SHIMADZU

Исследование белков и пептидов методами масс-спектрометрии MALDI

Д.А. Фармаковский, Shimadzu Europa GmbH

SHIMADZU

Масс-спектрометрия MALDI: история

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry - Лазерная десорбция/ионизация при содействии матрицы + времяпролетная масс-спектрометрия

разработано в 1980-х Karas & Hillenkamp и K. Tanaka с соавторами

Anal. Chem. **1988**, *60*, 2301–2303

Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons

Michael Karas*
Franz Hillenkamp

Protein and Polymer Analyses up to *m/z* 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry

Koichi Tanaka†, Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida and Tamio Yoshida

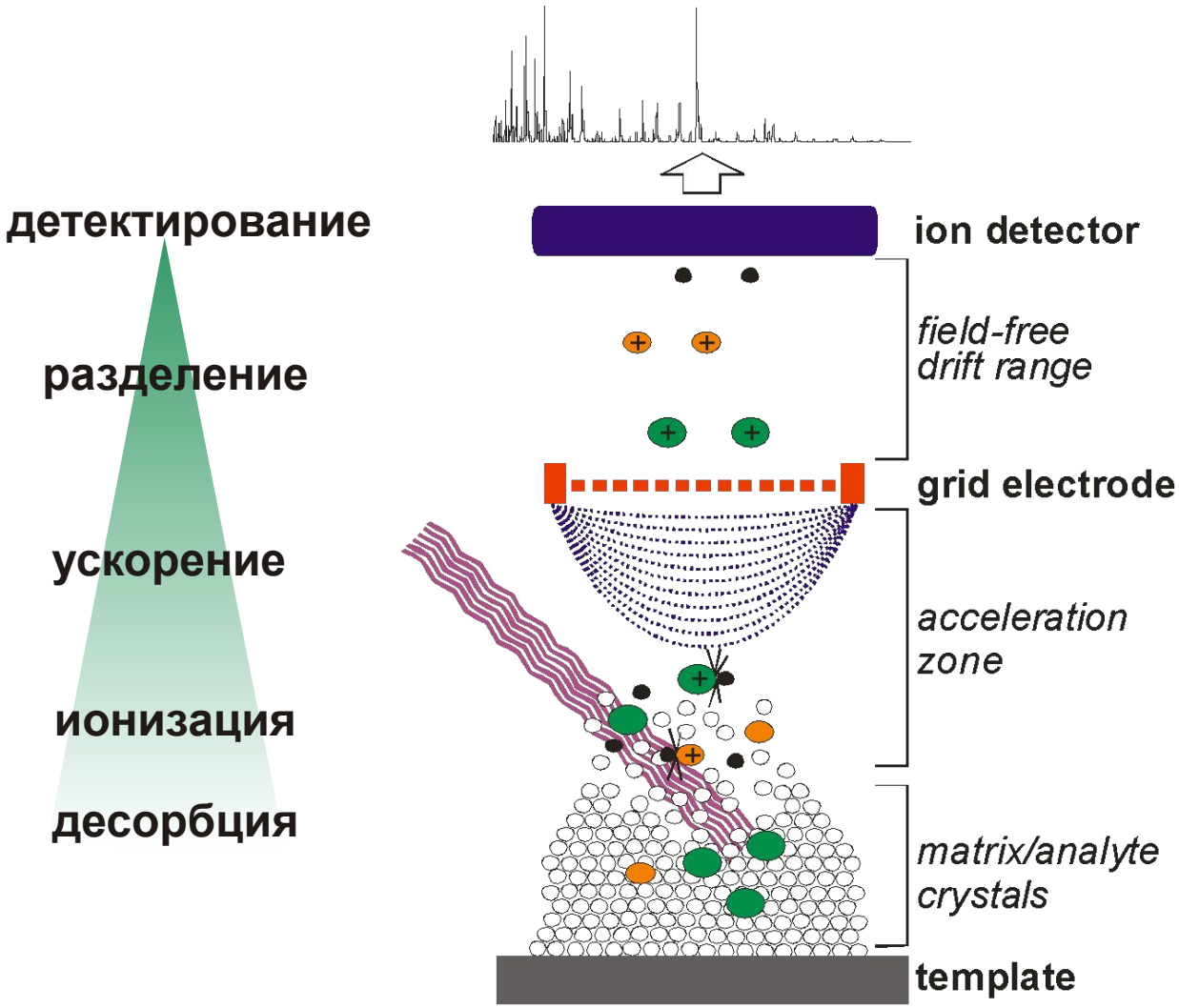
Shimadzu Corporation, Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604, Japan

RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, VOL. 2, NO. 8, 1988 151

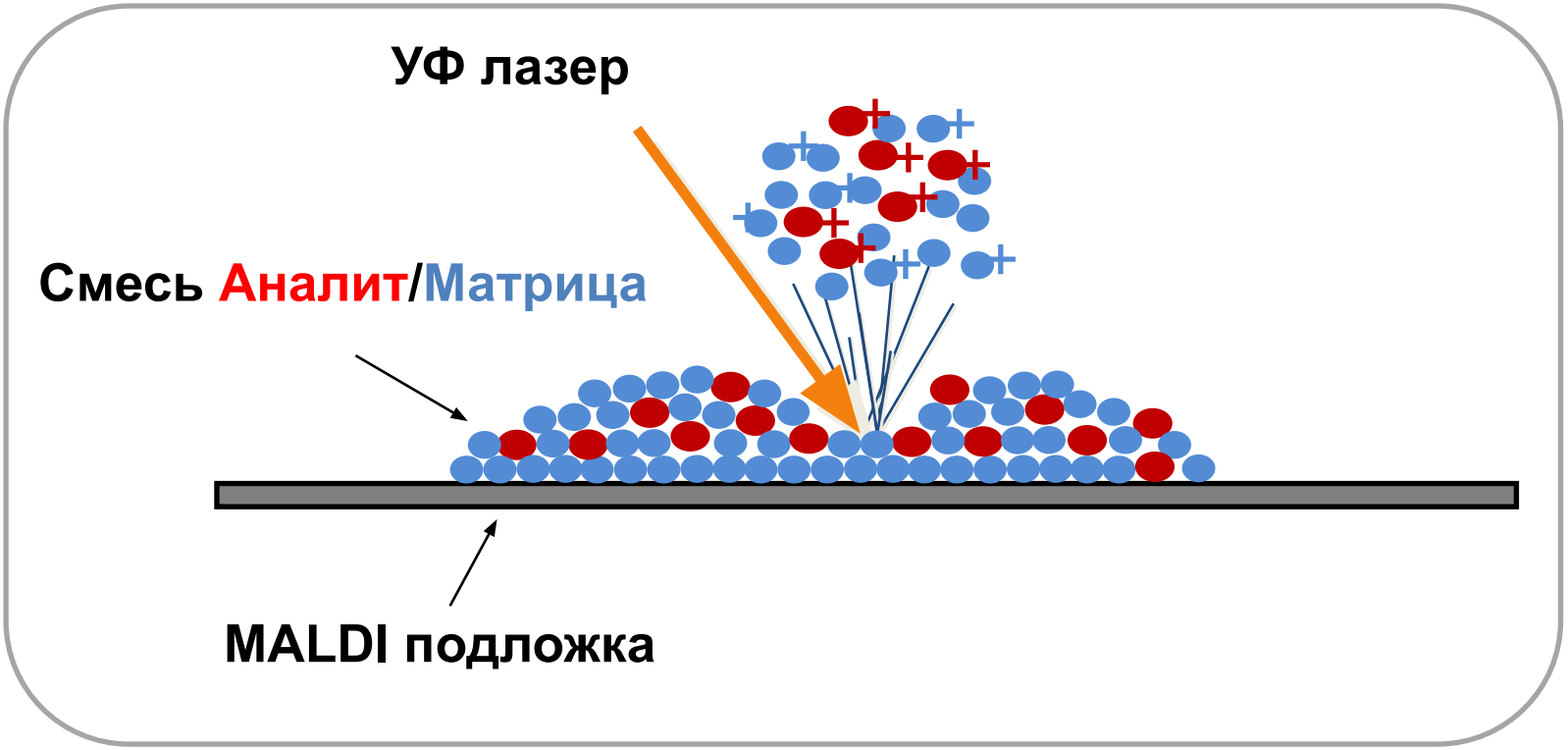
Нобелевская премия по химии K. Tanaka, 2002

SHIMADZU

Масс-спектрометрия MALDI-TOF: основные принципы



Ионизация MALDI



SHIMADZU

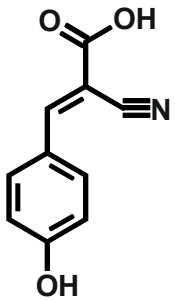
Матрицы для MALDI

Низкомолекулярные органические кислоты: поглощают УФ, доноры протонов

Положительная ионизация

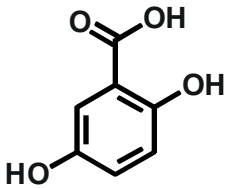
α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA)

m = 189.07 Da



2,5-dihydroxy-benzoic acid (DHB)

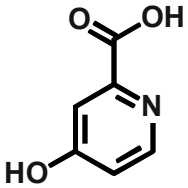
m = 154.03 Da



sinapic acid (SIA)

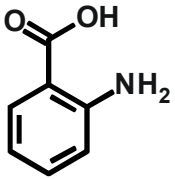
m = 224.07 Da

Отрицательная ионизация



4-hydroxy-picolinic acid

m = 139.05 Da

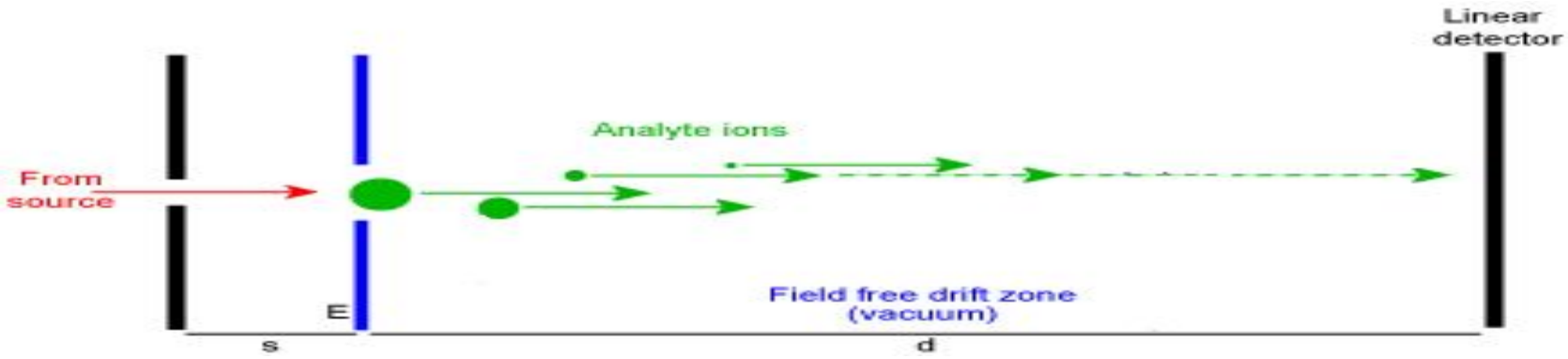


anthracinic acid

m = 137.05 Da

SHIMADZU

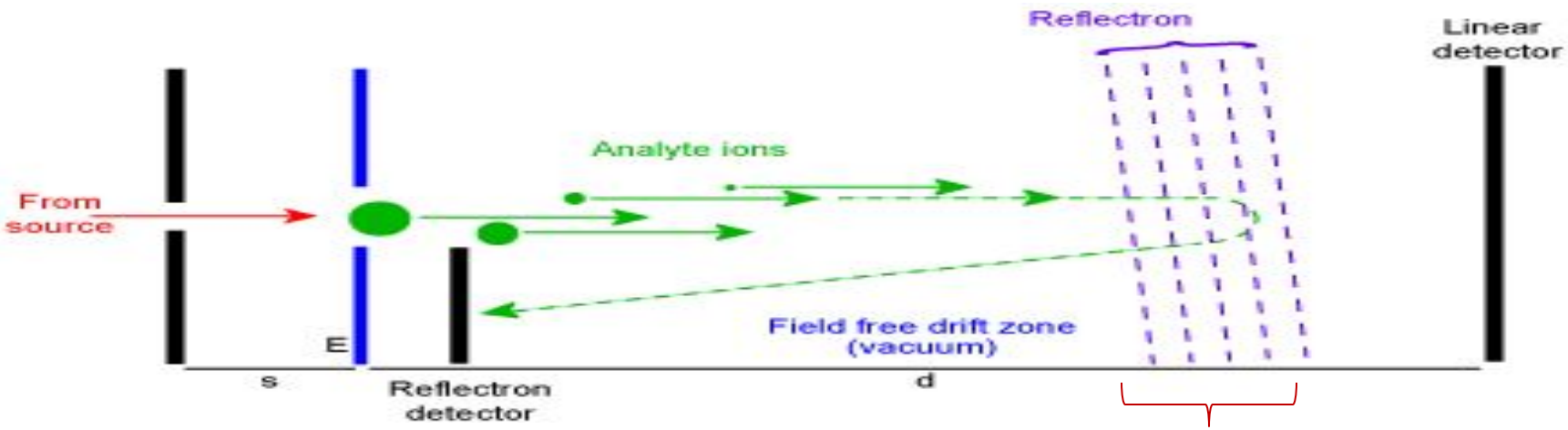
Линейный времяпролетный масс-анализатор (TOF)



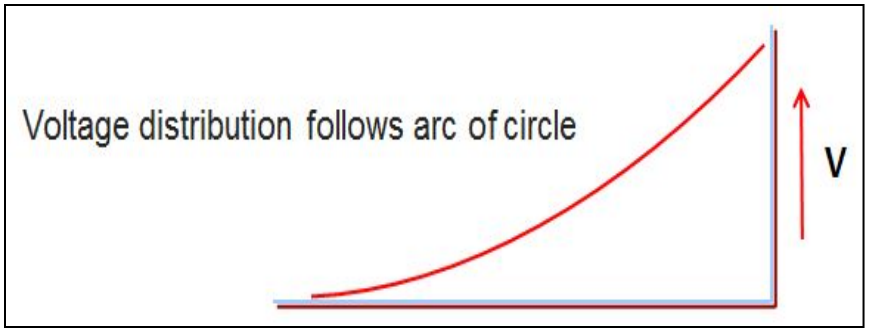
- диапазон масс до 350 КДа
- высокая чувствительность
- низкая величина разрешения по массам
- разрешение по массам в основном зависит от геометрических размеров времяпролетной трубы – чем длиннее путь пролета ионов, тем выше разрешение

SHIMADZU

Времяпролетный масс-анализатор с рефлектроном (TOF reflectron)

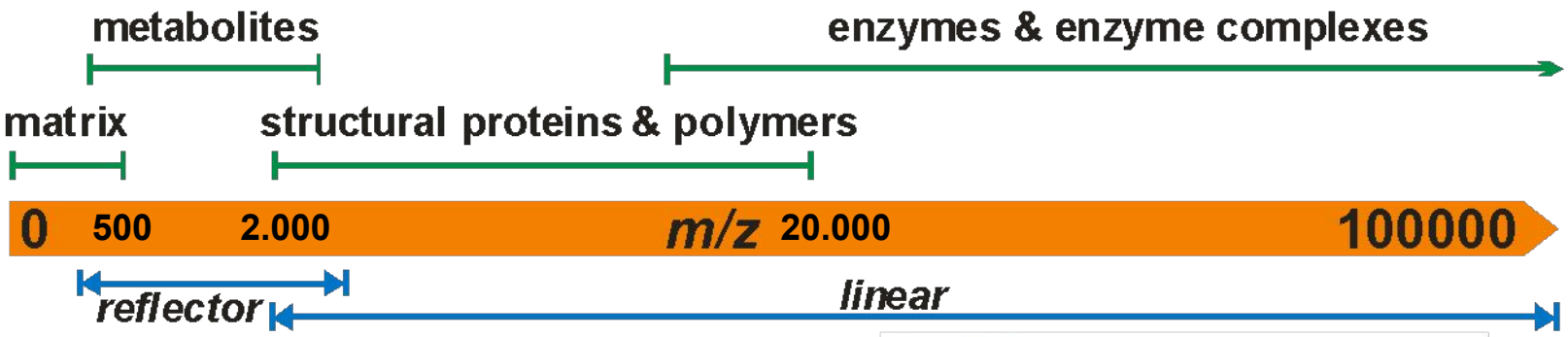


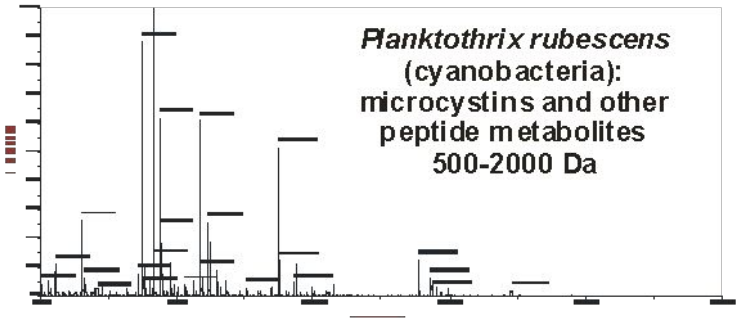
- диапазон масс до 50 Кда
- использование рефлектрона существенно увеличивает путь пролета ионов без увеличения геометрических размеров прибора
- высокое разрешение по массам
- уникальный рефлектрон искривленного поля обеспечивает бесступенчатую регистрацию фрагментарных ионов

