

MALDI-IMAGING

- ✓ Strumento emergente per l'analisi di campioni biologici e clinici
- ✓ Consente l'analisi di proteine, peptidi, lipidi e piccole molecole
- ✓ Le relazioni spaziali fra le molecole vengono mantenute nel campione, perché il tessuto viene analizzato intatto, senza omogenizzazione.
- ✓ Consente di visualizzare la distribuzione degli analiti senza l'impiego di marcature con anticorpi o altro.

Tipi di spettrometro

- Spettrometro (TOF, TOF-TOF, orbitrap, synapt, FT-ICR, Q-TOF...)

- Ionizzazione

MALDI	→	Proteine, peptidi, lipidi, farmaci
SIMS	→	Piccole molecole, elementi
DESI	→	Piccole molecole, lipidi

- Risoluzione Spaziale
∅ area colpita

MALDI	→	10 μm - 200 μm
SIMS	→	100 nm - 10 μm
DESI	→	300 μm - 500 μm

- Range di Massa

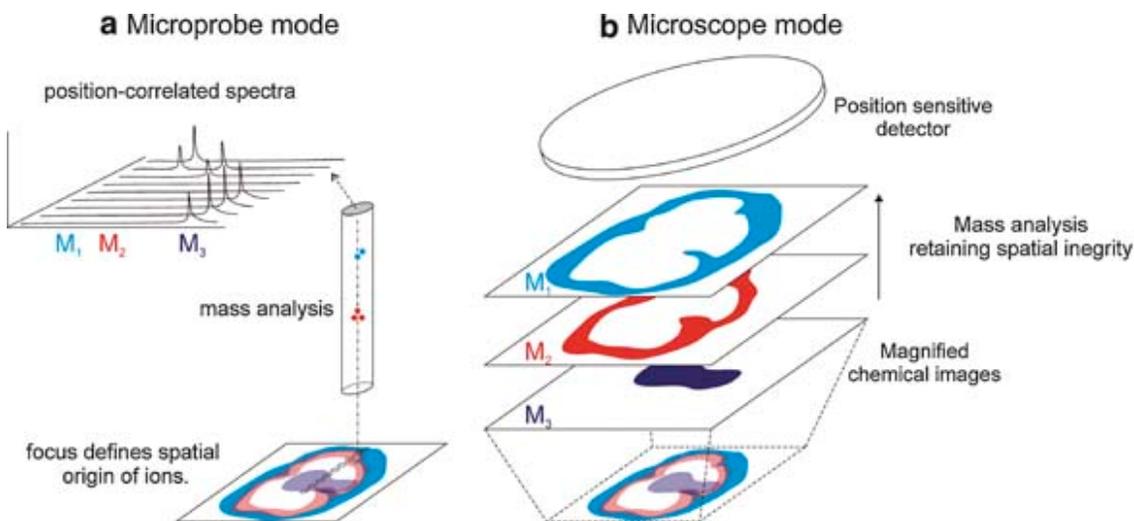
MALDI	→	0-30 K m/z - fino 150 K m/z
SIMS	→	< 1000 m/z
DESI	→	< 3000 m/z

- Velocità dell'acquisizione Frequenza del laser 200Hz - 2kHz

Basi analitiche:

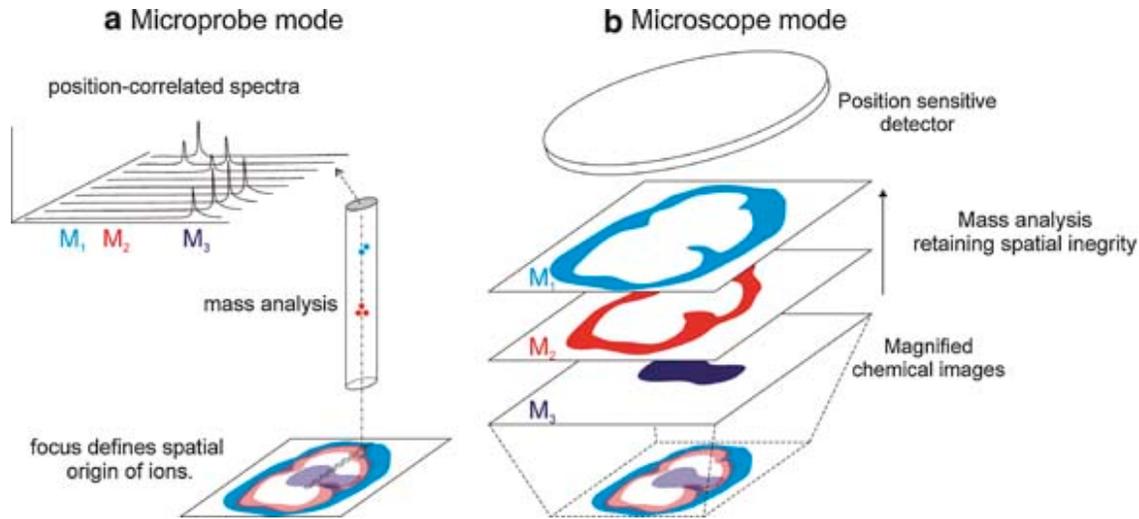
- La spettrometria di massa è una tecnica che analizza **ioni** di determinata **massa** in funzione della loro **intensità**.
- Lo spettro di massa di un campione è solitamente un plot I vs m/z . Non esiste uno spettro di massa fisso per una sostanza in quanto dipende moltissimo dalla strumentazione usata.

Nel **Maldi Imaging** l'informazione spaziale viene ottenuta principalmente con due metodi: il **microprobe** e il **microscopio**.



Il microprobe utilizza un raggio di ionizzazione che focalizza per analizzare una determinata e piccola regione del campione. Lo spettro viene conservato unitamente alle coordinate di localizzazione del raggio. Si procede poi alla zona successiva. Le immagini vengono poi ricostruite utilizzando gli spettri ottenuti nelle diverse posizioni del raggio laser.

