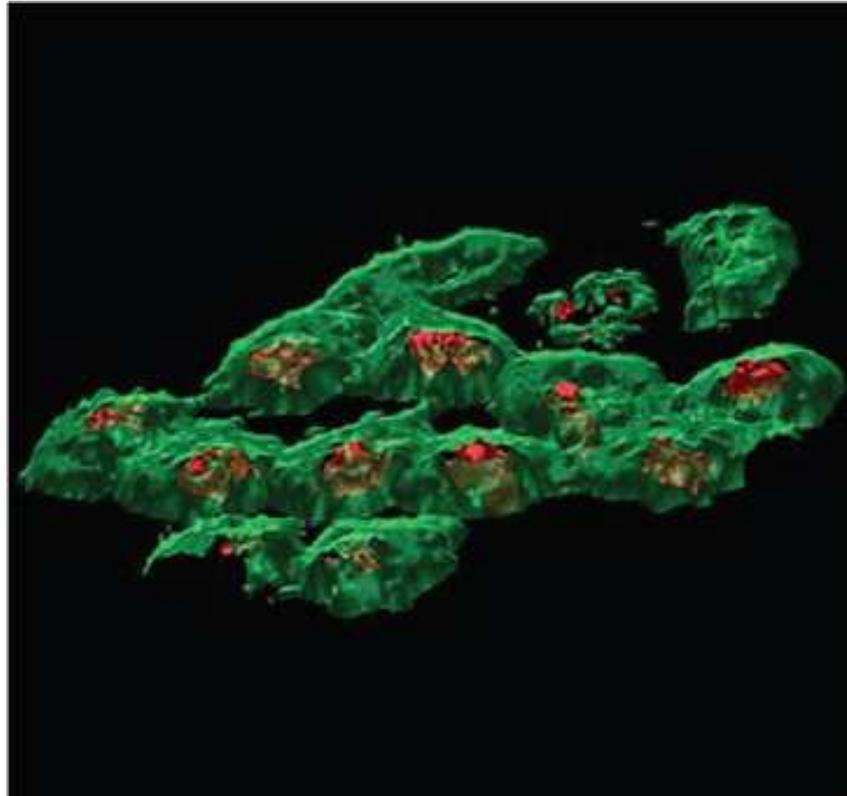
- tekočinsko kovinska ionska puška (LMIG)
- cluster puška

- LMIG: Višja energija zaradi visokega pospeševalnega potenciala in majhne velikosti delcev, za fragmentacijo biomolekul na delce, z maso manjšo od 1 kDa
- CLUSTER PUŠKA: del energije se porabi pri razpadu skupkov ionov, ko trčijo na površino, uporabna za analizo celih molekul z maso 1 – 2 kDa

Pri 3D SIMS slikovni obdelavi se uporabljata dva pristopa:

- zberejo se individualne dvodimenzionalne slike iz nekega območja v tkivu. Te se potem rekonstruira v tridimenzionalno sliko
- s pomočjo “z-stacking” (tehnika, ki kombinira slike, posnete pri različni goriščni razdalji. Tako dobimo sliko z boljšo globino vidnega polja)

HeLa celice



3D MALDI IMS

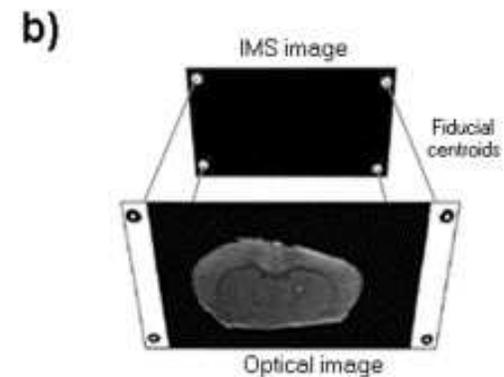
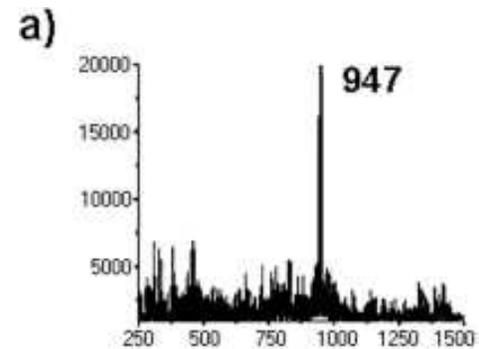
- MALDI IMS (matrix assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry) se razvija od leta 1997
- Leta 2005 prvič v 3D
- Večina raziskav na mišjih/podganjih možganih