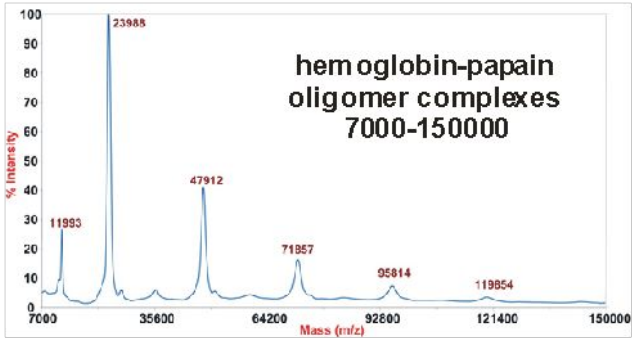


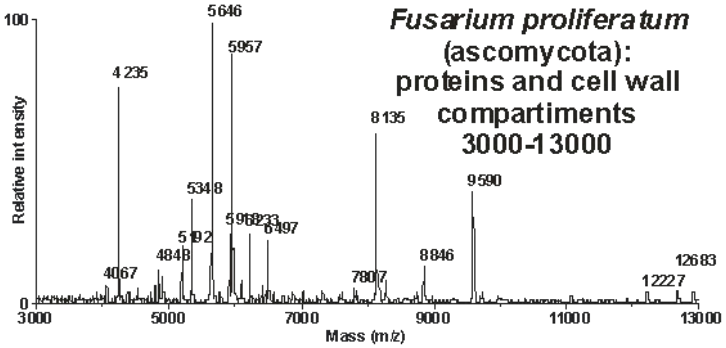
SHIMADZU

Масс-спектрометрия MALDI-TOF: диапазоны масс









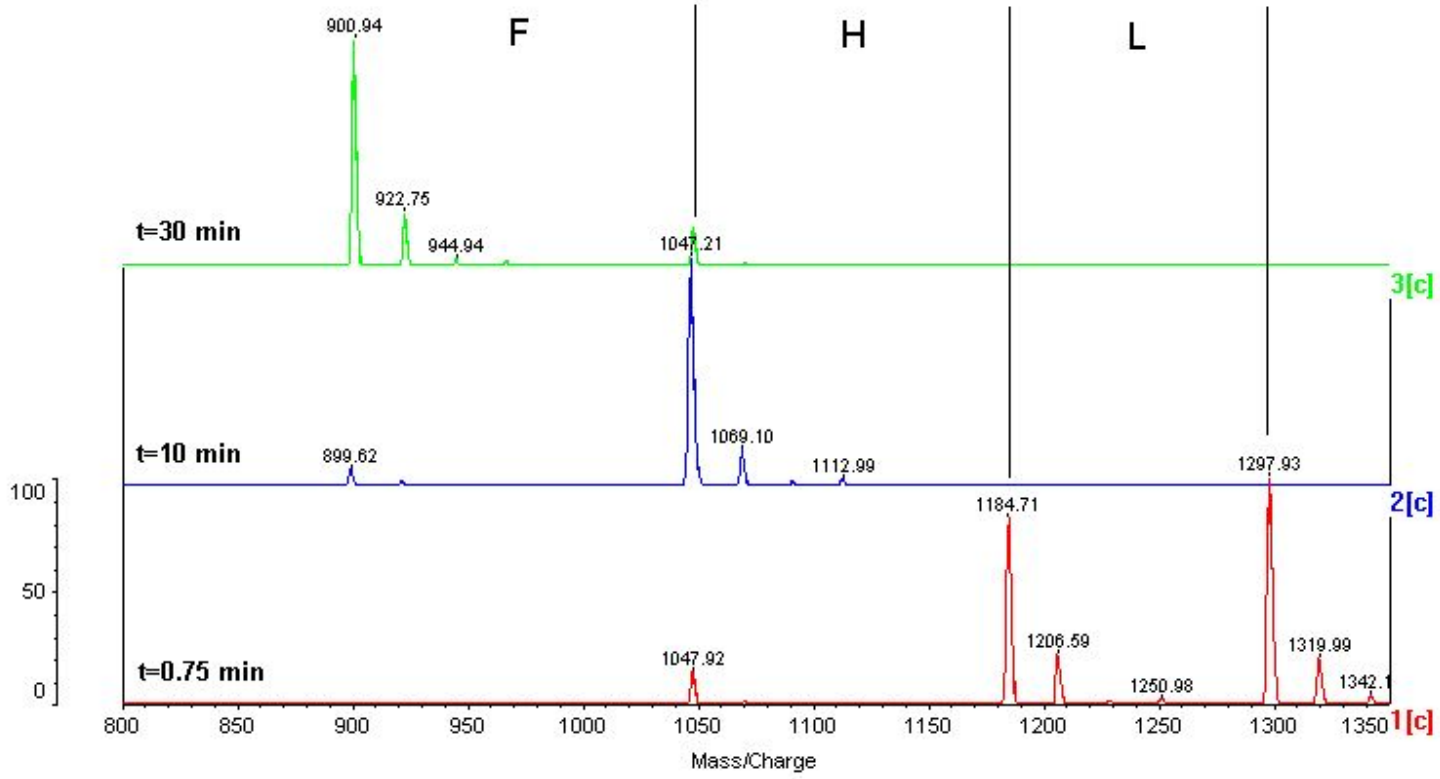
SHIMADZU

Масс-спектрометрия MALDI-TOF: преимущества метода

- Широчайший диапазон масс анализируемых соединений: от сотен Да до 500 КДа
- Возможность анализа высокомолекулярных соединений без разрушения молекулы.
- Высочайшая чувствительность: от 10^{-12} до 10^{-21} моль исследуемого вещества
- Высокая толерантность к солям
- В ходе ионизации образуются в основном однозарядные ионы, что значительно облегчает интерпретацию масс-спектров
- Возможность работы с многокомпонентными смесями
- Возможность получения информации о структуре анализируемых соединений при использовании МС/МС-анализа

Леддерное секвенирование *de novo*:

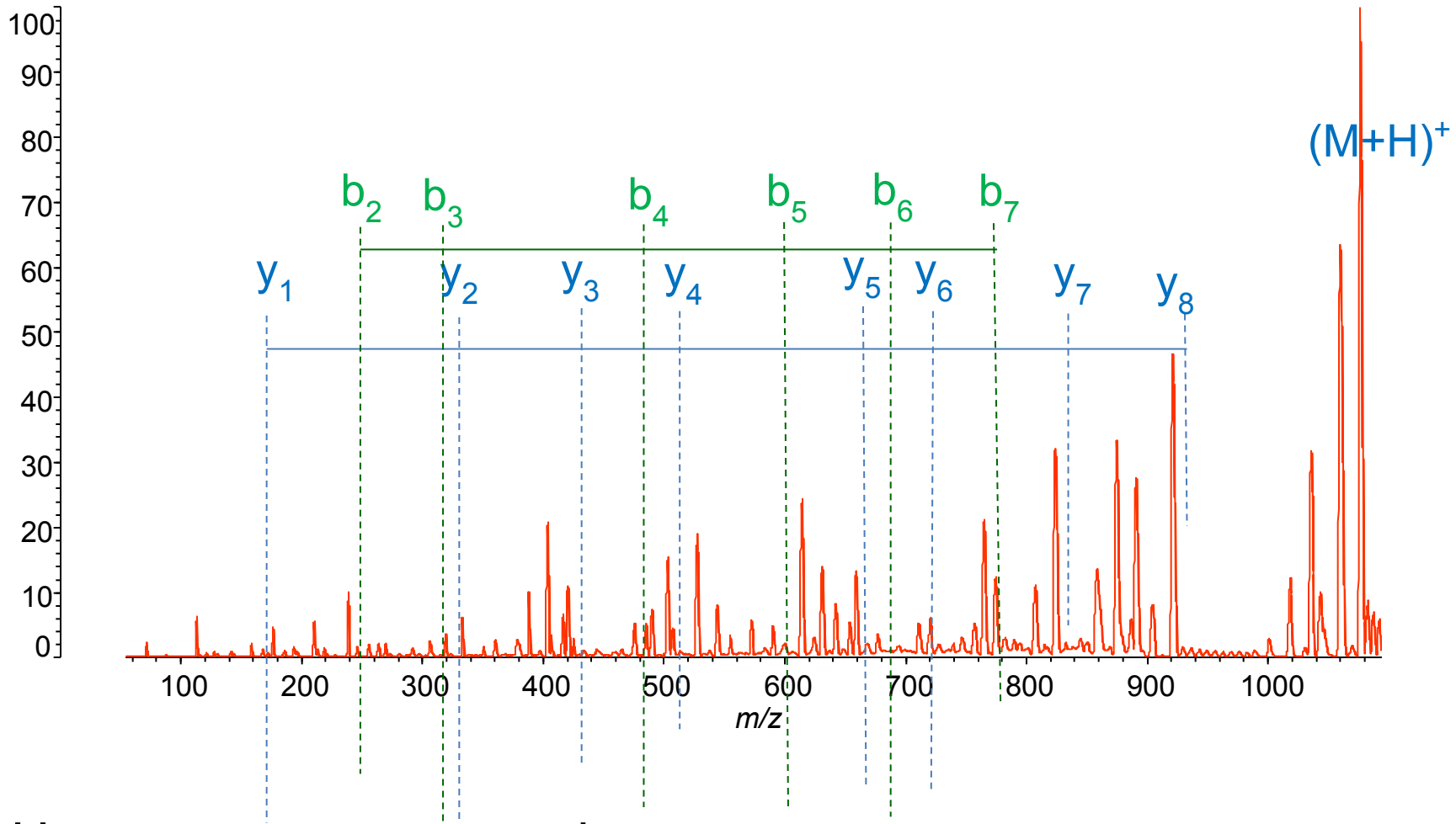
- Ферментативный гидролиз амидных связей пептида
- Масс-спектрометрический анализ продуктов реакции
- Разница в массах соответствует массе аминокислотного остатка



angiotensin I (DRVYIHPFHL), гидролизат (карбокисипептидаза)

SHIMADZU

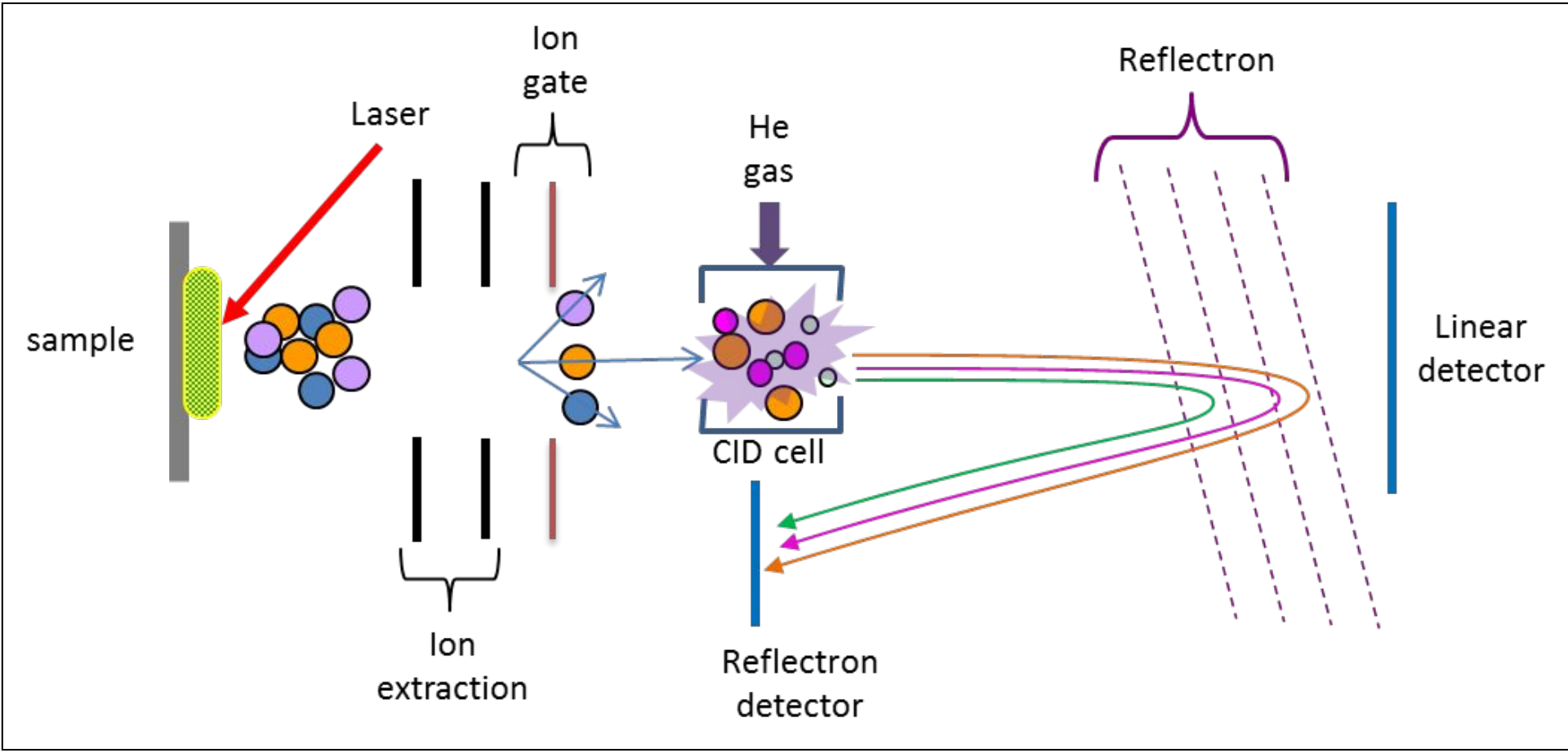
Секвенирование пептидов (PSD)



Низкоэнергетическая фрагментация пептидов за пределами источника ионизации

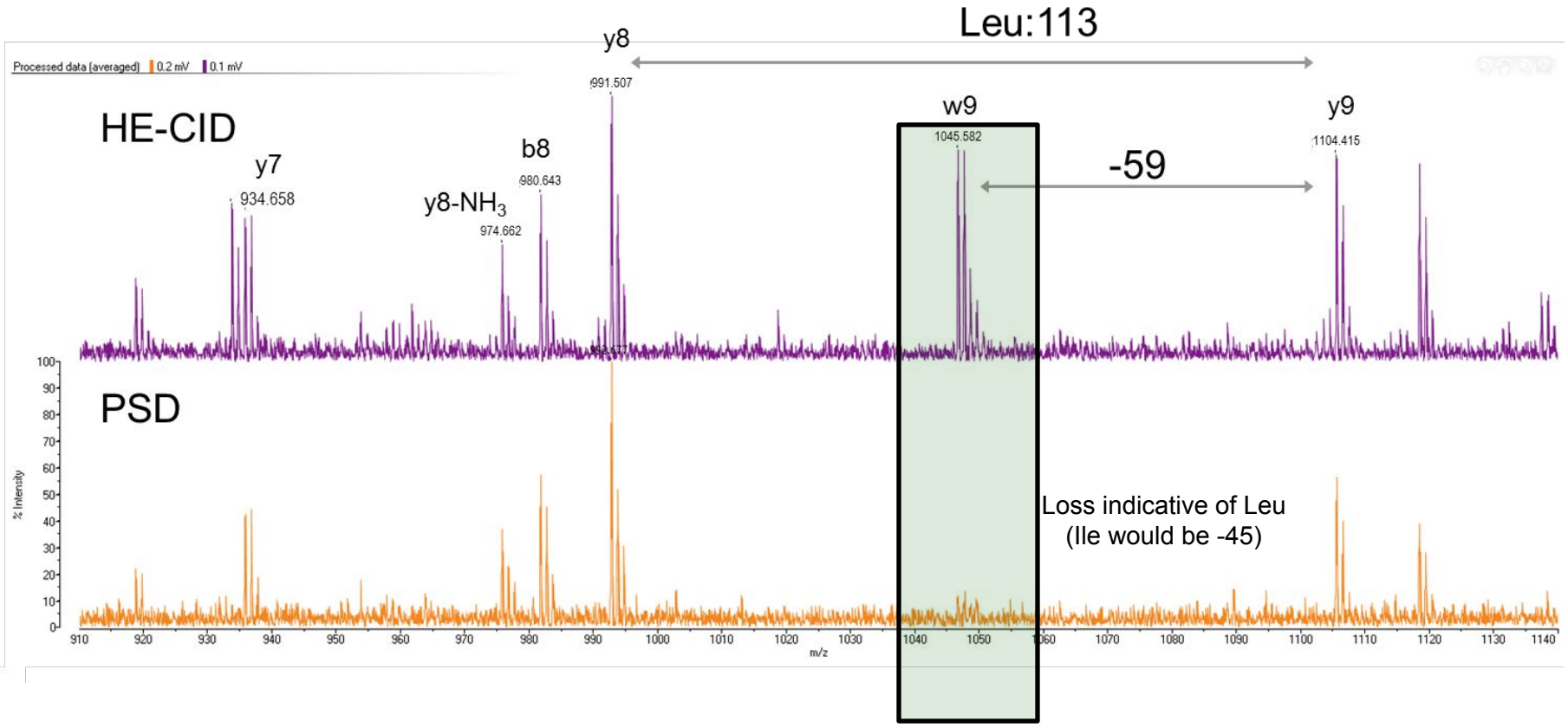
SHIMADZU

Секвенирование пептидов (HE-CID)