Nel modello a **microscopio** si usano degli elementi del microscopio ottico affiancato alla ionizzazione per proiettare l'origine spaziale degli ioni ottenuti sulla superficie del campione su un detector posizione-sensibile.



STRUMENTAZIONE:

1. IONIZZAZIONE
2. ANALIZZATORE
3. DETECTOR E REGISTRATORE
4. SISTEMA DI VUOTO

Il sistema più comune di ionizzazione per sistemi biologici è il MALDI- Matrix assisted laser desorption. In tale tecnica la matrice ha un ruolo fondamentale.

Mass Spectrometry Reviews

Volume 26, Issue 4, pages 606-643, 30 APR 2007 DOI: 10.1002/mas.20124

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mas.20124/full#fig3>

L'applicazione della matrice sul campione consente di ottenere dei cristalli di matrice drogati di analita. Quando il fascio di laser UV incide sulla matrice che parzialmente vaporizzata trasporta l'analita nella fase vapore. L'acido sinapinico è la matrice più impiegata per l'analisi dei tessuti. Per piccole molecole si usa l'ac. α -ciano 4-idrossi cinnamico.

•tipo di matrice:

One of the major requirements of successful MALDI-PMS and MALDI-IMS is the proper incorporation of tissue analytes into a thin matrix layer deposited directly on the tissue and the choice of suitable matrices for different molecular classes.

1. Sinapinic acid (3, 5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, SA) at ~10-30 mg/ml, has been reported as a matrix of choice for protein analysis both in the linear MALDI-TOF MS and higher resolution MALDI-IMS. It has a high gas-phase basicity (206 kcal/mol) that is particularly suitable for protein MALDI ionization, given its low tendency in analyte fragmentation].

2. CHCA, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, on the other hand is more suitable for the analysis of smaller molecules, especially peptides (below 4 kDa).

3. DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid, ordinarily known to be suitable for negatively charged less than 4 kDa molecules, such as carbohydrates, is less commonly used as the crystals it forms are larger and mainly suited for certain profiling experiments requiring lower resolution images.

✓**Matrice:**

4. Ferulic acid [(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)prop-2-enoic acid] has been recently reported for the detection of high molecular weight proteins on thin tissue sections.

Analizzatore

TOF analizzatore a tempo di volo- È un analizzatore dinamico. Gli ioni entrano in una zona lineare lunga dove c'è una ddp. Qui percorrono una traiettoria rettilinea finché giungono al detector.

$$\frac{1}{2} mv^2 = zV \quad s/t_i = v_i = (2zV/m_i)^{1/2}$$

Ioni con massa diversa percorrono lo spazio s in tempi diversi, raggiungendo il detector in tempi \neq .

