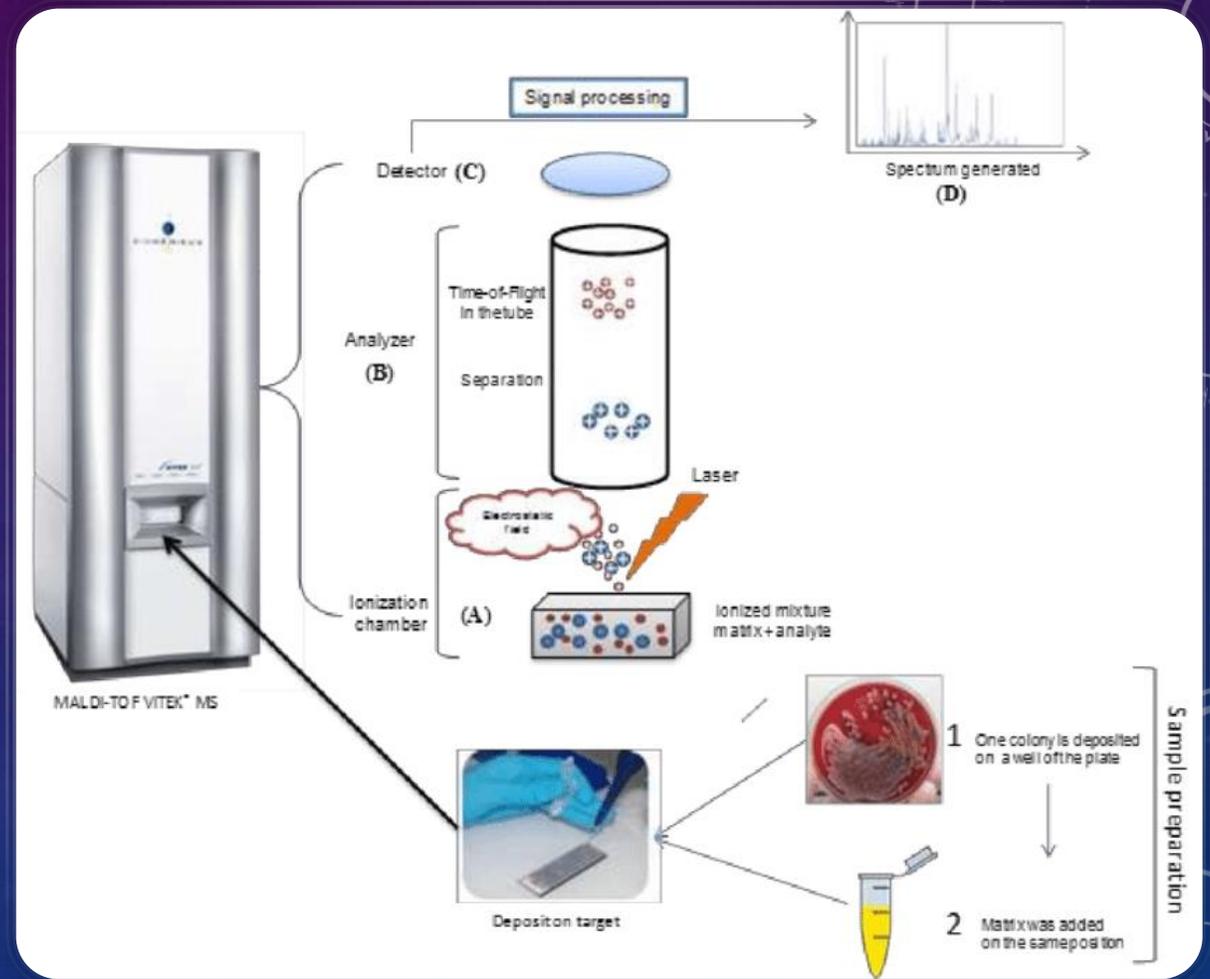


The background features a dark blue gradient with a starry pattern. On the left side, there are several circular diagrams representing mass spectrometry components. One large diagram shows a semi-circular scale with numerical labels from 140 to 260 in increments of 10. Other diagrams include concentric circles with arrows indicating clockwise or counter-clockwise rotation, and dashed lines representing trajectories or paths. The text is centered in the upper right quadrant.