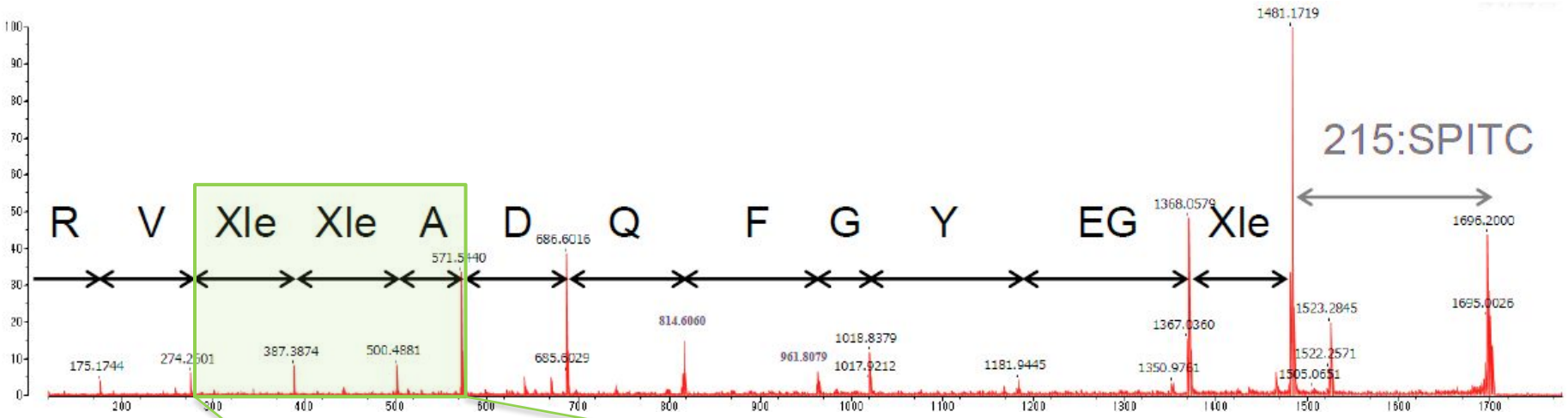
SHIMADZU

Секвенирование пептидов (HE-CID)

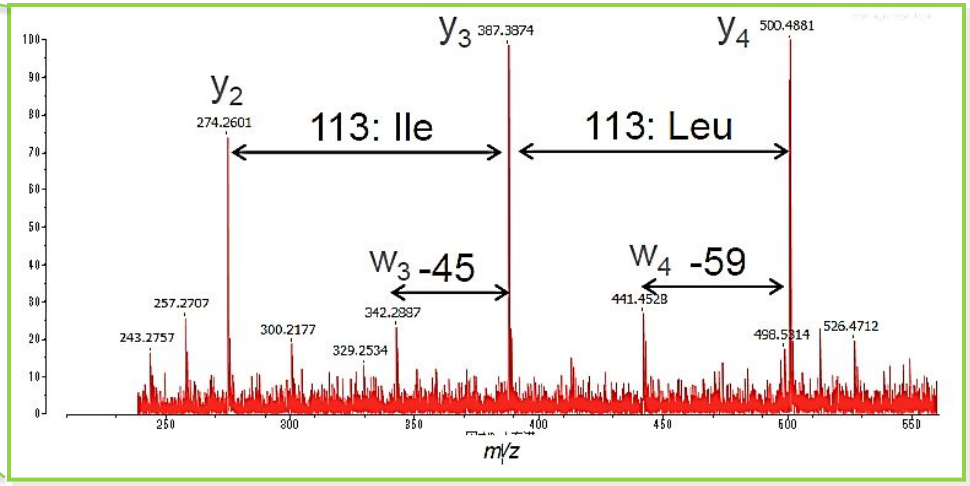


Фрагментация боковых цепей пептидов за счет высокоэнергетической соударительной диссоциации – дифференциация изомеров и изобаров, например, лейцина и изолейцина

Дифференциация лейцина и изолейцина



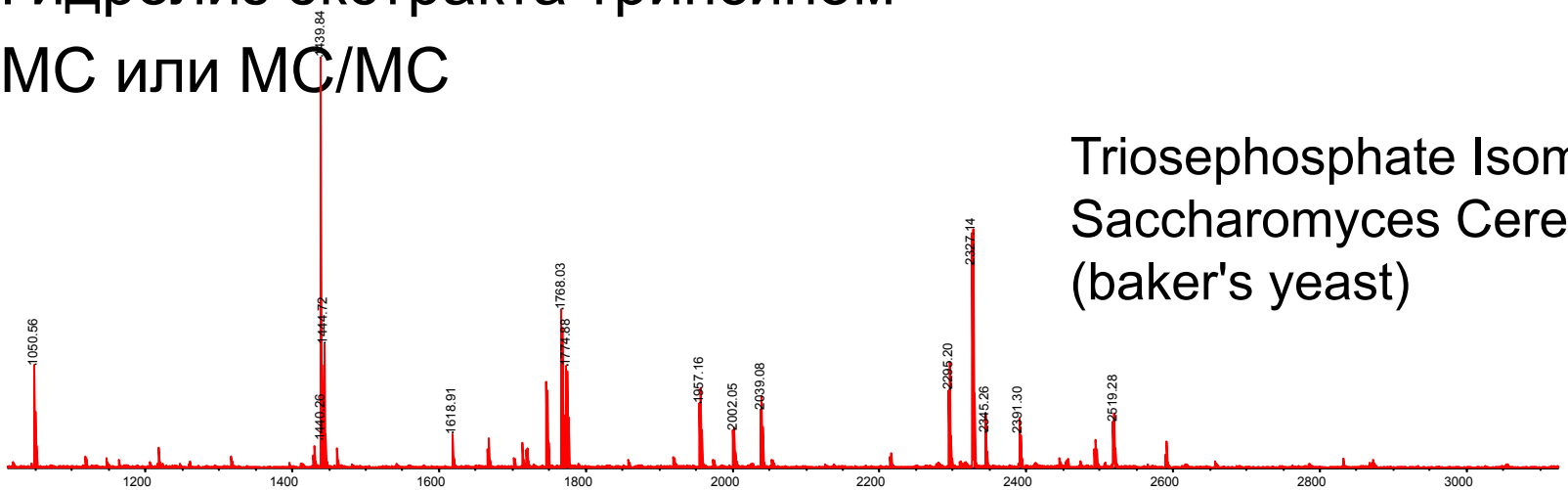
Фрагментация боковых цепей пептидов за счет высокоэнергетической соударительной диссоциации (HE CID) – дифференциация изомеров и изобаров, например, лейцина и изолейцина



SHIMADZU

Идентификация белков и пептидов

- Определения массы не достаточно для точной идентификации (множество различных белков имеют близкую молекулярную массу)
- Предварительное разделение (2D электрофорез)
- Экстракция «пятна» из геля
- Гидролиз экстракта трипсином
- МС или МС/МС

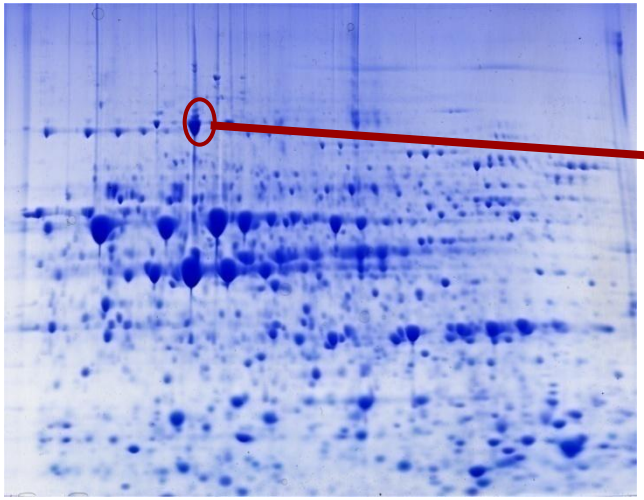


Масса/Заряд

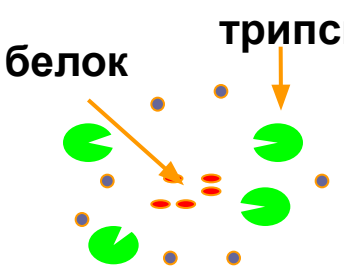
Triosephosphate Isomerase
Saccharomyces Cerevisiae
(baker's yeast)

SHIMADZU

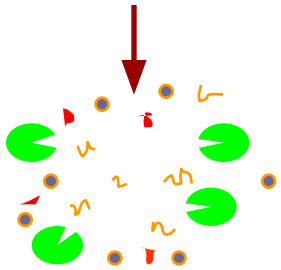
Идентификация белков и пептидов



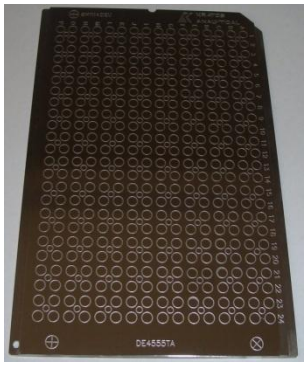
Расщепление в геле



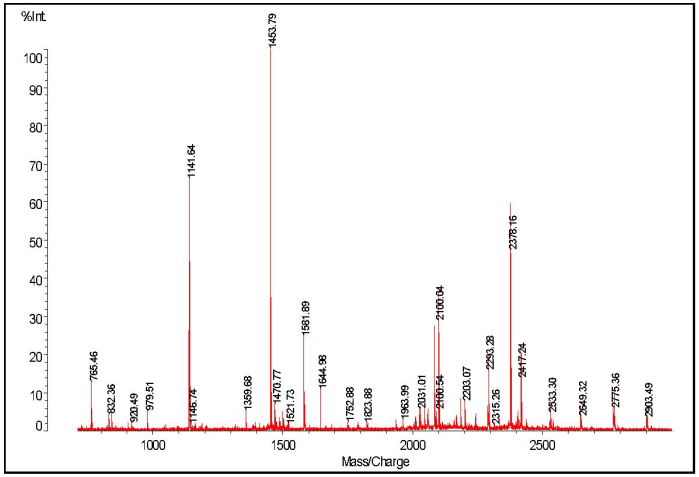
пептиды



приготовление образца



PMF



Идентификация пептидов: «пептидный фингерпринт» (PFM)

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
48 - 60	1470.77	1469.76	1469.73	0.04	0	TNMVMVFGEITTK
48 - 60	1486.74	1485.73	1485.72	0.01	0	TNMVMVFGEITTK Oxidation (M)
75 - 91	1752.88	1751.87	1751.84	0.03	1	AIGFVSDDVGLDADKCK
92 - 113	2417.24	2416.23	2416.25	-0.02	0	VLVNIEQQSPDIAQGVHGHFTK
157 - 169	1502.74	1501.73	1501.75	-0.01	1	KNGTCAWLRPDGK Carbamidomethyl (C)
170 - 180	1359.68	1358.67	1358.64	0.04	0	TQVTVEYYNDK
170 - 187	2084.05	2083.04	2083.04	0.00	1	TQVTVEYYNDKGAMVPIR
170 - 187	2100.04	2099.03	2099.04	-0.00	1	TQVTVEYYNDKGAMVPIR Oxidation (M)
188 - 208	2378.16	2377.15	2377.19	-0.03	0	VHTVLISTQHDETVTNDEIAR
209 - 222	1644.98	1643.97	1643.96	0.01	1	DLKEHVIKPVIPEK
212 - 227	1937.08	1936.07	1936.07	0.01	1	EHVIKPVIPEKYLDEK
223 - 237	1789.95	1788.94	1788.92	0.03	1	YLDEKTIFHLNPSGR
228 - 237	1141.64	1140.63	1140.60	0.03	0	TIFHLNPSGR
238 - 252	1453.79	1452.78	1452.75	0.04	0	FVIGGPHGDAGLTGR
238 - 253	1581.89	1580.88	1580.84	0.04	1	FVIGGPHGDAGLTGRK
254 - 273	1963.99	1962.98	1962.96	0.02	0	IIIDTYGGWGAHGGGAFSGK
254 - 277	2405.18	2404.17	2404.18	-0.01	1	IIIDTYGGWGAHGGGAFSGKDPTK
281 - 287	765.46	764.45	764.42	0.03	0	SGAYIVR
292 - 300	920.49	919.48	919.45	0.03	0	SVVANGMAR Oxidation (M)
339 - 355	2013.99	2012.98	2012.97	0.01	0	ESFDFRPGMMTINLDLK
339 - 355	2030.01	2029.00	2028.96	0.04	0	ESFDFRPGMMTINLDLK Oxidation (M)
339 - 355	2045.98	2044.97	2044.96	0.01	0	ESFDFRPGMMTINLDLK 2 Oxidation (M)
339 - 356	2170.09	2169.08	2169.07	0.01	1	ESFDFRPGMMTINLDLKR
339 - 356	2186.09	2185.08	2185.07	0.02	1	ESFDFRPGMMTINLDLKR Oxidation (M)
339 - 356	2202.07	2201.06	2201.06	0.00	1	ESFDFRPGMMTINLDLKR 2 Oxidation (M)
365 - 373	979.51	978.50	978.47	0.04	0	TAAYGHFGR
365 - 387	2649.32	2648.31	2648.30	0.01	1	TAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLK

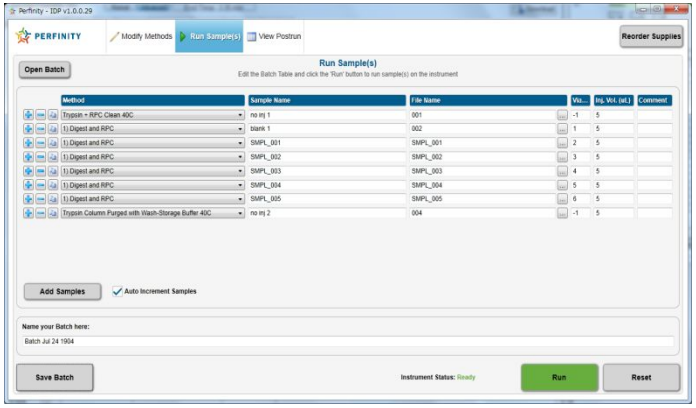
1. gi|81647 **Mass:** 43117 **Score:** 262 **Expect:** 3.2e-22 **Queries matched:** 27

methionine adenosyltransferase (EC 2.5.1.6) - Arabidopsis thaliana

SHIMADZU

«Perfinity iDP» – автоматизированная подготовка белковых образцов для анализа

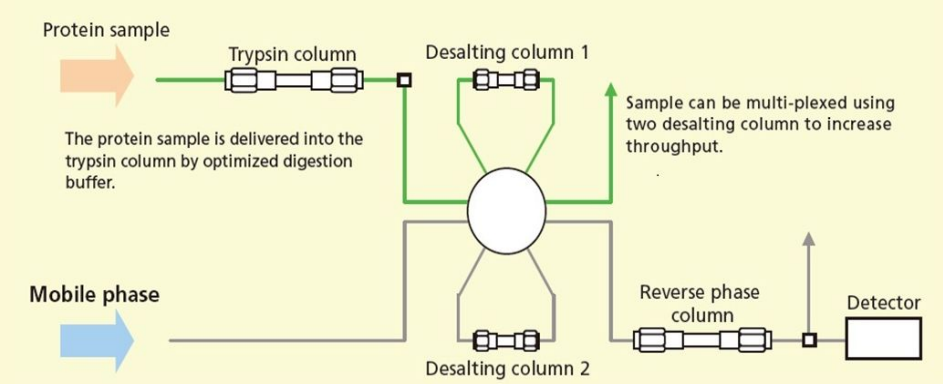
- Обычно подготовка проб для протеомного анализа требует 18-часового гидролиза трипсином
- Perfinity iDP снижает время пробоподготоки до 30 мин!
- Система обеспечивает автоматическую замену буфера, ферментное разложение, обессоливание и ОФ разделение
- Уменьшение вспомогательного оборудования, минимизация ошибки, увеличение продуктивности лаборатории
- Применение: очистка белков, разработка лекарственных препаратов, исследование биомаркеров