Detectors-il più comune è l'oscillografo

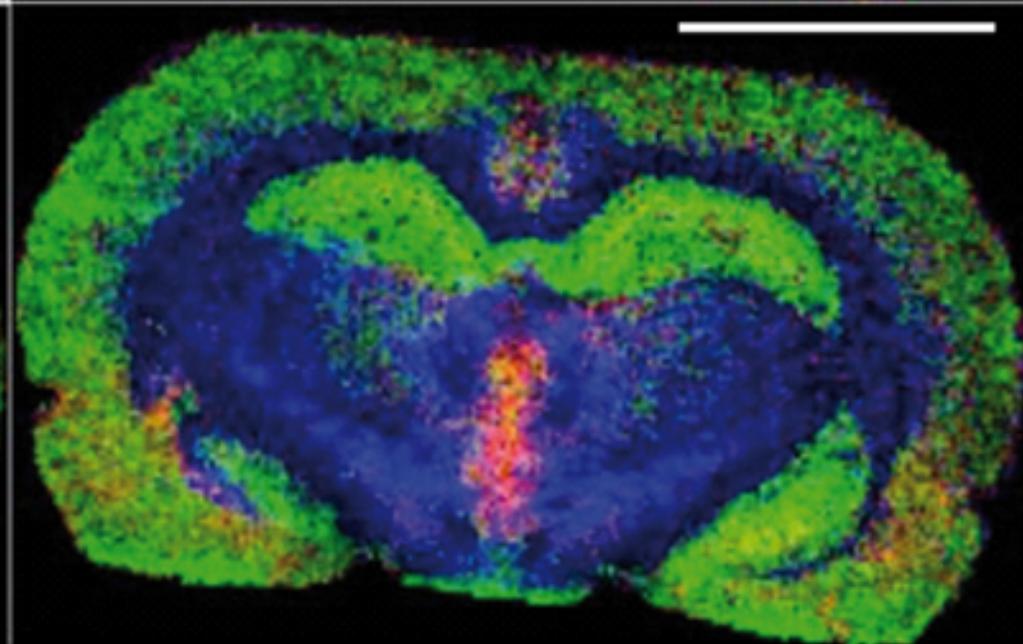
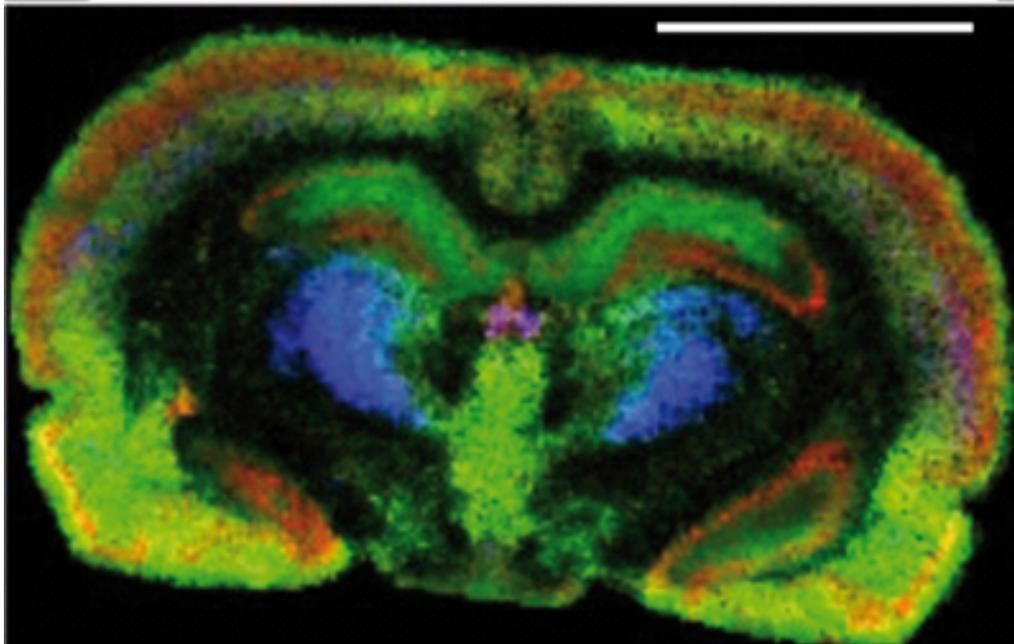
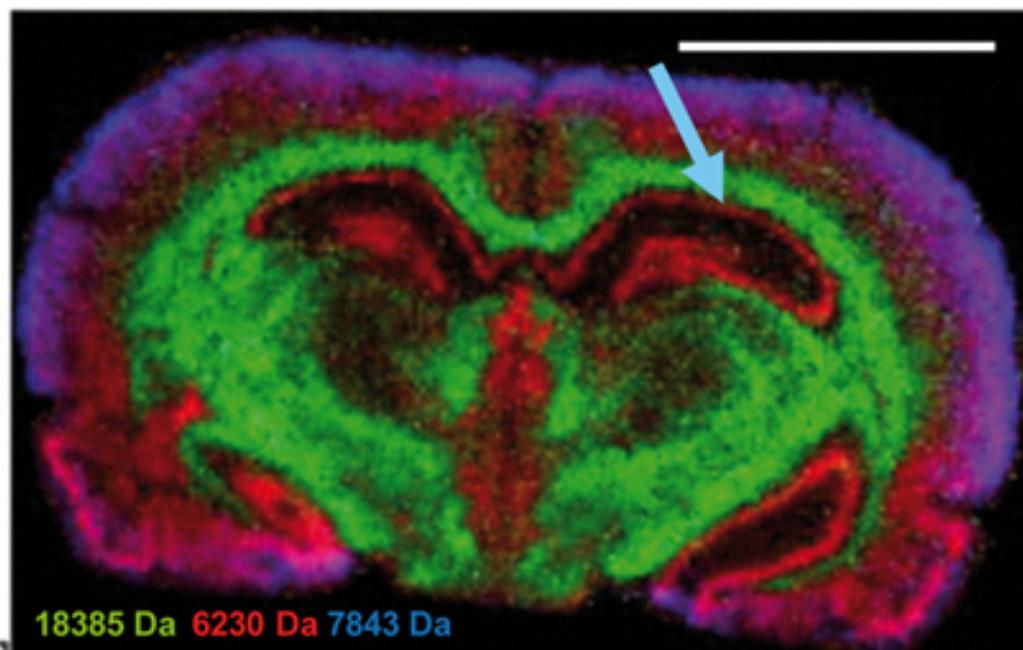
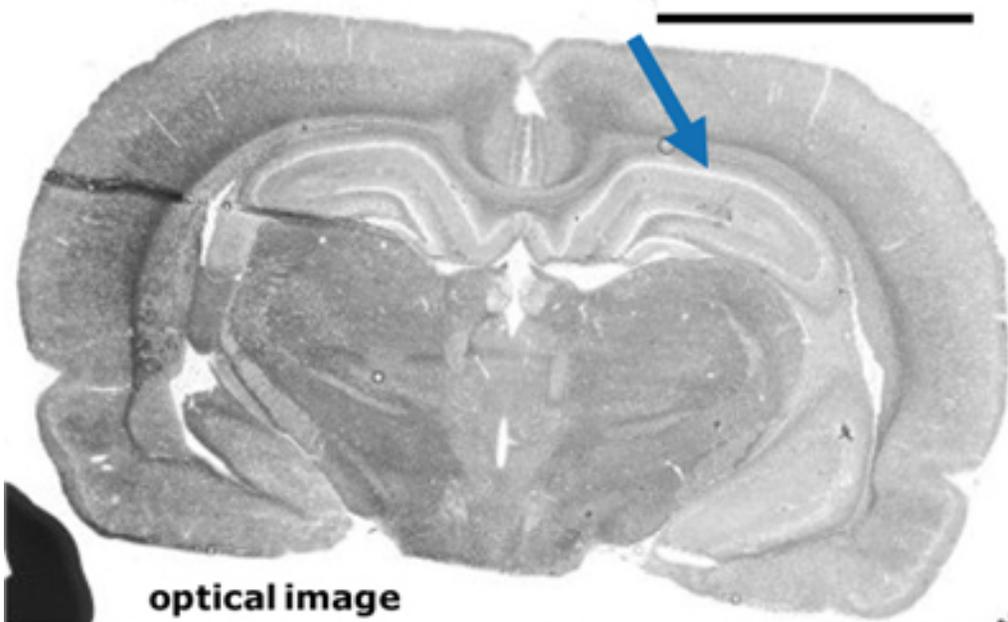
RISOLUZIONE