Crececius *et.al*

- Prva 3D MALDI IMS mišjih možganov
- Cilj: 3D prikaz lokalizacije mielina v *corpus callosum*
- Rezanje na 20 μ m rezine
- Izdelava slikovnih masnih spektrov
- Snemanje optičnih slik
- Sestavljanje 3D rekonstrukcije

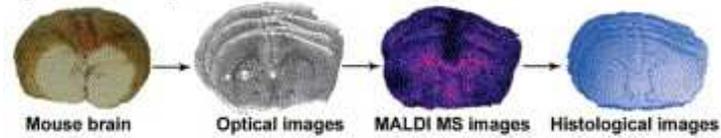
Kako do 3D rekonstrukcije?

- Ključna povezava slikovnih masnih spektrov in optičnih slik
- Preproste označbe s črnilom



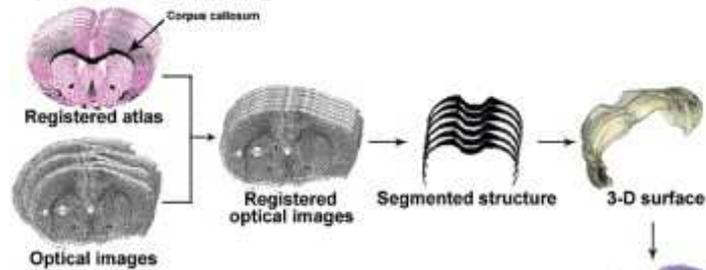
- Iz serije slik rezin s programsko opremo do 3D slike