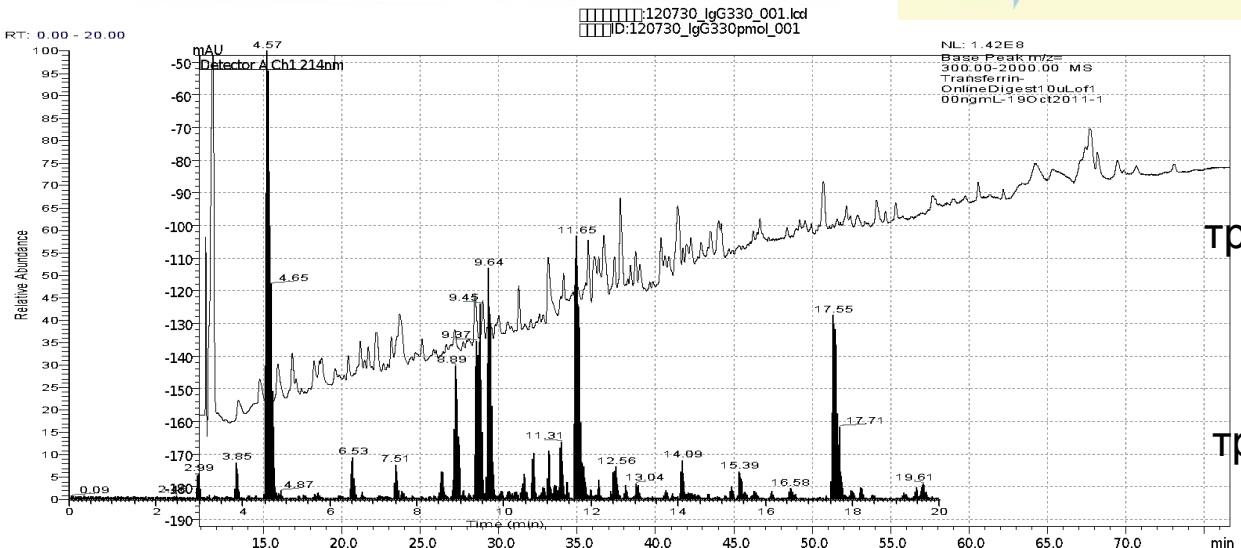


Колонка с иммобилизованным трипсином

SHIMADZU

«Perfinity iDP» – автоматизированная подготовка белковых образцов для анализа





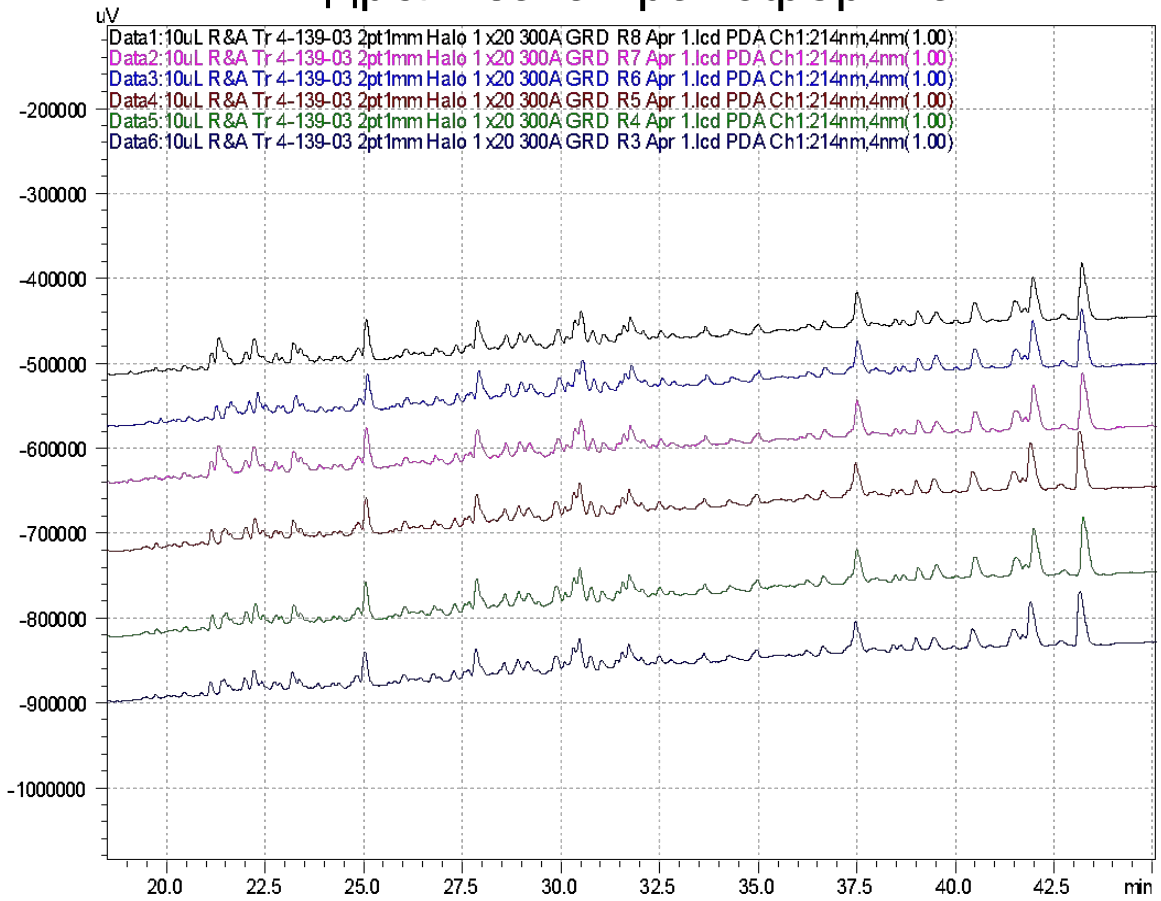
МС-хроматограмма трипсинового гидролизата трансферина

УФ-хроматограмма трипсинового гидролизата IgG

SHIMADZU

«Perfinity iDP» – автоматизированная подготовка белковых образцов для анализа

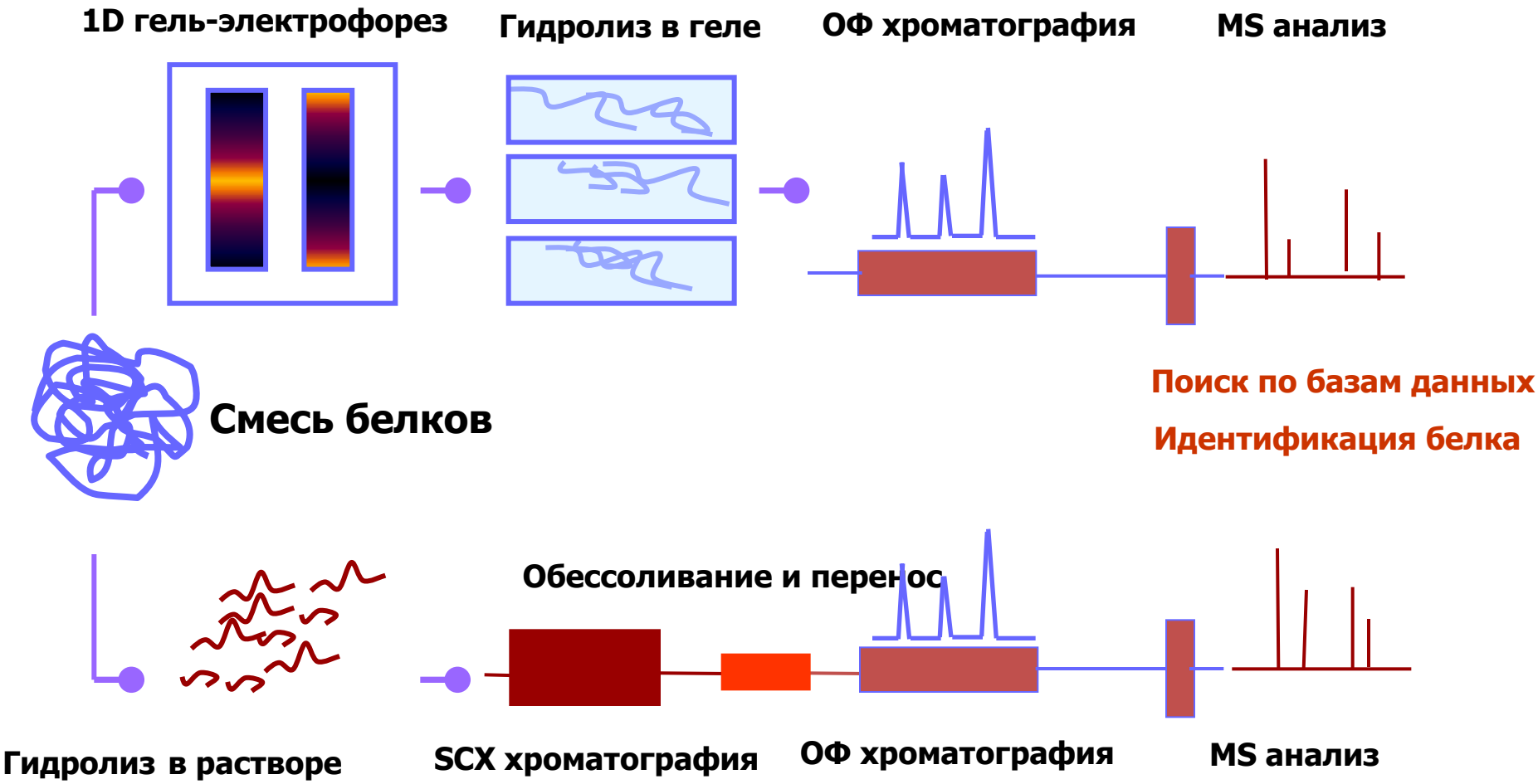
Результаты 6 последовательных анализов трипсинового гидролизата трансферина



Полная автоматизация процесса пробоподготовки обеспечивает получение надежных и воспроизводимых результатов

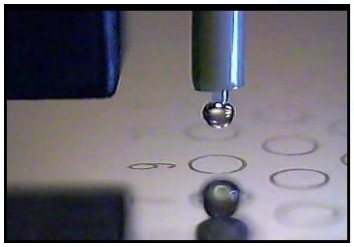
SHIMADZU

Совмещение MALDI-MC и ВЭЖХ



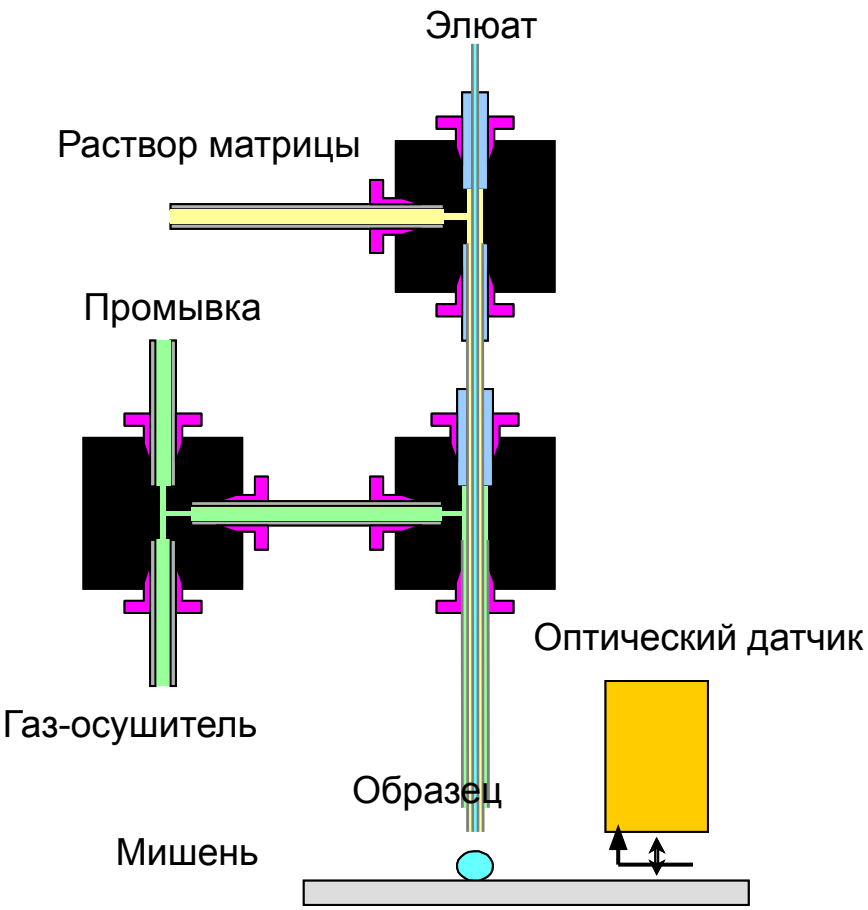
SHIMADZU

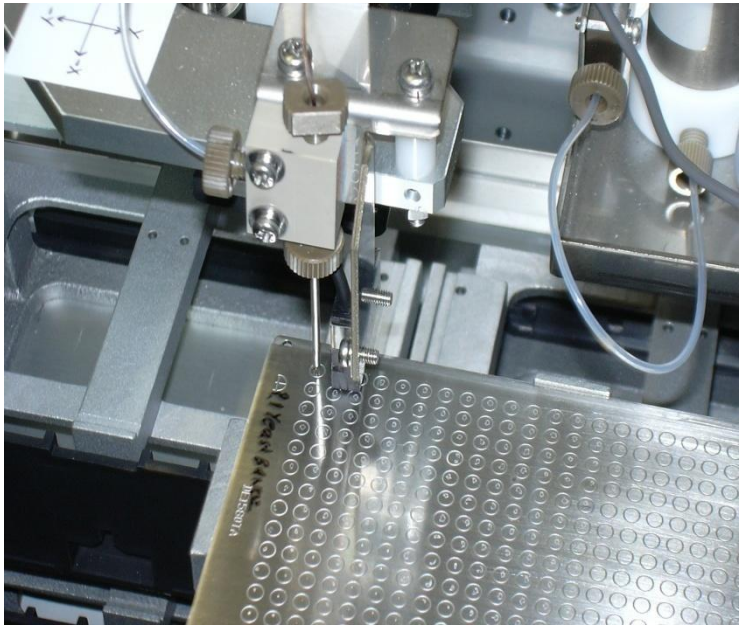
AccuSpot – нано-споттер для MALDI-MC

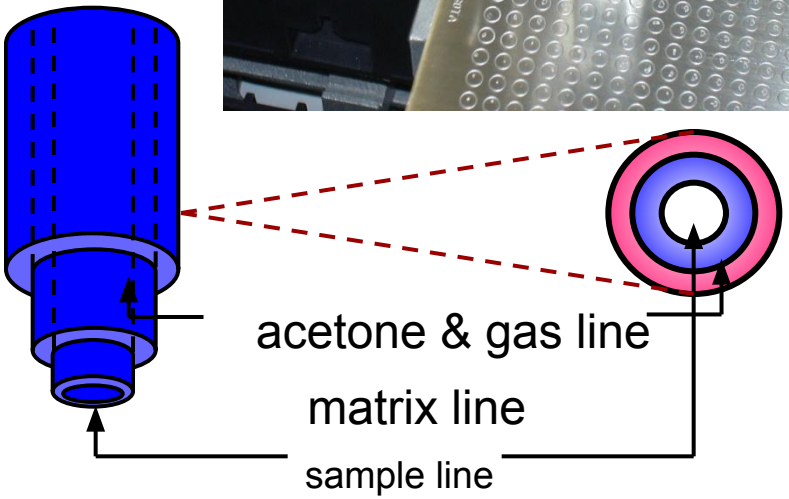


SHIMADZU

AccuSpot – нано-споттер для MALDI-MC





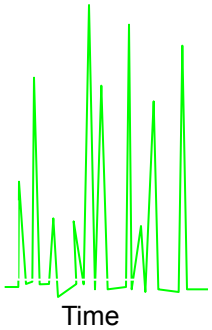


SHIMADZU

ВЭЖХ-MALDI

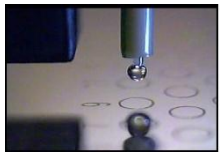
Образец: ферментный гидролизат или смесь нативных белков

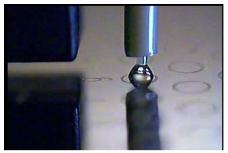
ВЭЖХ разделение 1D или 2D

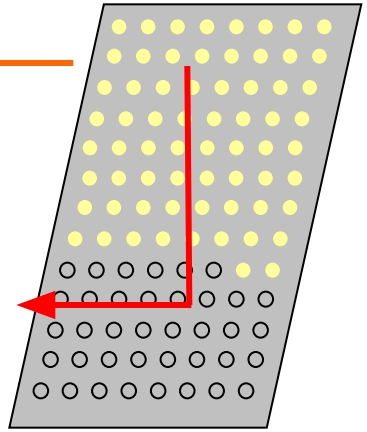


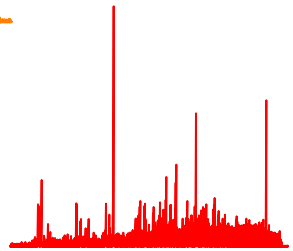
Хроматограммаа УФ

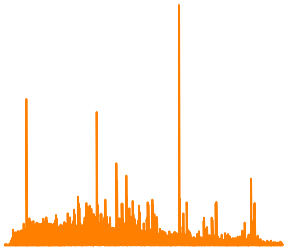
Автоматическое совместное нанесение элюента и матрицы на мишень **AccuSpot**