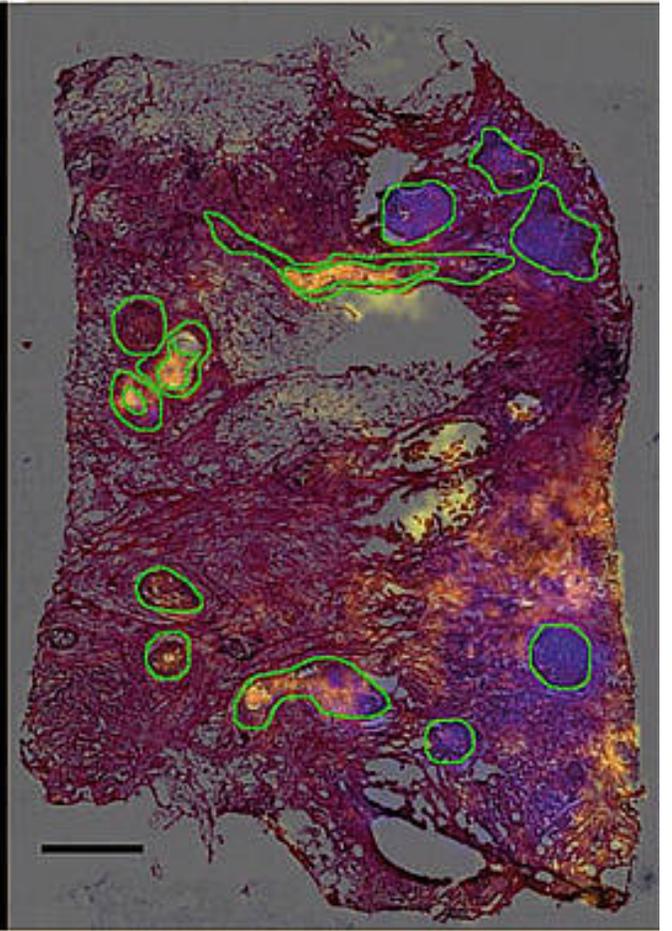
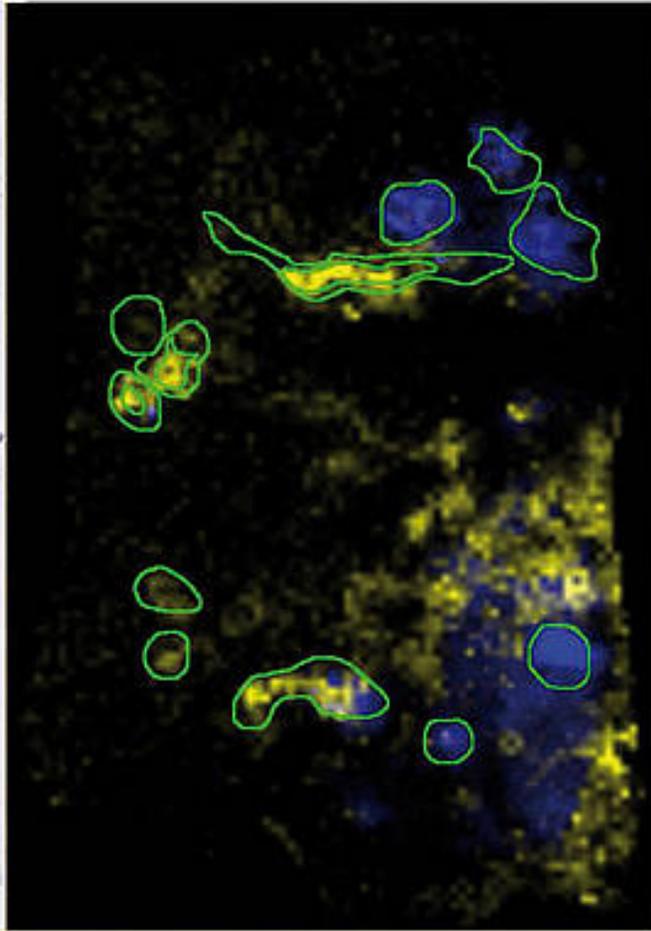
Esistono 3 tipi di **risoluzione**:

Di massa- dà la specificità chimica dell'analita

Spaziale- o risoluzione laterale è il grado di dettaglio visibile nell'immagine, ovvero la minima distanza misurabile o risolvibile (dim pixel). Dipende non solo dallo strumento, ma anche da come è preparato il campione.

Di profondità-strumenti più avanzati consentono di ricostruire un'immagine 3D dovuta al fatto che i campioni non sono monolayers.





FFPE: questi campioni si analizzano mediante uno step principale di smascheramento antigenico seguito da una parziale digestione triptica in situ prima della deposizione della matrice. Ciò consente una digestione parziale e controllata delle proteina a peptidi nelle aree di interesse. I peptidi che risultano da distinte regioni cellulari vengono registrati per massa intatta e i peptidi di interesse vengono sottoposti a MS/MS per l'identificazione.