a) Data acquisition

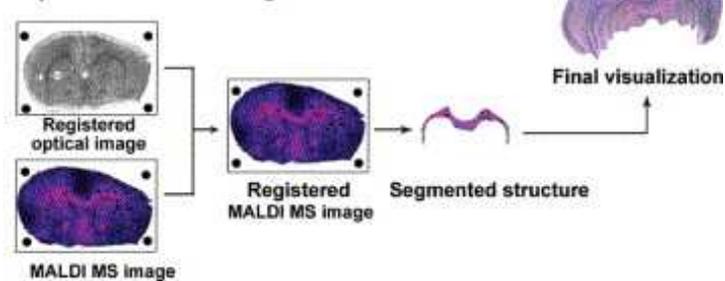


b) Data processing

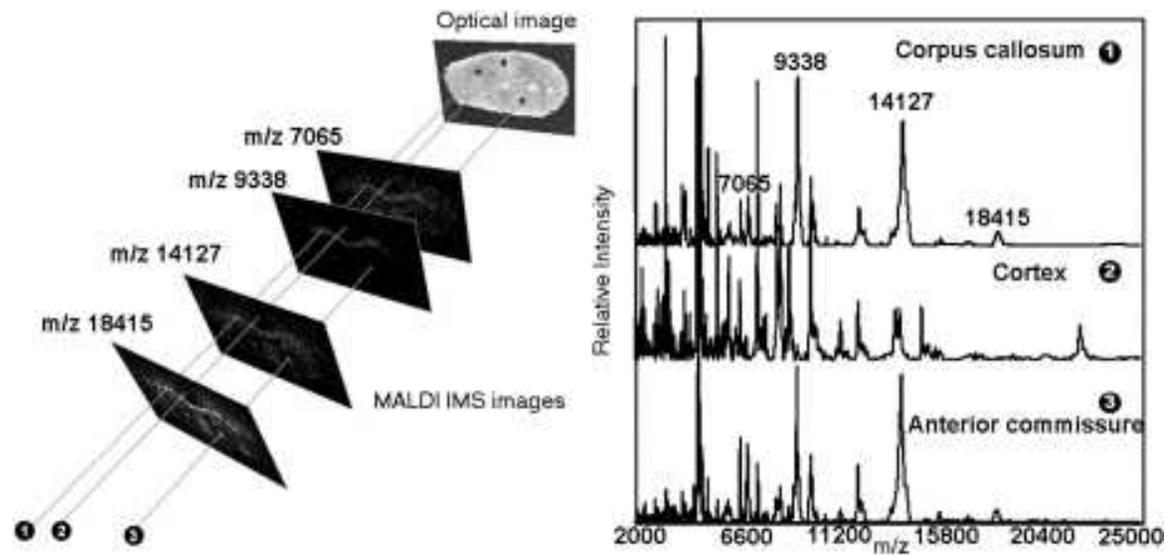
i) Inter-section registration



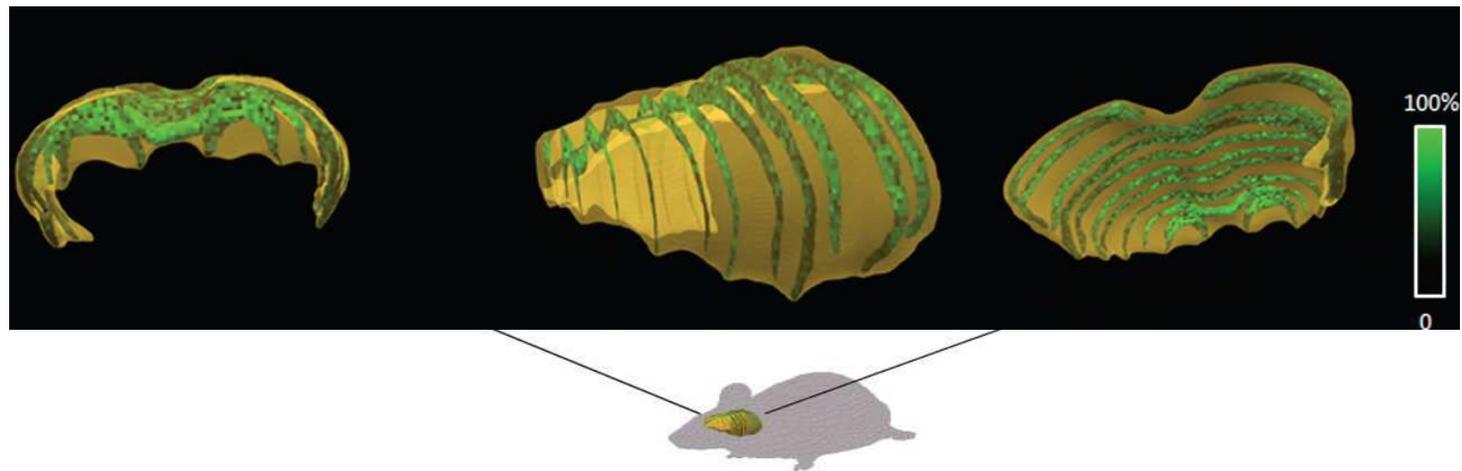
ii) Intra-section registration



Vsaki točki na optični sliki in v 3D rekonstrukciji
ustreza informacija v obliki masnega spektra.