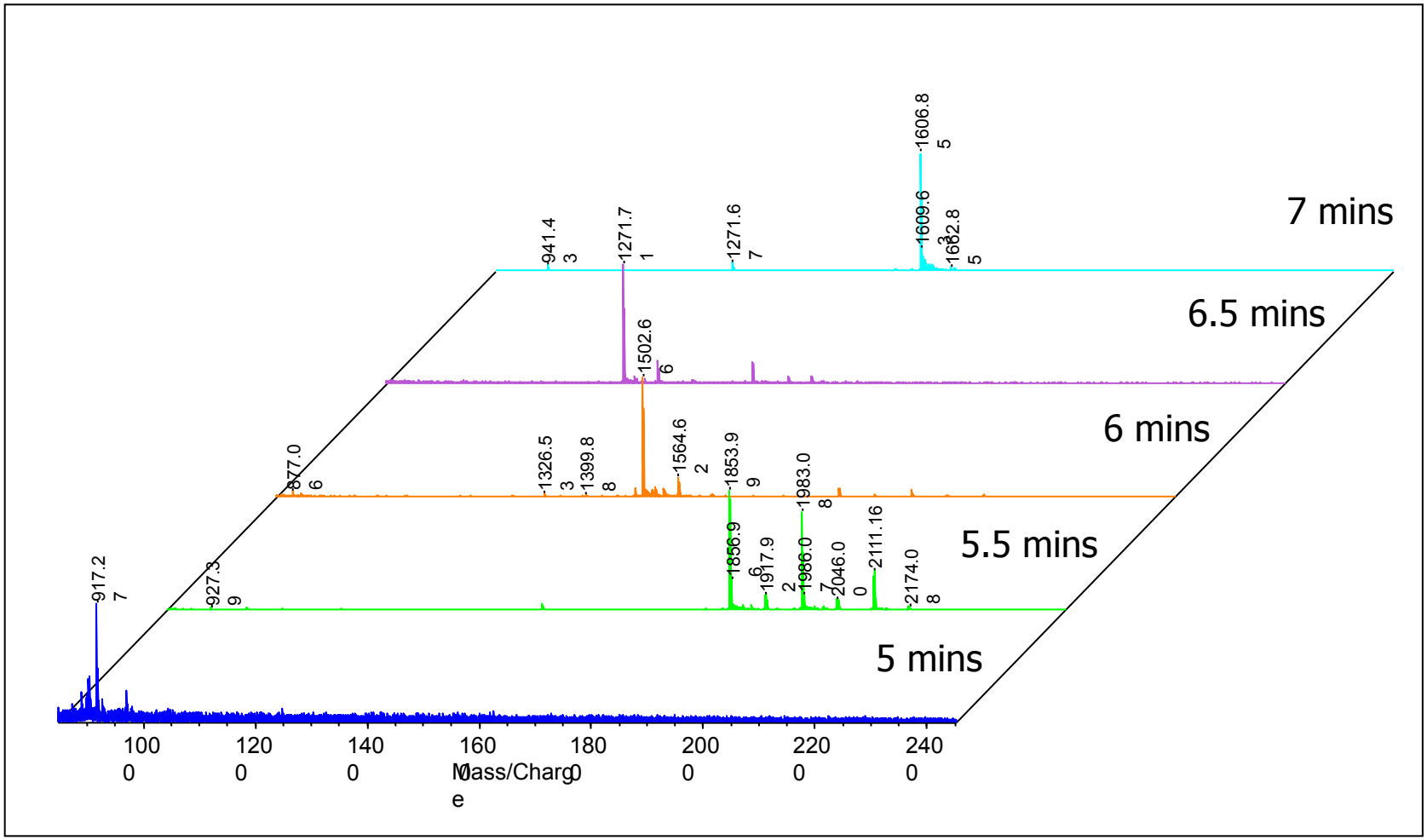




MALDI-MS

SHIMADZU

ВЭЖХ-MALDI 50 фМ гидролизата миоглобина

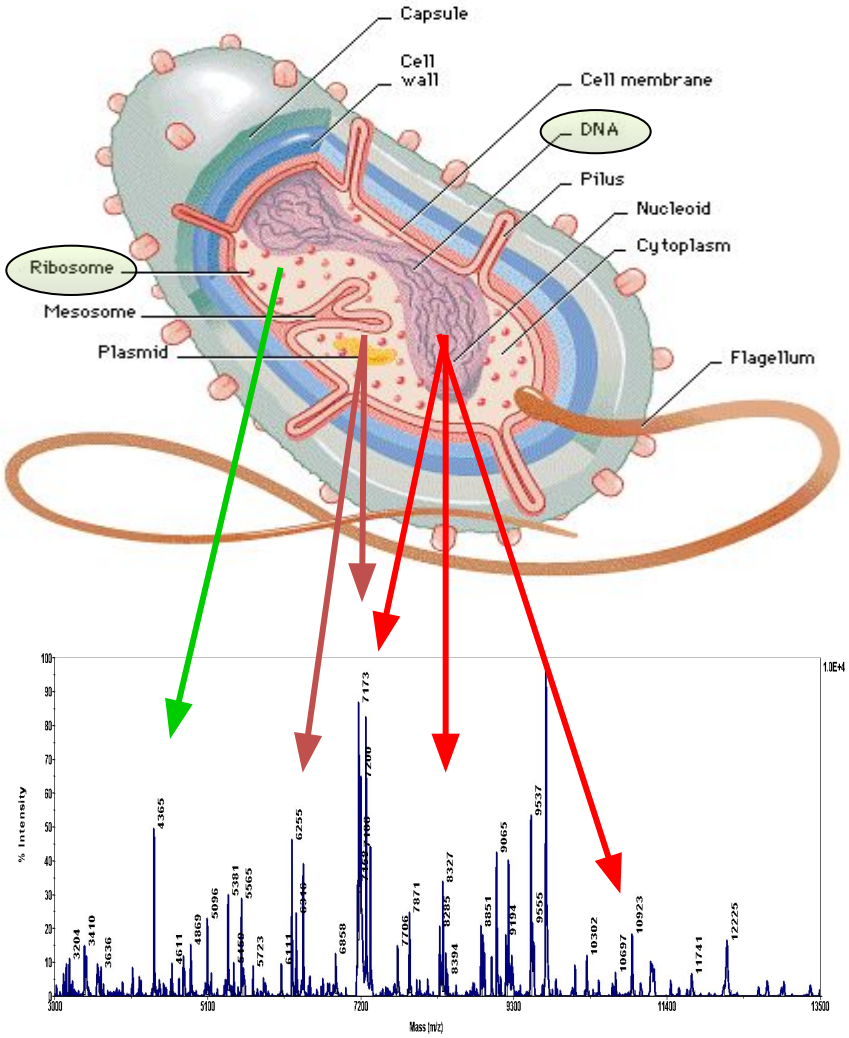


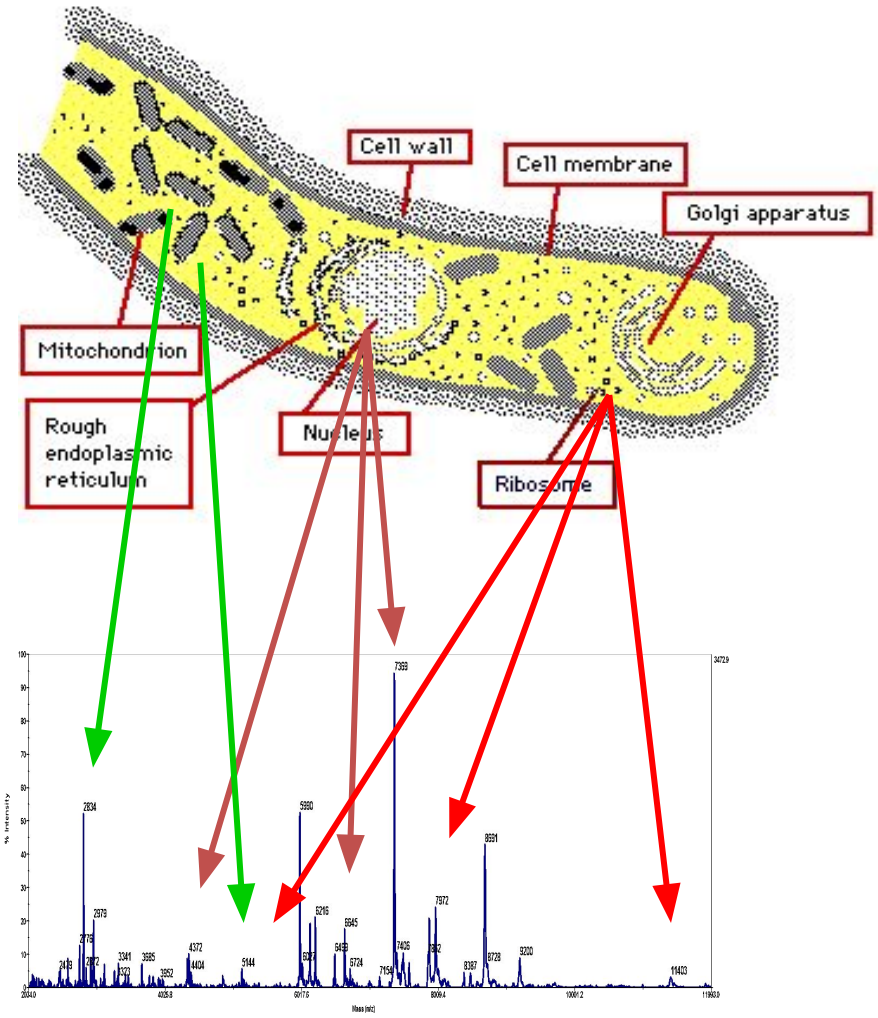
Новое интесивно развивающееся направление: идентификация микроорганизмов методом масс-спектрометрии MALDI

- **Идентификация микроорганизмов:**
  - ✔ Быстрый и надежный скрининг широкого спектра микроорганизмов
  - ✔ Идентификация грам-положительных и грам-отрицательных бактерий, водорослей, грибов и дрожжей
  - ✔ Надежная идентификация возможна благодаря тому, что MALDI является таксономически-специфичным
  - ✔ Для идентификации используются масс-спектры из базы данных SARAMIS
  - ✔ SARAMIS: Spectral ARchive And Microbial Identification System

SHIMADZU

Принцип идентификации: рибосомальные белки





SHIMADZU

Масс-спектры нативных бактериальных клеток: масс-спектрометрические «отпечатки пальцев»

Pantoea agglomerans

Acinetobacter lwoffi

Burkholderia cepacia

Raoultella ornithinolytica

Staphylococcus aureus

Escherichia coli

SHIMADZU

SARAMIS

Референсные масс-спектры

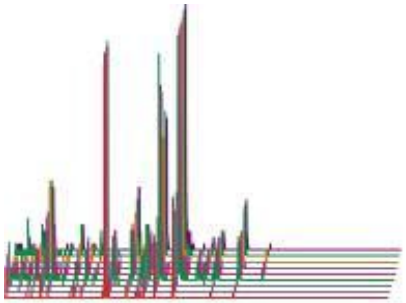
Изолят

Культура

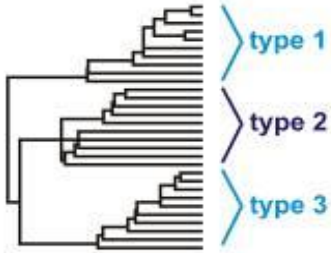
MALDI-TOF анализ

Единичный спектр = Референсный спектр

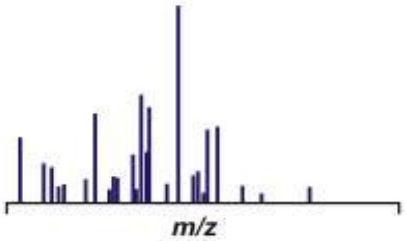
СуперСпектры



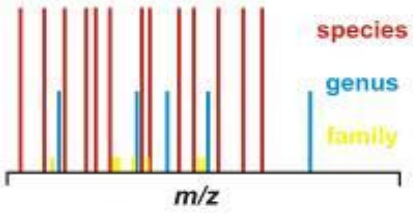
mass spectra of multiple isolates of a species



similarity dendrogram of mass fingerprints

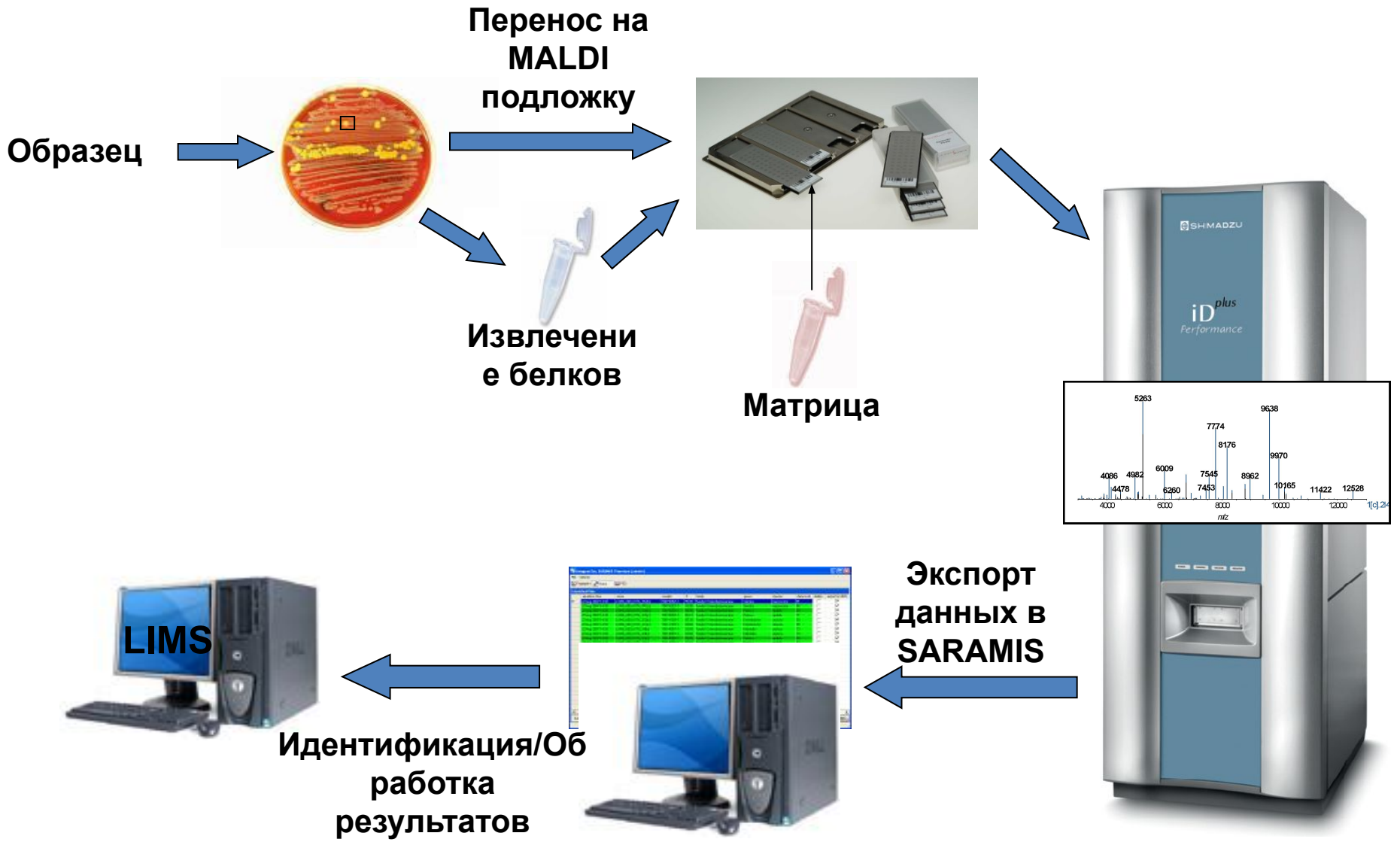


consensus spectrum with average signal intensity



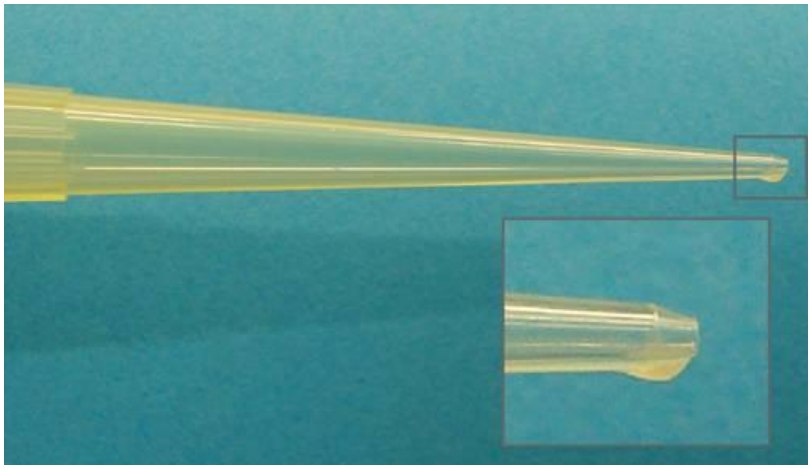
SuperSpectrum with signals weighted by specificity