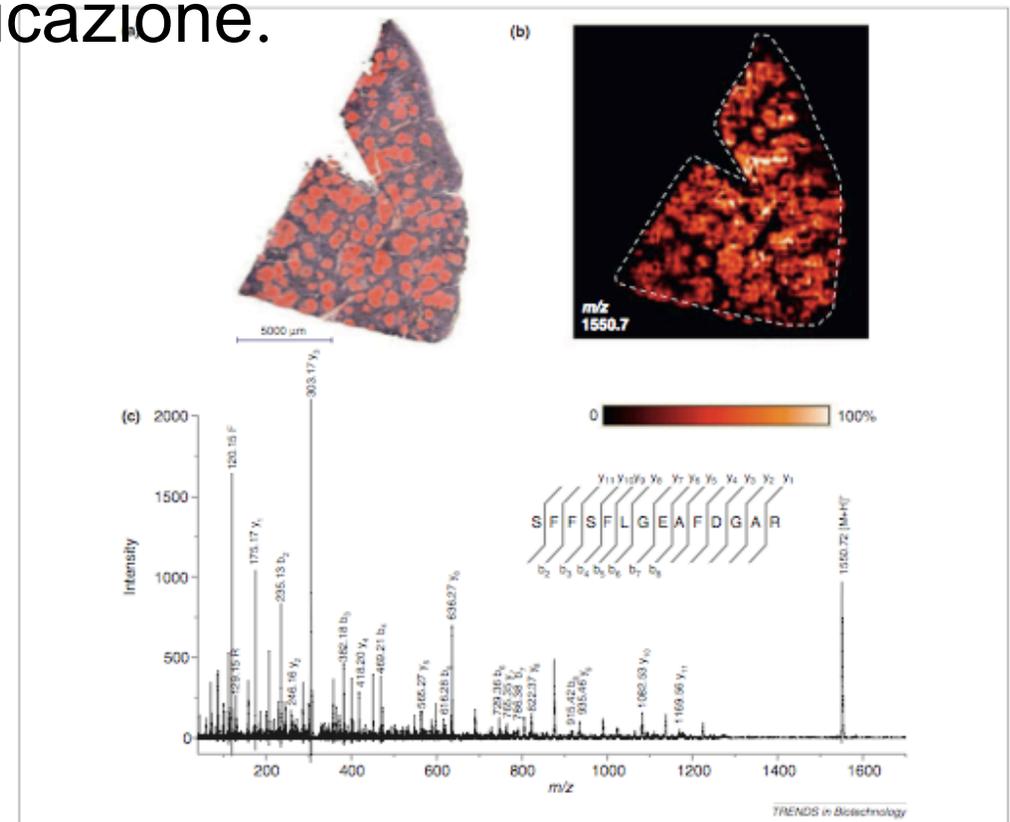


Figure 3. IMS analysis of a 109-year-old FFPE sample. (a) Contrast-enhanced Congo Red staining of a human spleen biopsy shows extensive amyloid deposits (in red) throughout the section. Scale bar, 5 mm. (b) MS image of a peptide at m/z 1550.7 from serum amyloid A localized to the areas of amyloid deposition. (c) MS/MS of this peptide directly from the tissue section resulted in nearly complete sequence coverage and identification of the peptide SFSSLGAEAFDGAR.