# **MALDI-TOF**

## **PRINCIPI ED APPLICAZIONI**

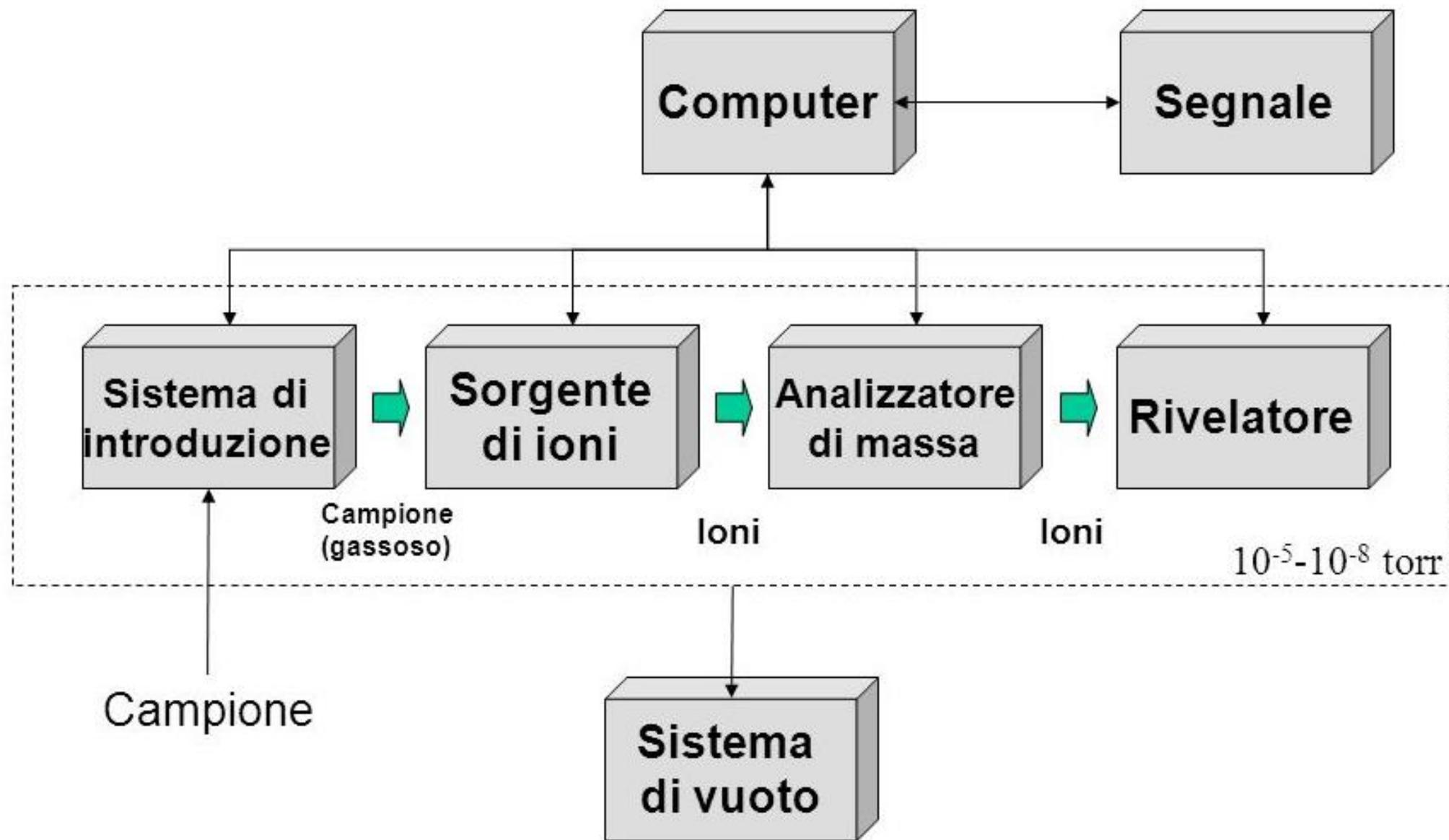
In spettrometria di massa il desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice, comunemente indicato con l'acronimo MALDI (dall'inglese Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), è una tecnica di ionizzazione soft usata in spettrometria di massa a partire dagli anni 1990. La tecnica MALDI è normalmente condotta sotto vuoto (10 mTorr o meno di pressione), ma è possibile anche lavorare a pressione ambiente (AP-MALDI) perdendo però sensibilità e restringendo l'intervallo di rivelabilità.



La tecnica consiste nell'assorbire il campione su una matrice, che può essere realizzata in vari materiali, specialmente organici (glicerolo, acido picolinico, acido succinico, acido caffeico, acido sinapico ecc.), e una volta portata in soluzione viene successivamente bombardata con un fascio laser (spesso un laser ad azoto). La matrice deve possedere determinate caratteristiche chimico-fisiche, tra le quali: deve essere facilmente evaporabile ma tale evaporazione non deve essere significativa durante la preparazione del campione o prima dell'effettuazione delle misurazioni, deve avere un certo carattere acido in modo da fungere da fonte di protoni incoraggiando la ionizzazione dell'analita, possedere un forte assorbimento ottico nella regione UV tale che le permetta di assorbire la radiazione laser in modo efficiente, deve infine possedere gruppi polari ed essere idrosolubile.