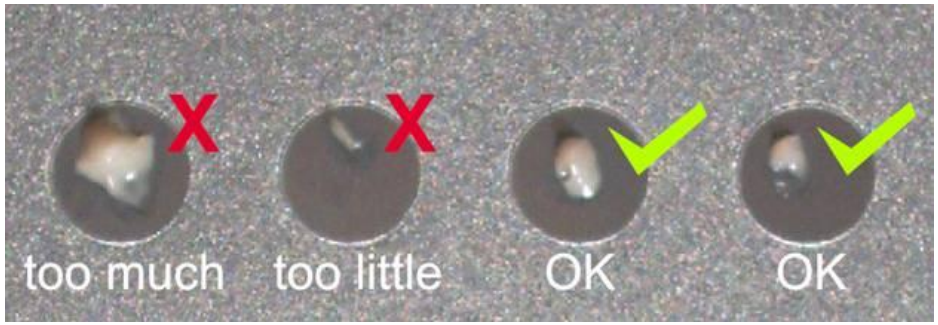
Система AXIMA iD*plus* для идентификации

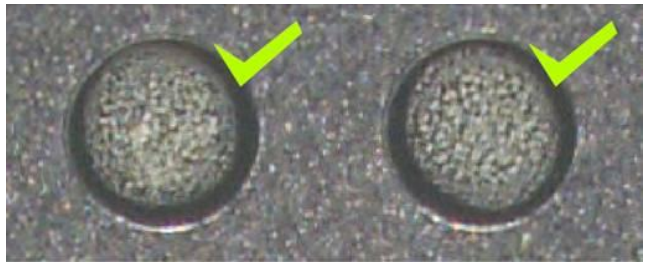


SHIMADZU

iDPlus: подготовка образца к анализу





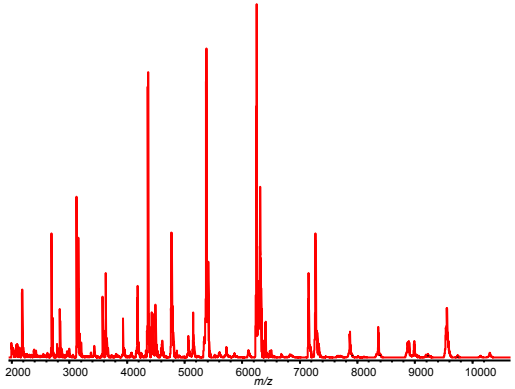


Приготовление образцов бактерий, дрожжей, водорослей и грибков прямым методом «мазка». Никакая дополнительная пробоподготовка не требуется (даже для дрожжей).

SHIMADZU

iDPlus: идентификация с помощью MALDI и SARAMIS

Получение масс-спектра



Экспорт в SARAMIS (ASCII)

Результаты

Дата/время | Имя файла | Имя образца | Уровень совпадения | Семейство | Род | Вид | К-во масс-пиков

Identified Files

aquisition time	name	sample	%	family	genus	species	typ	datacount	delete	export to LIMS	compare	compare result	import
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1G1[c]	03116258-1	99,90	Family I Enterobacteriaceae	Providencia	rettgeri		196	☐	☑	☐		☐
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1F4[c]	31106236-1_02	99,90	Family I Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	maltophilia		181	☐	☑	☐		☐
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1F3[c]	31106236-1	99,90	Family I Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	maltophilia		166	☐	☑	☐		☐
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1F2[c]	31106225-1_02	99,90	Family I Enterobacteriaceae	Escherichia	coli		198	☐	☐	☐		☐
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1F1[c]	31106225-1	99,90	Family I Enterobacteriaceae	Escherichia	coli		195	☐	☐	☐		☐
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1E4[c]	17056488-1_02	99,90	Family I Enterobacteriaceae	Escherichia	coli		167	☐	☑	☐		☐
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1E3[c]	17056488-1	94,80	Family I Enterobacteriaceae	Escherichia	coli		117	☐	☑	☑		☐
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1E2[c]	18053559-1_02	95,20	Family VI Streptococcaceae	Streptococcus	bovis/alactol		93	☐	☑	☐		☐
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1E1[c]	18053559-1	95,20	Family VI Streptococcaceae	Streptococcus	bovis/alactol		72	☐	☑	☐		☐
19 Nov 2008 14:38	ANAS_001_0621_1D4[c]	18052218-1_02	99,90	Family VIII Staphylococcace	Staphylococcus	aureus		134	☐	☑	☐		☐

SHIMADZU

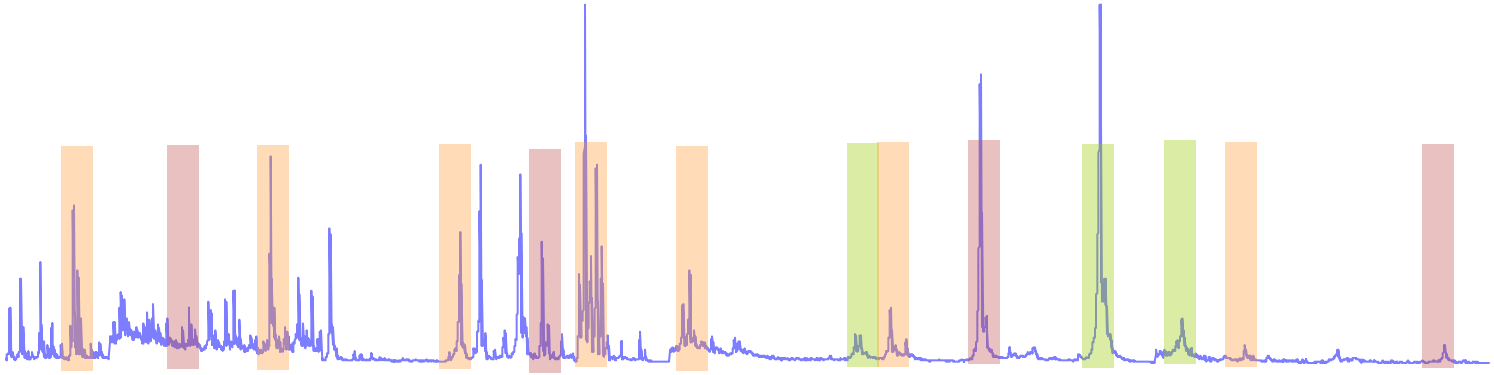
Поиск в библиотеке SARAMIS

Сравнение полученных спектров с эталонными спектрами (в библиотеке ~ 400 родов, 1400 видов)

семейство

род

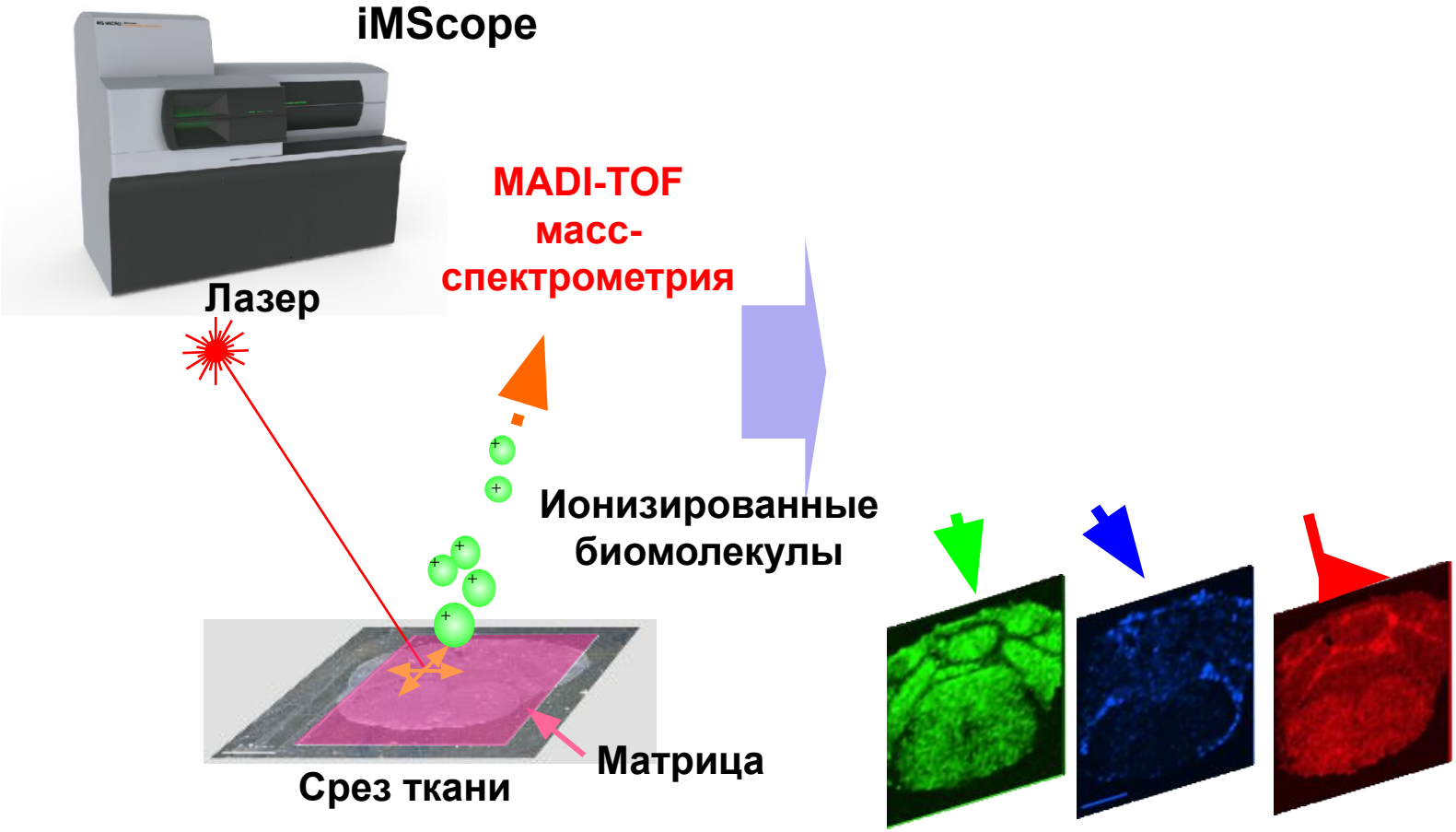
вид



Библиотека позволяет проводить последовательную идентификацию, основываясь на пиках характериных для семейства, рода и, наконец, вида

Технология молекулярной визуализации методом масс-спектрометрии MALDI

MALDI Imaging Mass Spectrometry позволяет визуализировать пространственное распределение молекул в биологических образцах, например, в гистологических срезах тканей



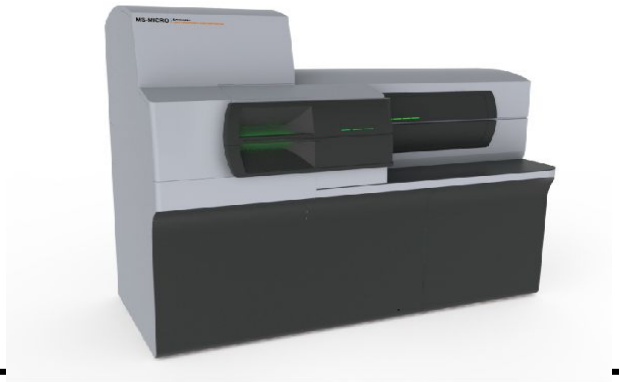
SHIMADZU

Визуализирующая масс-спектрометрия – мощная технология для молекулярной визуализации

- Визуализация распределения биомолекул в различных гистологических образцах
  - ✔ Свежевыделенные, замороженные, зафиксированные в формалине и залитые парафином (FFPE), клеточные культуры
- Идентификация широкого спектра высоко- и низкомолекулярных соединений
  - ✔ Липиды (фосфолипиды: PC,PE,SM,SE и др.), белки/пептиды, низкомолекулярные метаболиты (АТФ/АДФ/АМФ и др), лекарства и их метаболиты и т.д.
  - ✔ Высокоточная идентификация за счет MC/MC анализа
- Одновременная визуализация многих молекул
  - ✔ Нет необходимости в предварительном выборе соединения
  - ✔ Непрерывный анализ: скрининг и идентификация
- Детектирование без меток или мишеней
  - ✔ Не нужны изотопные или флуоресцентные метки (соответственно сигнал не «размывается» в пространстве)
  - ✔ Нет необходимости использовать антитела

SHIMADZU

Приборы для молекулярной визуализации



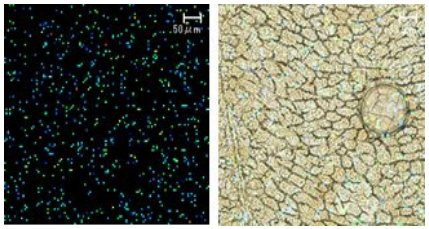
Инструмент	iMScope TRIO	MALDI-7090
Назначение	Молекулярная визуализация	Мол. визуализация и другие применения
Оптический микроскоп	Встроен	Нет
Ионизация	MALDI при атм. давлении	MALDI в вакууме
Разрешение простр.	5 мкм	10 мкм
Частота лазера	~ 1000 Гц	~ 2000 Гц
Диапазон масс,m/z	50 ~ 3,000	~ 500,000
MC^n	≦ 10	≦2

SHIMADZU

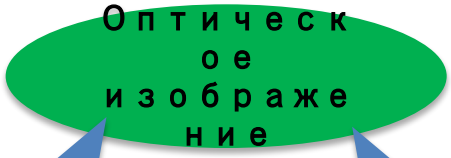
Концепция iMScope TRIO

Прямая идентификация молекул в тканях с помощью масс-спектрометрии после получения оптического изображения исследуемой ткани

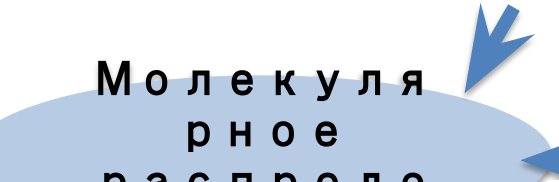
МС изображение Оптическое изображение



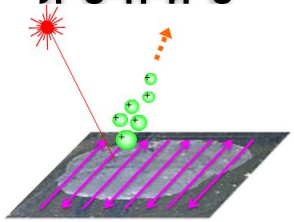
Распределение квертицина

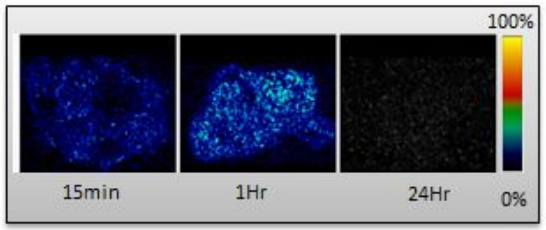


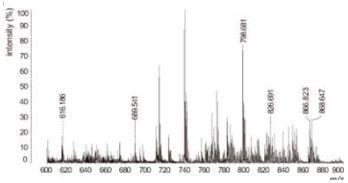
Fusion



Как распределены молекулы ?



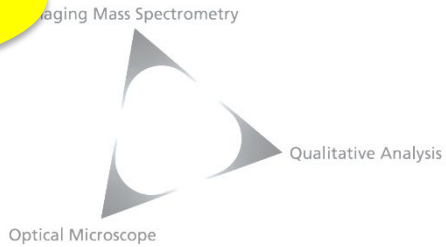




Масс-спектр

Список пожеланий (Hamamatsu Univ. and Keio Univ.)