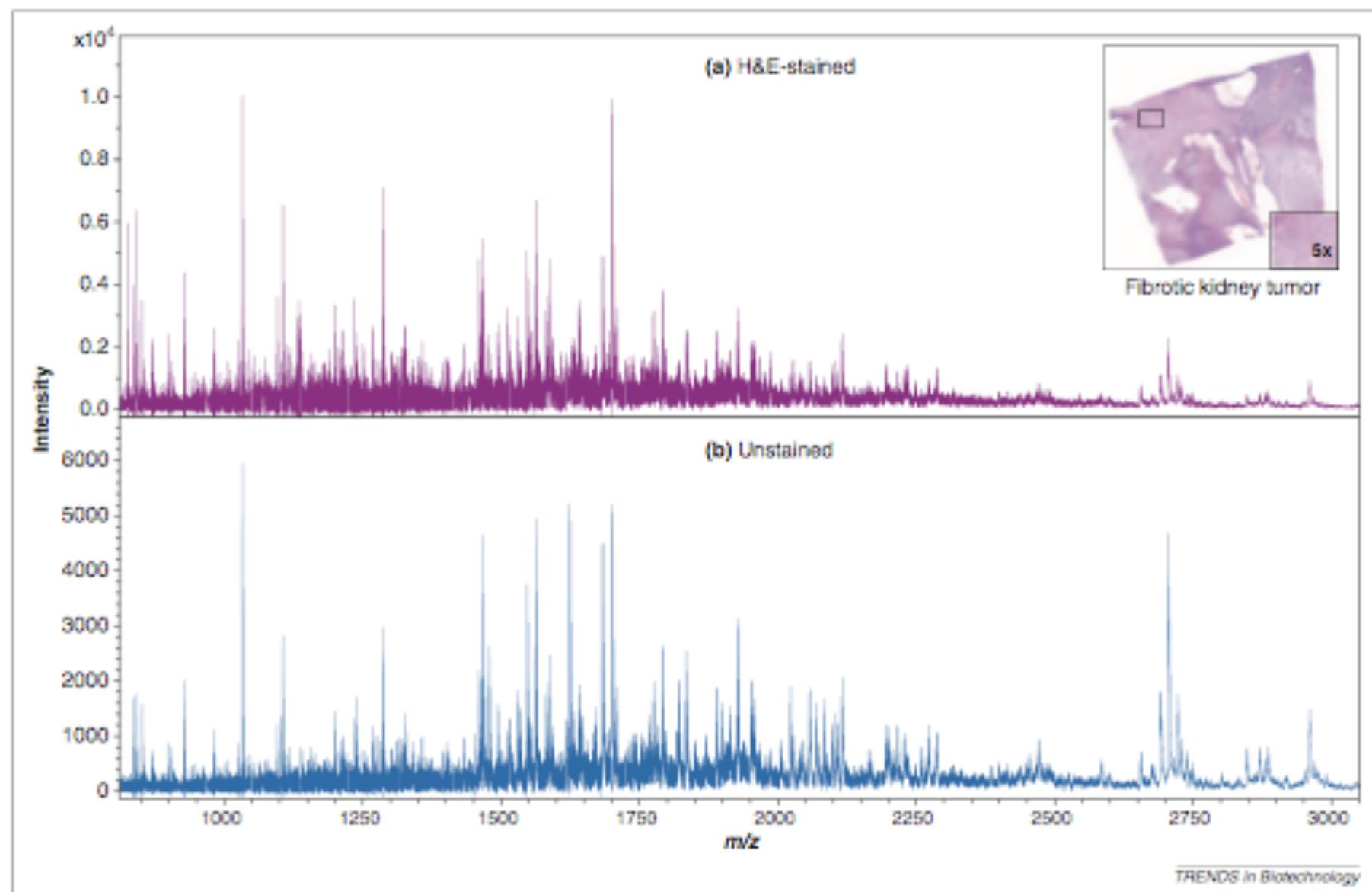
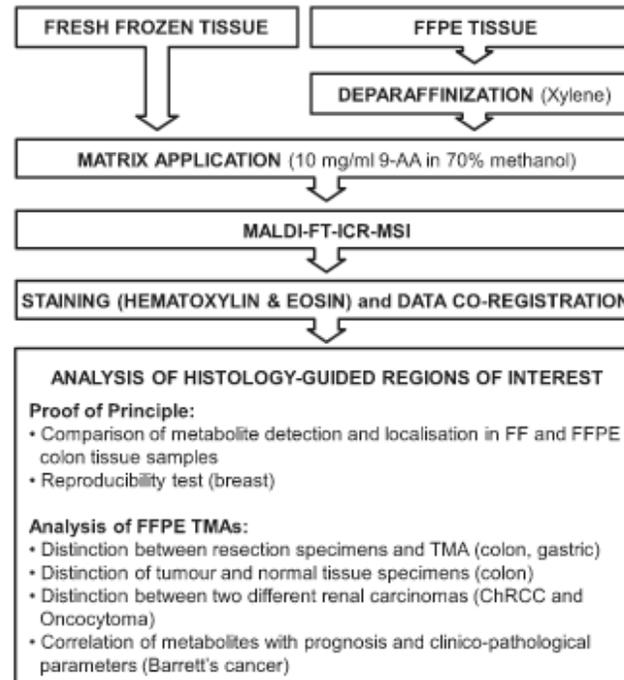
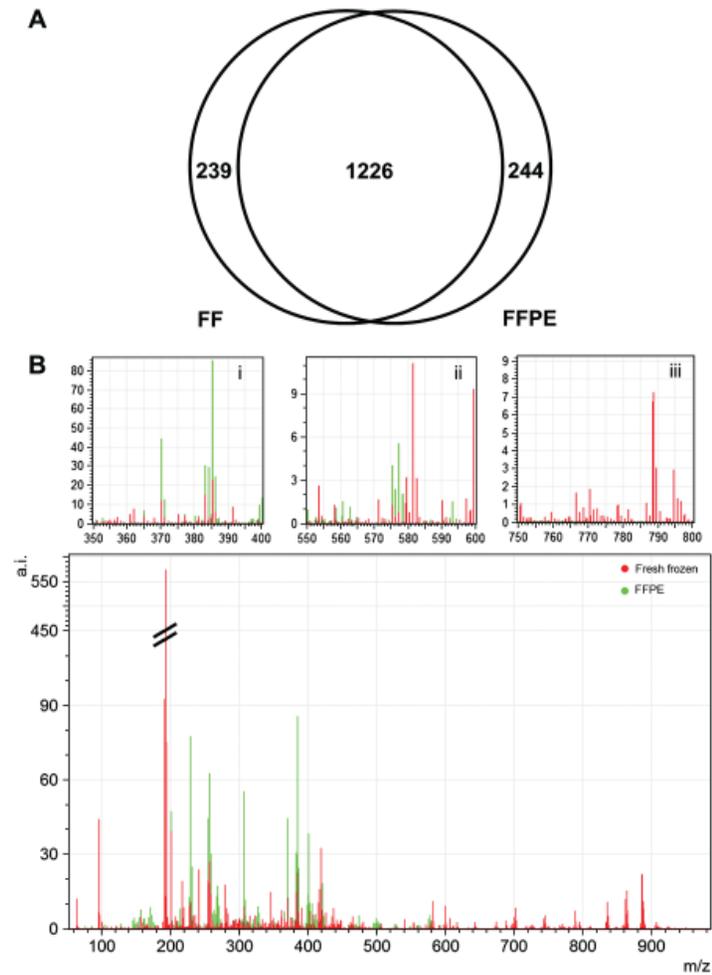


Figure 4. H&E staining coupled with MS of an FFPE human kidney tumor. **(a)** A mass spectrum obtained from an H&E-stained section of a human kidney tumor. The inset shows the tissue that was analyzed, with 5 \times magnification of the area from which the spectrum was acquired. **(b)** The mass spectrum from an unstained serial section.

High-resolution MALDI-FT-ICR MS imaging for the analysis of metabolites from formalin-fixed, paraffin-embedded clinical tissue samples