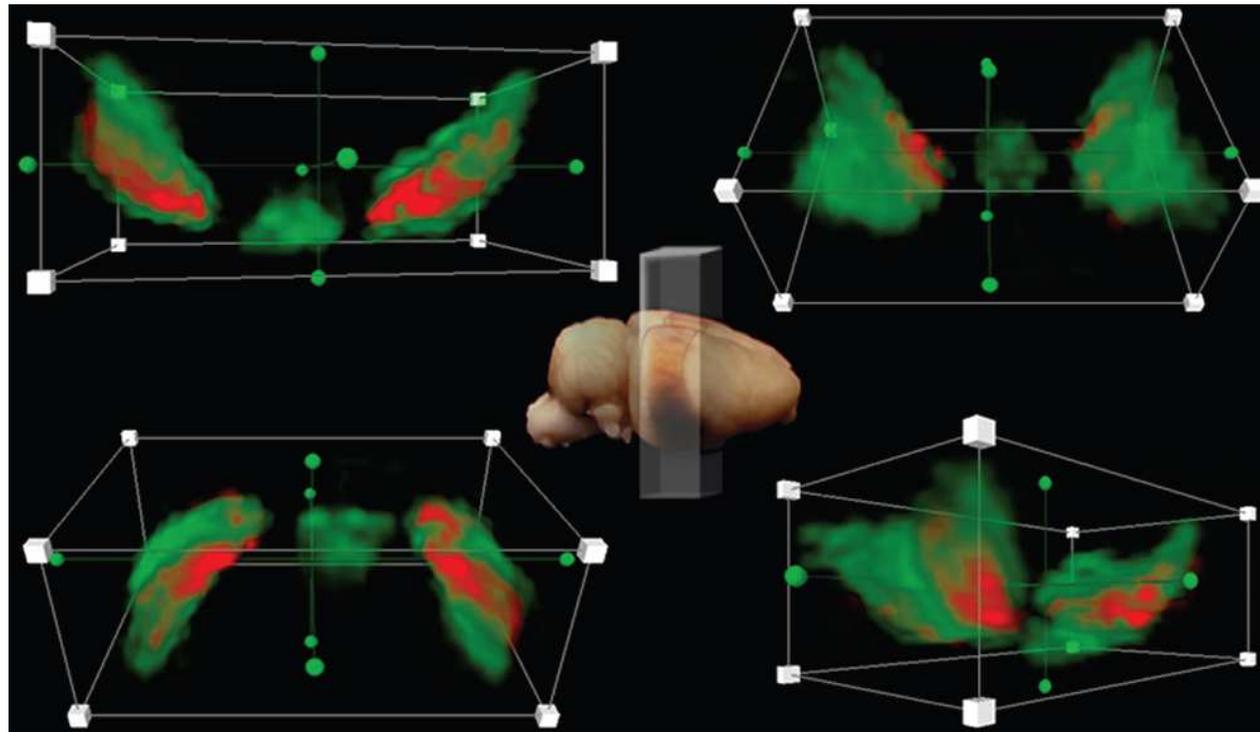
Rezultat: 3D rekonstrukcija lokalizacije mielina v corpus callosum-u mišjih možganov



Andersson *et.al.* , 2008

- 3D prikaz *substantia nigra* podganjih možganov
- Hkratna analiza proteinov in peptidov
- Dve seriji “z-stack”-ov združeni v eno 3D sliko
- Poleg lokalizacije proteina vidna tudi relativna intenziteta vrha

4 koti 3D prikaza lokalizacije enega peptida in enega proteina v *substantia nigra* podganjih možganov



Sinha *et.al.*, 2008

- Združeni trije slikovni načini
- Optično, MALDI IMS in MR
- Analiza tumorja v mišjih možganih
- Primerjava MR in IMS potrdi prisotnost dveh proteinov na območju tumorja

Chen *et.al.*, 2009

- 3D mapiranje peptidov in lipidov v rakovih možganih
- Izjeme v hipotezi o podobni distribuciji podobnih neuropeptidov
- Potrjena logična lokalizacija fosfoholinov in sfingomielinov

PRAKTIČNI VIDIKI 3D MALDI IMS

- Razpoke, gube in druge deformacije tkiva predstavljajo težavo
- Najlažje so raziskave na možganih, saj lobanja omogoča stabilnost
- Problem pri ostalih delih telesa
- Vzorec se ne sme premikati

- Vse zahteve za izvedbo preparacije vzorca za 2D IMS, se pojavijo tudi pri 3D IMS
- + DODATNE zahteve

Priprava vzorca

- Rezanje
- Sušenje 3 ure
- Fiksacija z etanolom
- Shranimo v za zrak nepropustno posodo
- Pri - 80 °C

Ponovljivost

- Kriostat
- Tape Transfer system
- Uporabimo iste protokole za analizo vseh rezin
 - isto koncentracijo matriksa
 - isto sestavo topila
- Uporabimo robotni spotter ali razpršilec za vnos matriksa (za MALDI IMS)
- Podatki pridobljeni iz iste naprave, ki uporablja iste parametre in metode
- Podatki morajo biti zbrani v kratkem času