1. Сравнение с микроскопом
2. Анализ биологических образцов
3. Высокое пространственное разрешение
4. Скоростной анализ
5. Возможность идентификации
6. Простота
7. Воспроизводимость



SHIMADZU

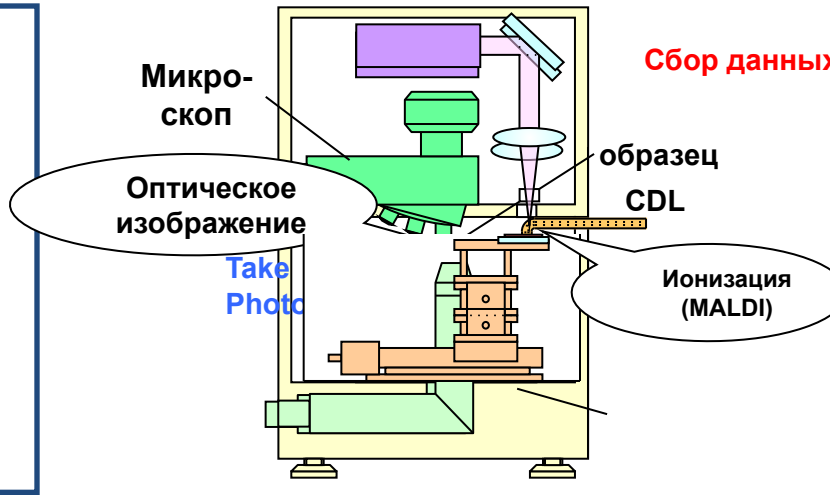
Система молекулярной визуализации «iMScope TRIO»

014
Авгу
ст

Блок МАЛДИ микроскопа

Особенности

- ✔МАЛДИ при атмосферном давлении
- ✔Встроенная оптическая и масс- визуализация
- ✔Высочайшее пространственное разрешение
- ✔Структурный анализ в режиме MS^n
- ✔Высокоскоростная обработка данных



SHIMADZU

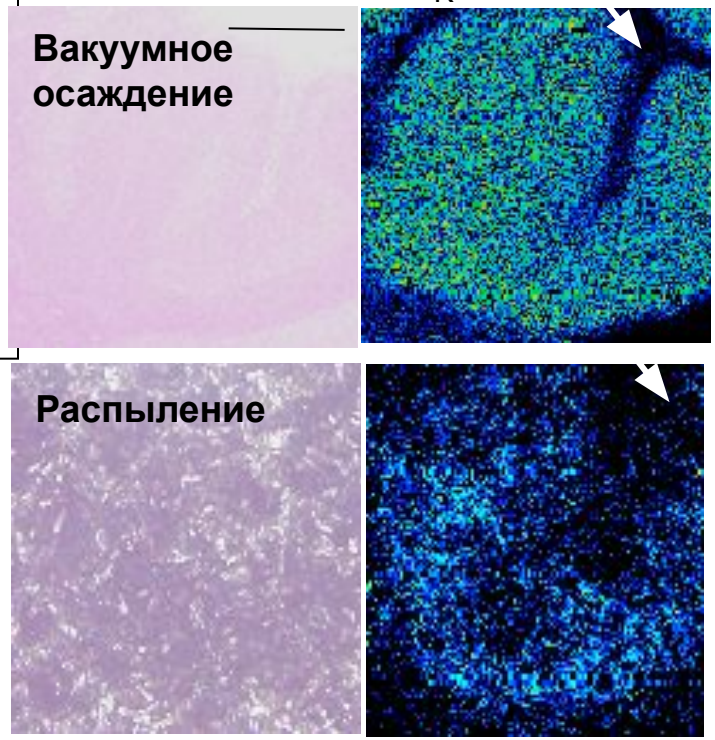
iMLayer: Система осаждения матрицы из паровой фазы

Обеспечивает оптически прозрачный слой матрицы

Характеристики:
Мелкозернистая структура слоя матрицы
Контроль толщины слоя матрицы улучшает воспроизводимость результатов
Автоматизированная пробоподготовка

Оптическое изображение

m/z 772.52
PC (16.0/16.0) + K

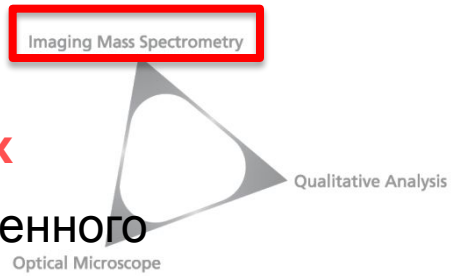


Осаждение из паровой фазы дает более четкие изображения, чем при распылении, и позволяет визуализировать пограничные области на срезах тканей. (См. место, отмеченное стрелками).

500 мкм

SHIMADZU

Интегрированная система молекулярной визуализации (программное обеспечение)



Специализированное программное обеспечение для iMScope «Imaging MS Solution» для сбора и анализа данных

Быстрый поиск целевых соединений и построение пространственного распределения

Регистрация пиков

↓

Стат. анализ

Кластерный анализ (HCA)
Анализ основных компонентов (PCA)
Анализ интересующих зон (ROI)

↓

Построение масс-спектра

Интуитивно понятное программное обеспечение

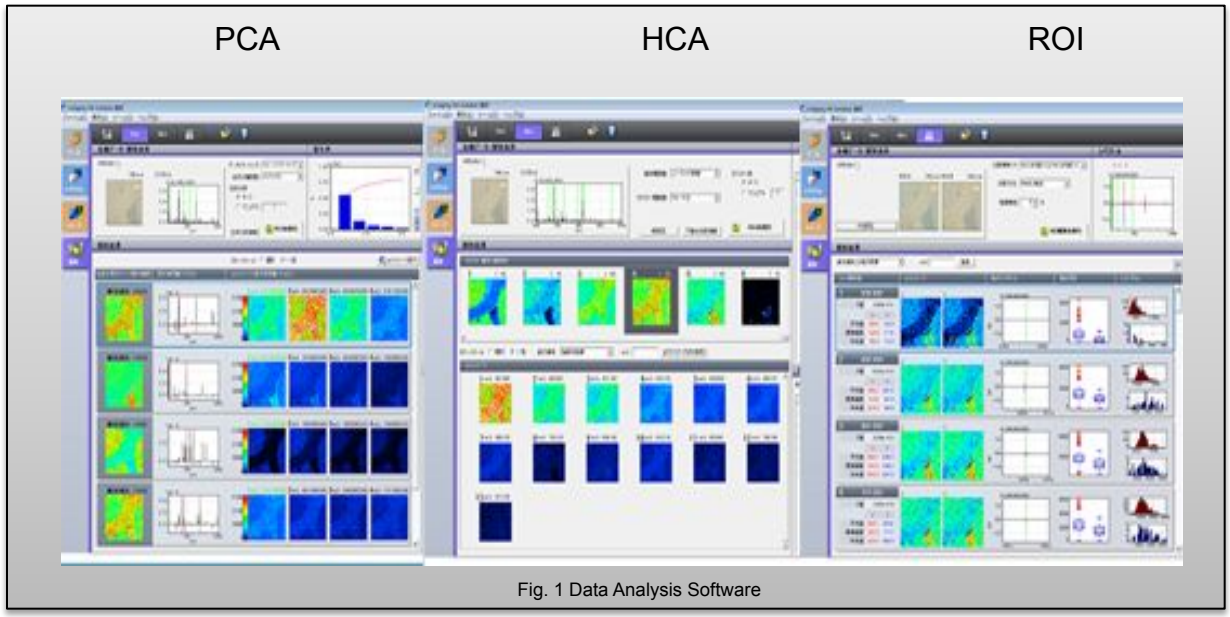


Fig. 1 Data Analysis Software

Автоматический анализ сокращает время поиска целевых компонентов

Инструменты статистического анализа

SHIMADZU

iMScope *TRIO*

Интегрированное оптическое изображение

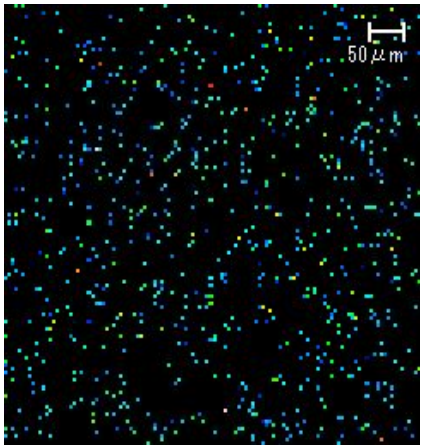
《Imaging MS Solution》

Обеспечивает расширенные возможности анализа изображений

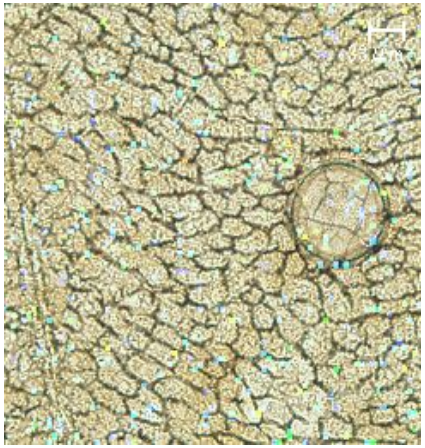
<u>Функция совмещения оптического и МС- изображений</u>

Молекулы лекарственного средства были идентифицированы в непосредственно в тканях

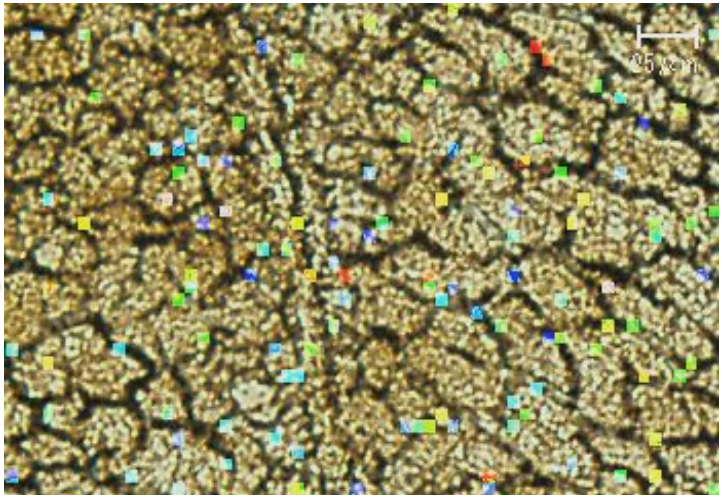
Совмещение оптического и МС- изображений распределения кверцетина в печени мыши



m/z 269,2→224,97
МС/МС изображение
（5 x 5 мкм）



Наложение *m/z* 269,2→224,97
МС/МС изображения
（50 x 50 мкм）



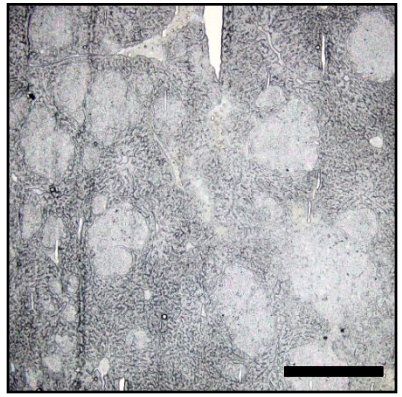
Увеличенное совмещенное изображение
m/z 269.2→224.97 МС/МС изображение
（25 x 25 мкм）

SHIMADZU

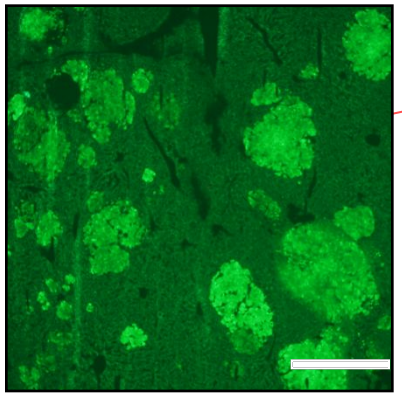
iMScope *TRIO*

Возможности визуализации с использованием флуоресцентной микроскопии

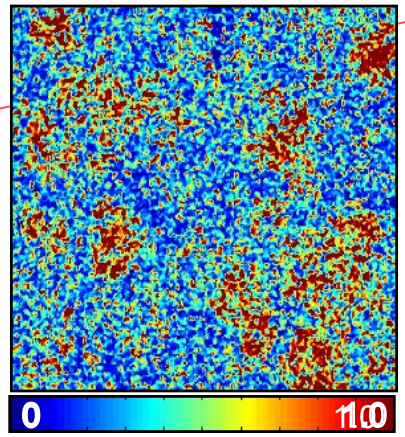
МС визуализация рака толстой кишки человека, пересаженного в печень мыши



Изображение светового микроскопа

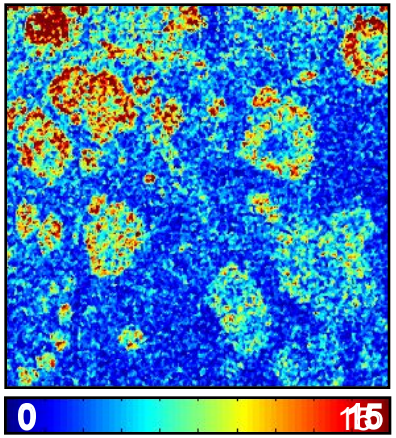


Изображение флуоресцентного микроскопа
Зеленое: Опухоль



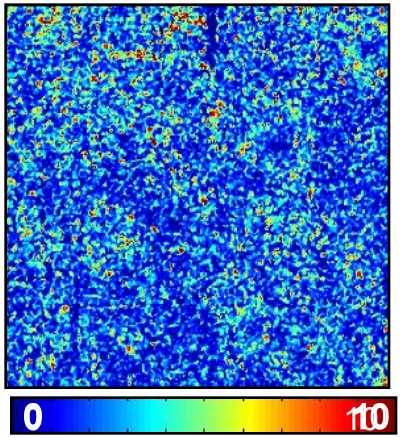
$[UDP\text{-}HexNAc]_{app}$ µmol/ g tissue

c: UDP-GlcNAc накапливается в опухолевой ткани.



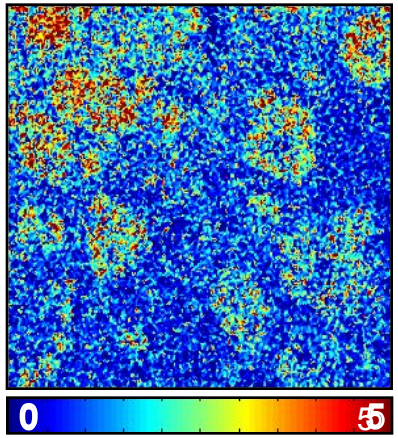
$[GSH]_{app}$ µmol/ g tissue

d: Пониженное содержание глутатиона
Больше в области толстой кишки и меньше внутри опухоли.



$[GSSG]_{app}$ µmol/ g tissue

e: Окисленный глутатион



$[GSH]_{app}/[GSSG]_{app}$

f: Мольное соотношение окисленной и восстановленной форм глутатиона. Отношение восстановленной формы глутатиона выше в опухолевой ткани.

Масштаб: 0.5 мм

Раковые ткани с флуоресцентными метками можно визуализировать с помощью **флуоресцентного микроскопа**.

a, b: Изображения со встроенного оптического микроскопа
Клеточные линии пересаженного рака толстой кишки имеют зеленую флуоресценцию.

Принцип:

Предыдущий метод:
Иммуноокрашивание не позволяет отличить восстановленную и окисленную форму глутатиона.

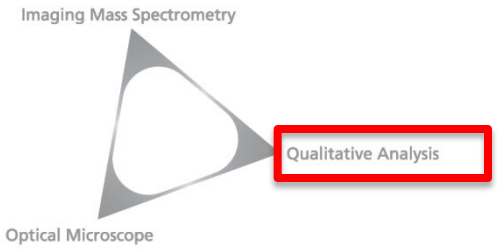
iMScope:
Распределение восстановленной и окисленной форм глутатиона можно визуализировать.

Пригоден для исследований рака (в том числе патологических) или при разработке и оценке противоопухолевых препаратов

Kubo *et al.*, Anal. And Bioanal. Chem 2011

iMScope *TRIO*

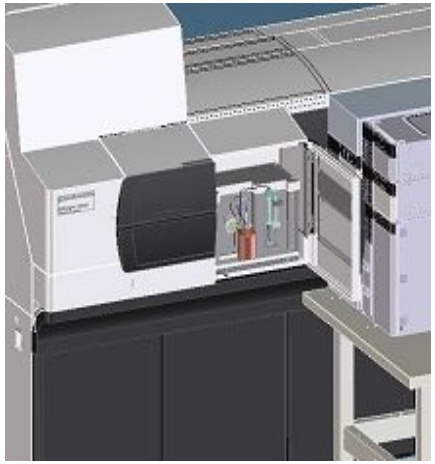
Качественный и количественный анализ



Новая функция iMScope *TRIO:*

Возможность ионизации электроспреем (ESI) в режиме работы ВЭЖХ-МС

Подключение блока ESI



Working: Door close

Visualizing ESI condition on PC

■ **Переключение между режимами ESI и MALDI**

□ Увеличение чувствительности и точности структурного анализа за счет MC^n ($n \leqq 10$) и предварительной сепарации при помощи ВЭЖХ

SHIMADZU

Приложение (Высокое пространственное разрешение)

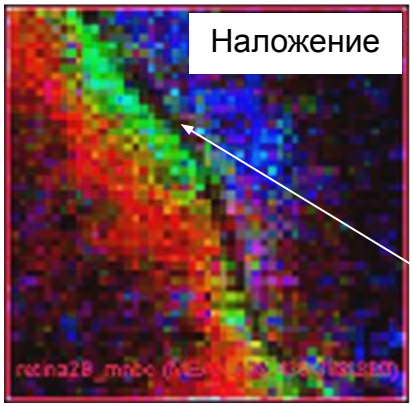
Моделирование пространственного разрешения, позволяющего визуализировать пигментный слой сетчатки

Для визуализации пигментного слоя сетчатки требуется пространственное разрешение в 10 мкм или лучше.