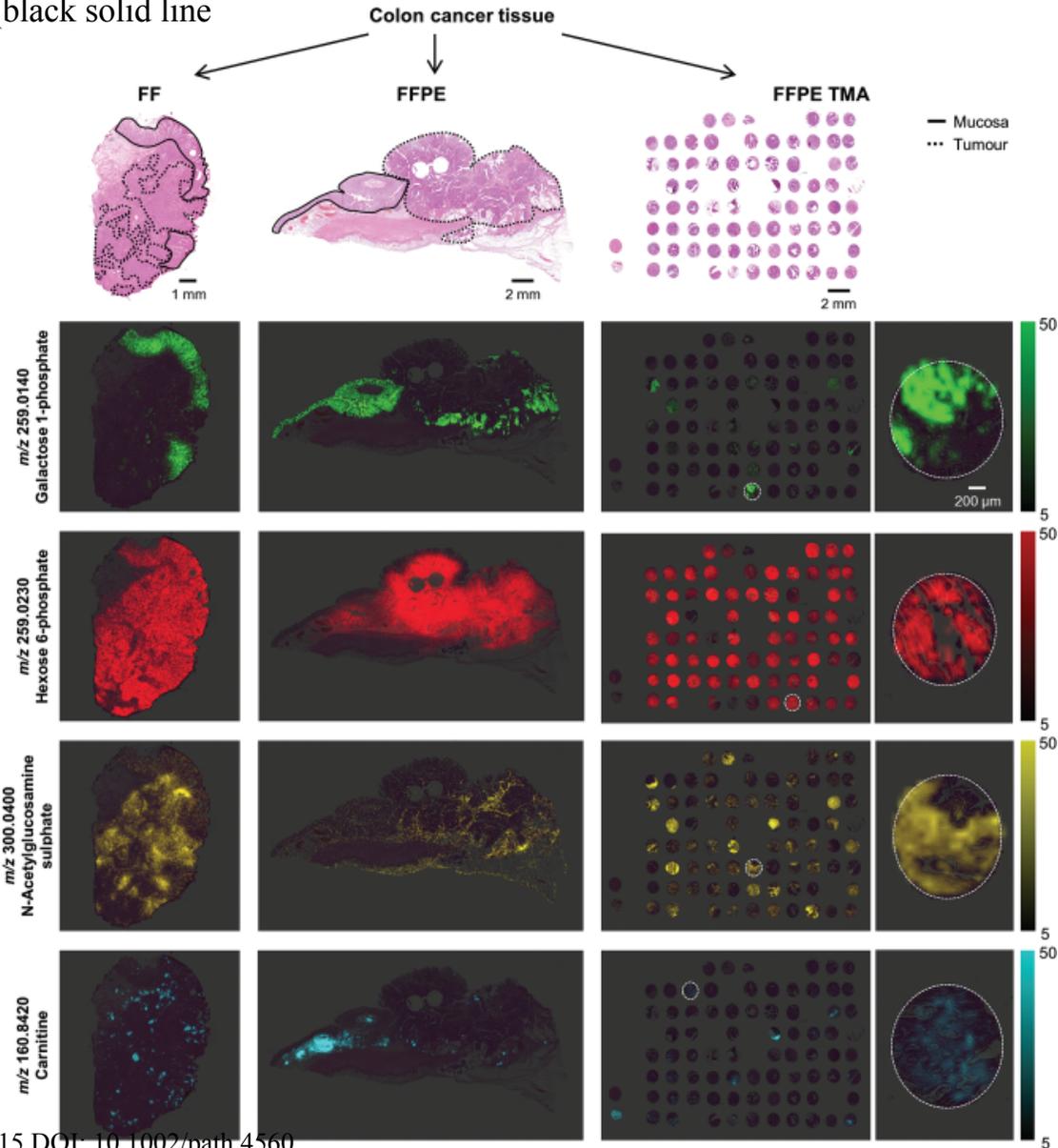


High-resolution MALDI-FT-ICR MS imaging for the analysis of metabolites from formalin-fixed, paraffin-embedded clinical tissue samples

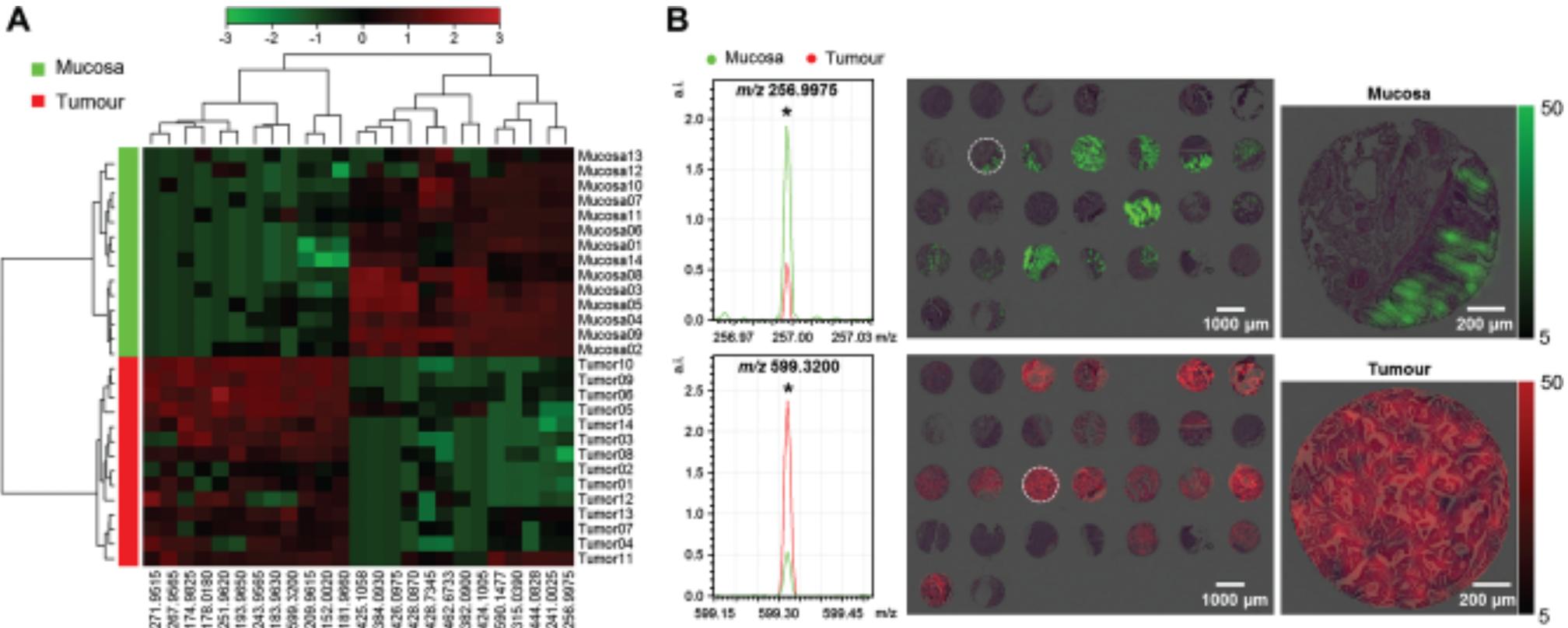


High-resolution MALDI-FT-ICR MS imaging for the analysis of metabolites from formalin-fixed, paraffin-embedded clinical tissue samples