ОМ фотография сетчатки

Эпителий пигментного слоя сетчатки (макс. ширина 10 мкм)

Pixels: 50 × 50
Spatial resolution: 10 μm
Measurement time: About 7 min



Черный: Эпителий пигметного слоя сетчатки
Синий: ФХ (16:0/22:6)
Зеленый: ФХ (18:0/22:6)
Красный: ФХ (16:0/18:1)

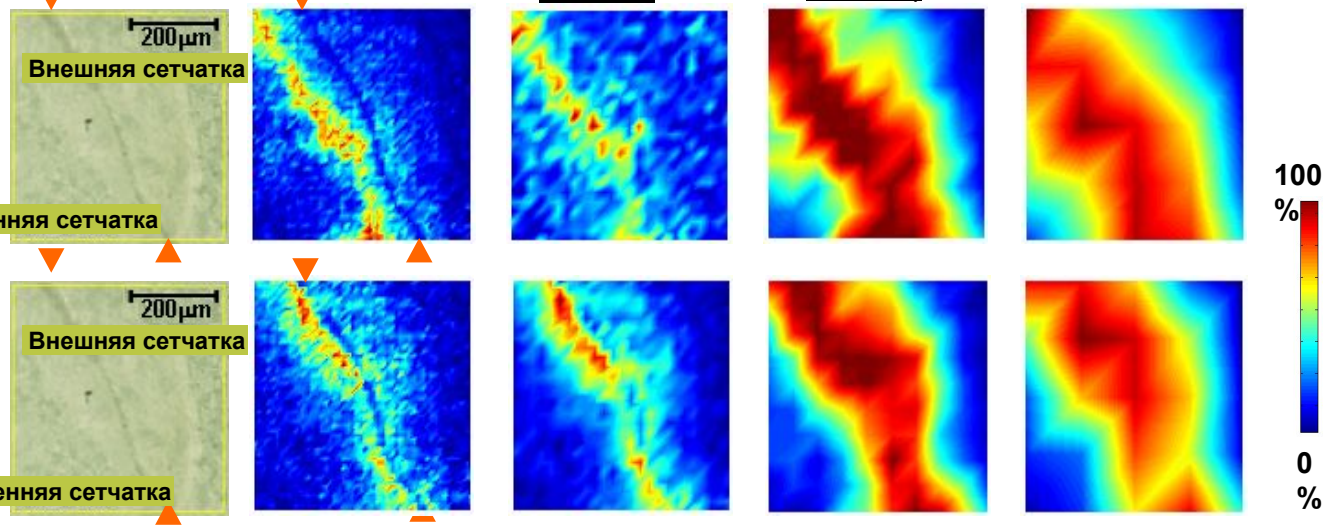
Используется для наблюдения за распределением лекарственных средств в микрообласти или локализованных скоплений метаболитов.

Принцип:
В дополнение к трехслойному распределению ФХ отображается тонкий черный слой эпителия.

Оптическое изображение | **Разрешение: 10 мкм** | **Разрешение: 20 мкм (Пигментный слой нечеткий)** | **Разрешение: 50 мкм (Пигментный слой нечеткий)** | **Разрешение: 100 мкм (Пигментный слой нечеткий)**

***m/z* 798.54**
Липид ФХ (16:0/18:1) + K
Наложенное: Красное

***m/z* 872.61**
Липид ФХ (18:0/22:6) + K
Наложенное: Зеленое

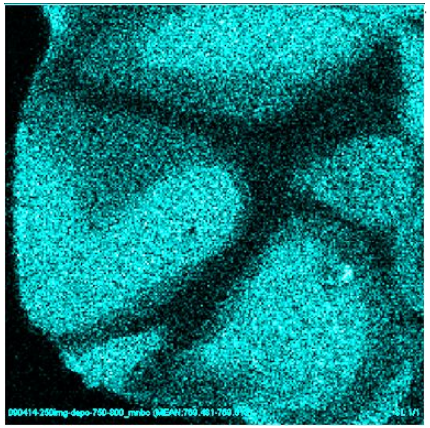


ФХ: фосфатидилхолин

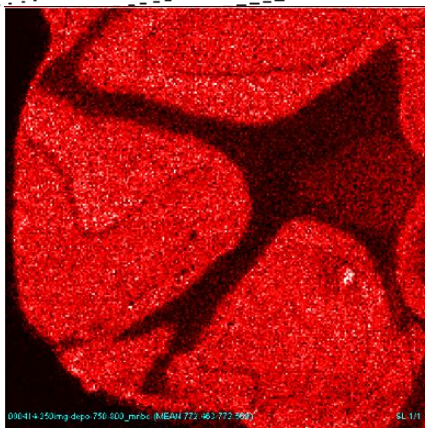
SHIMADZU

Визуализация MALDI: анализ распределения фосфолипидов в сетчатке

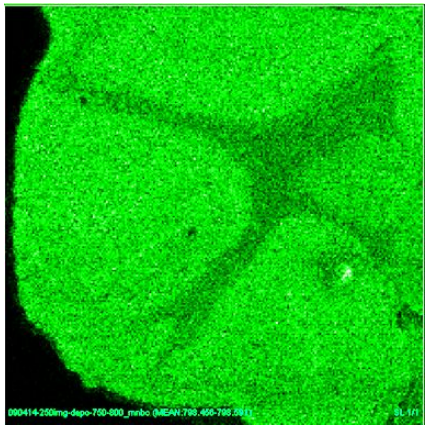
Оптическое изображение



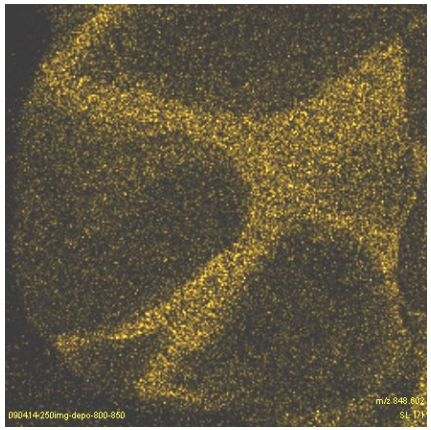
***m/z* 769.5**
Сфингомиелин



***m/z* 772.5**
Фосфатидилхолин



***m/z* 798.5**
Фосфатидилхолин



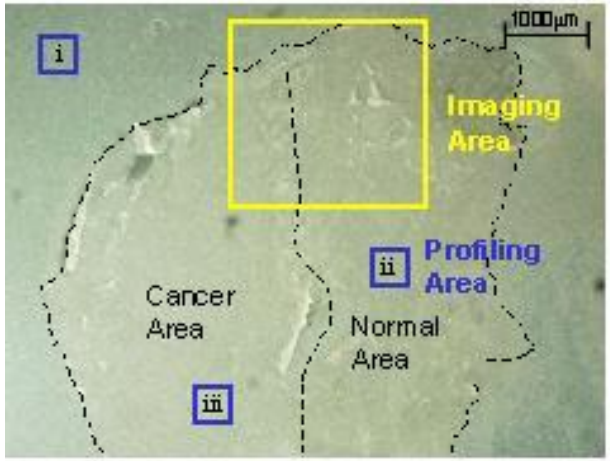
***m/z* 848.6**
Галактозилцерамид

Образец：срез ткани мозга
Матрица：DHB（Sublimation）
Размер пикселя：10 мкм
Размер：250×250

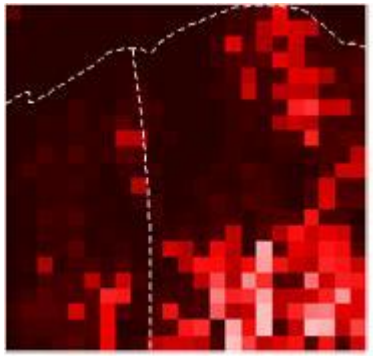
SHIMADZU

Визуализация MALDI: : применение в клинических исследованиях

Образец: срез ткани



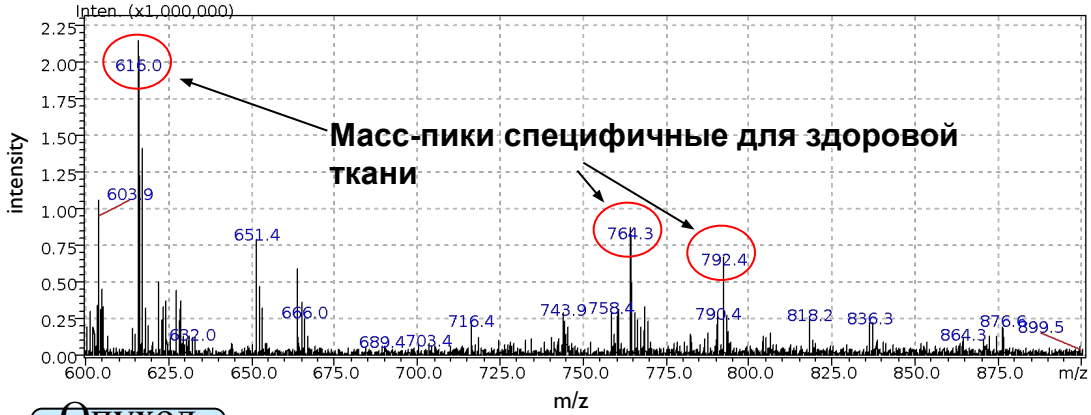
Оптическое изображение



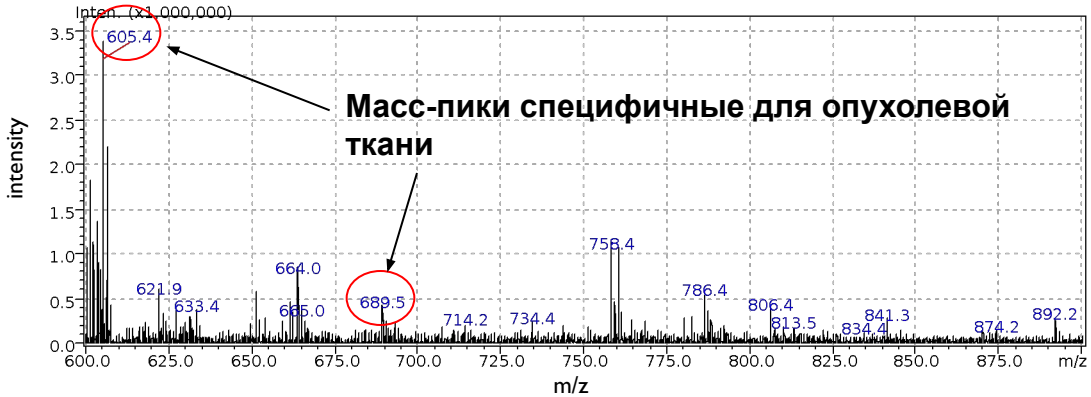
MS изображение, m/z 616

Здоровая ткань

Матрица: CHCA



Опухоль



Масс-спектры каждой области

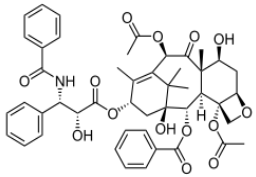
SHIMADZU

Визуализация MALDI: применение в клинических исследованиях

Визуализация воздействия таксола на раковые клетки

15 мин после ввода | **1 час после ввода** | **24 часа после ввода**

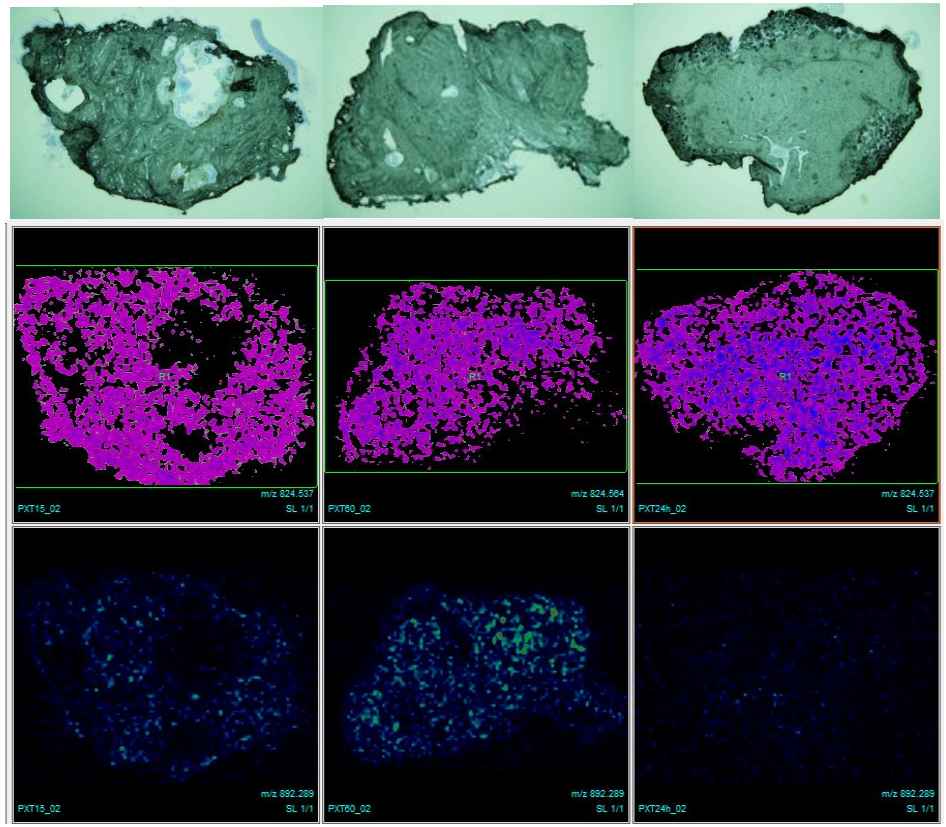
Раковая клетка



Таксол

Контрольный препарат *m/z* 834.56

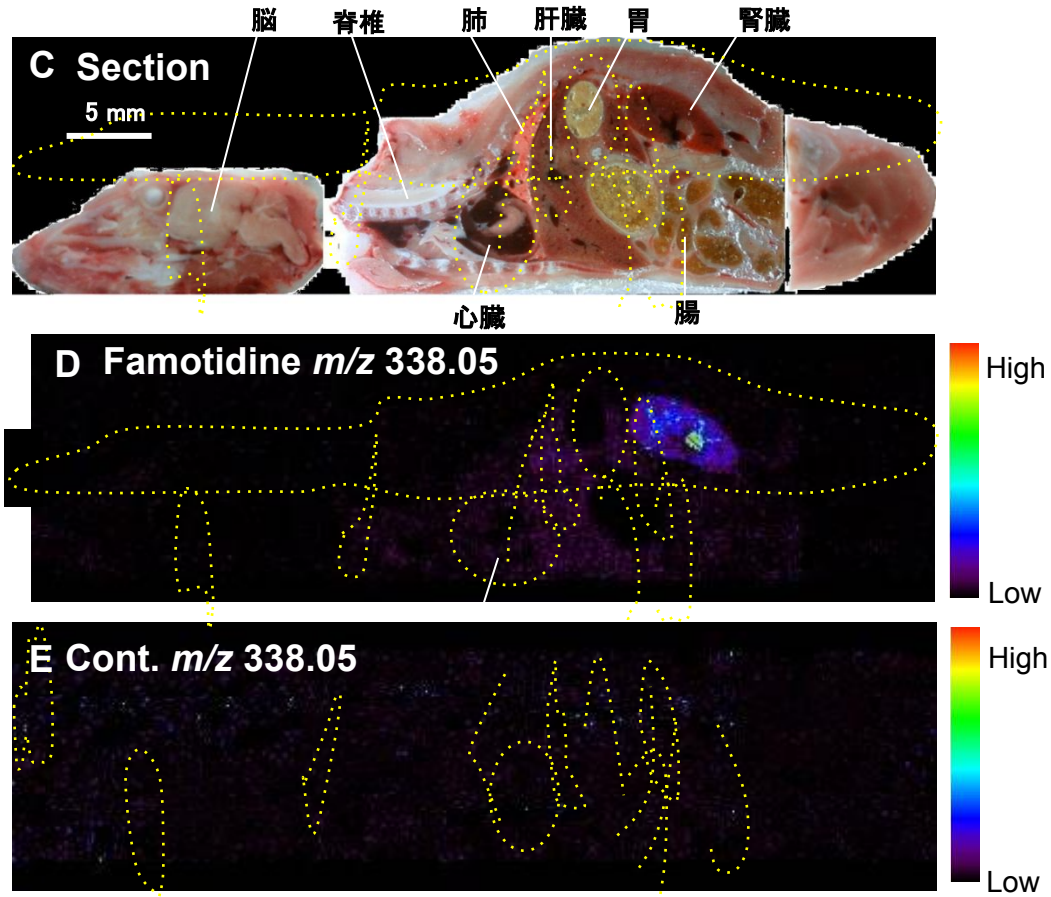
МС изображение Таксола



SHIMADZU

Визуализация MALDI: применение в фармацевтических исследованиях

Фармакокинетика фамотидина



Срез тушки мыши

<u>Условия</u>

Матрица: 50 мг/мл DHB (70% MeOH/0.1% TFA) 1 мл

Срез: 10 мкм

Шаг сканирования: 200 мкм

Прибор: Mass-microscope

Масс-изображение было получено после 30 минут с момента внутривенного введения фамотидина (*m/z* 338.05)

Было обнаружено специфическое накапливание фамотидина в почках

SHIMADZU

Большое спасибо!