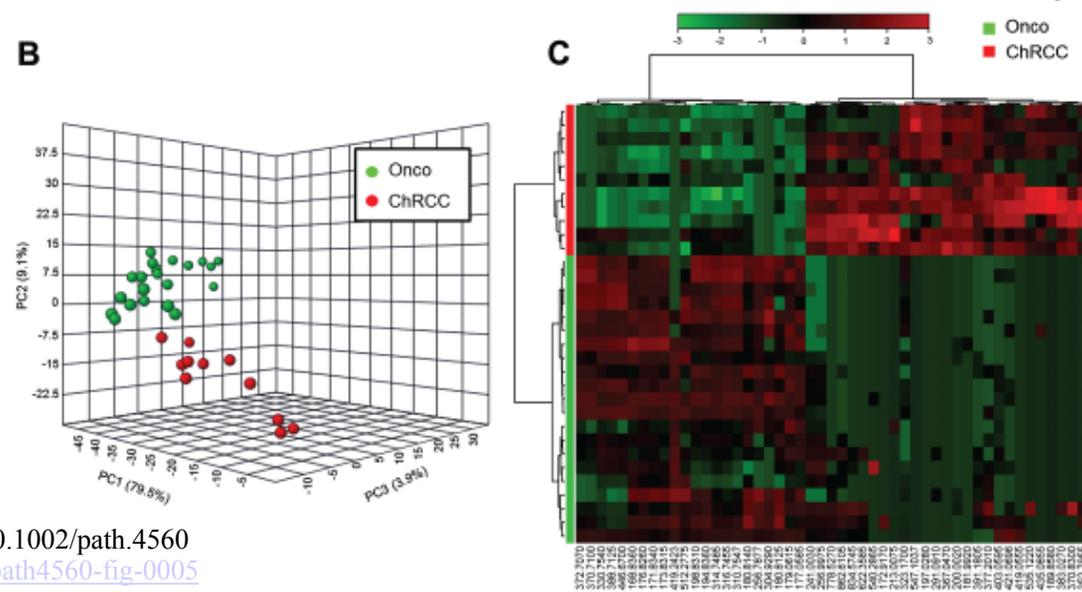
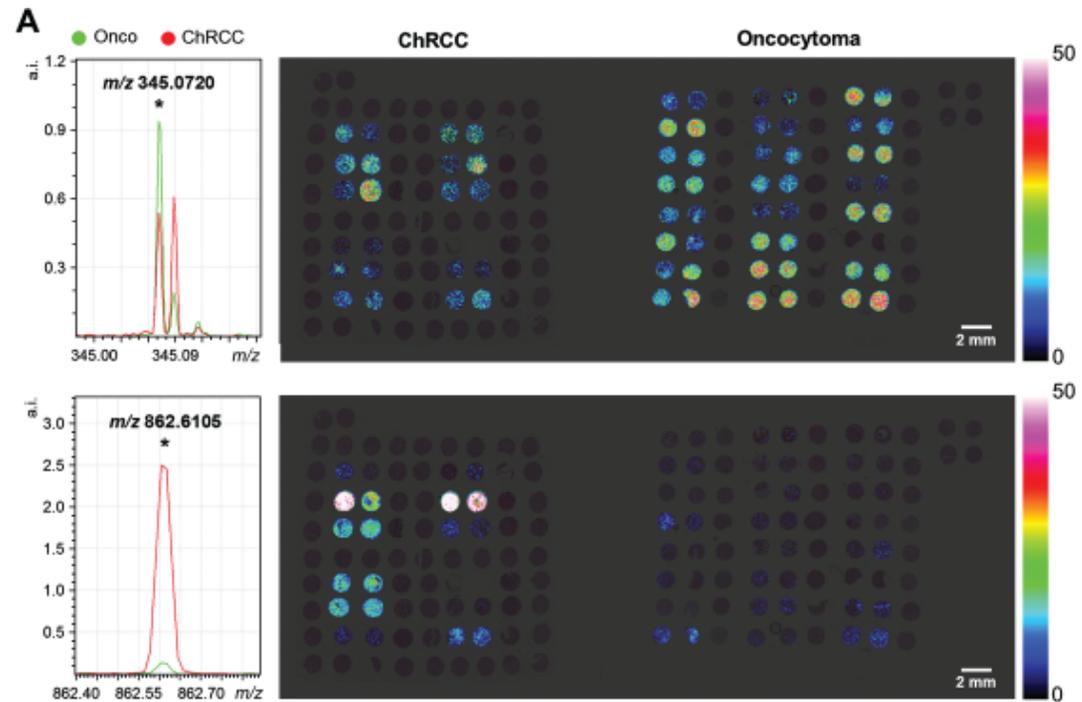
tumour (black dotted line) and mucosa (black solid line)



High-resolution MALDI-FT-ICR MS imaging for the analysis of metabolites from formalin-fixed, paraffin-embedded clinical tissue samples



High-resolution MALDI-FT-ICR MS imaging for the analysis of metabolites from formalin-fixed, paraffin-embedded clinical tissue samples



High-resolution MALDI-FT-ICR MS imaging for the analysis of metabolites from formalin-fixed, paraffin-embedded clinical tissue samples