Grazie al fenomeno del desorbimento, il campione viene rilasciato in forma "clusterizzata", ovvero complessato con la matrice. La matrice smorza gli effetti del fascio laser assicurando un'adeguata protezione all'analita che viene ionizzato e vaporizzato tramite l'energia in eccesso ceduta secondariamente dalla matrice stessa. Vengono così ottenuti ioni molecolari generalmente a singola carica, come quelli creati dall'acquisizione o dalla perdita di un protone. Molto spesso la tecnica MALDI viene abbinata a spettrometri dotati di analizzatore a tempo di volo.



# SPETTROMETRO DI MASSA A TEMPO DI VOLO

$$E_p = qU$$

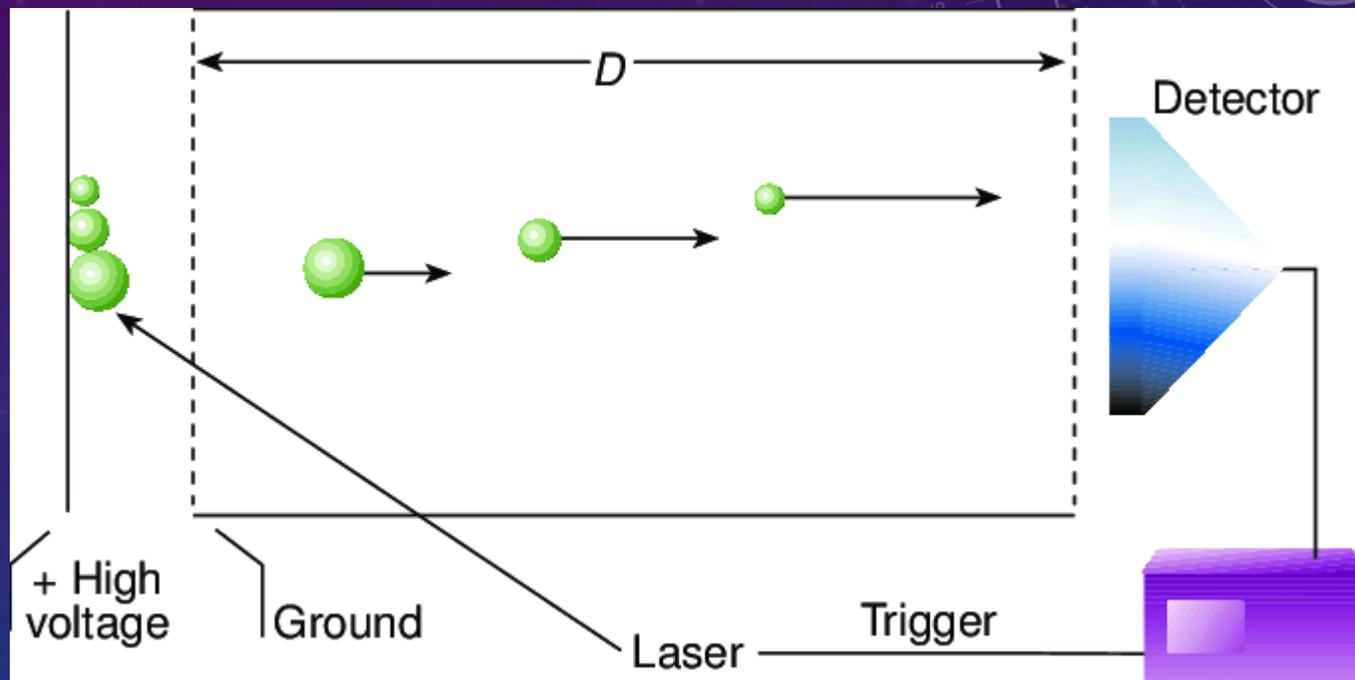
$$E_k = \frac{1}{2}mv^2$$

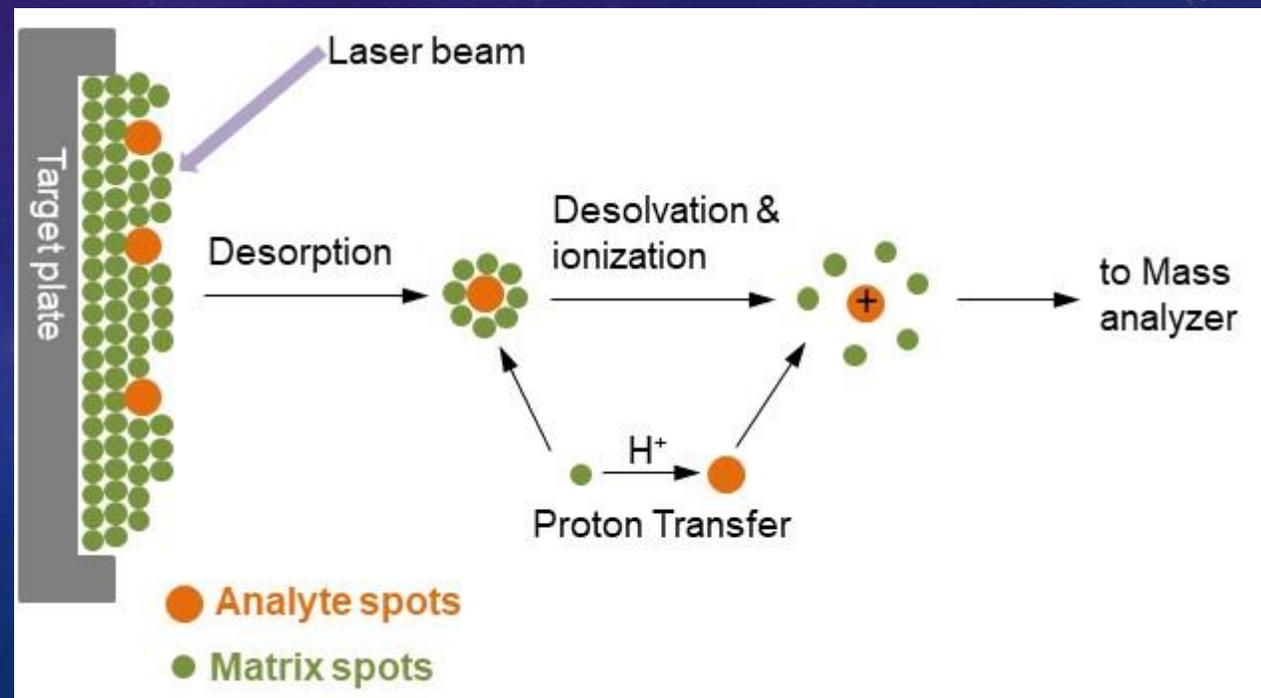
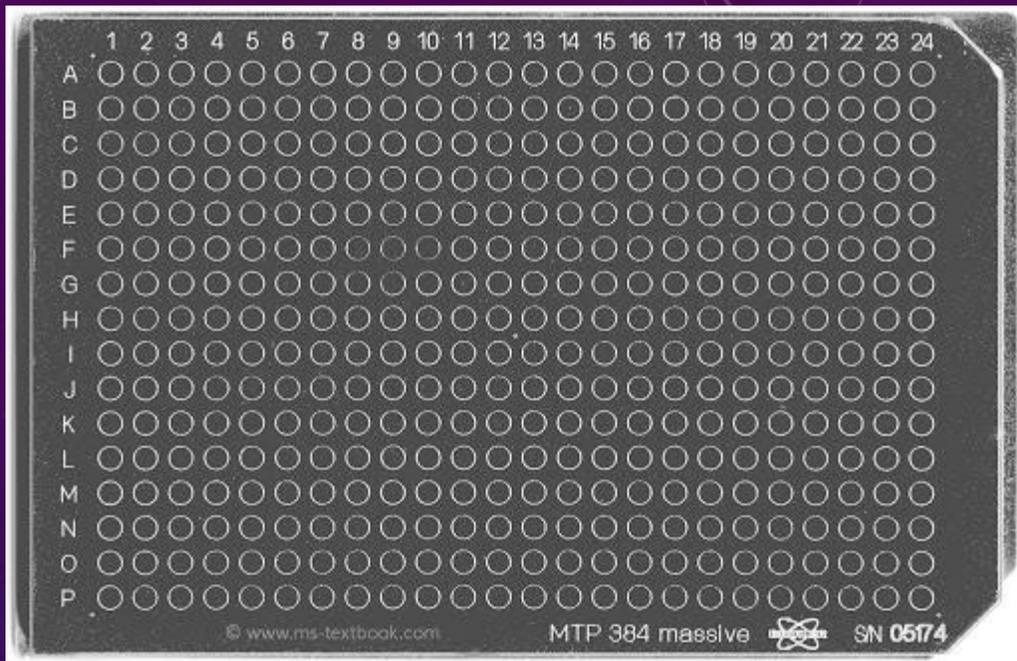
$$E_p = E_k$$

$$qU = \frac{1}{2}mv^2$$

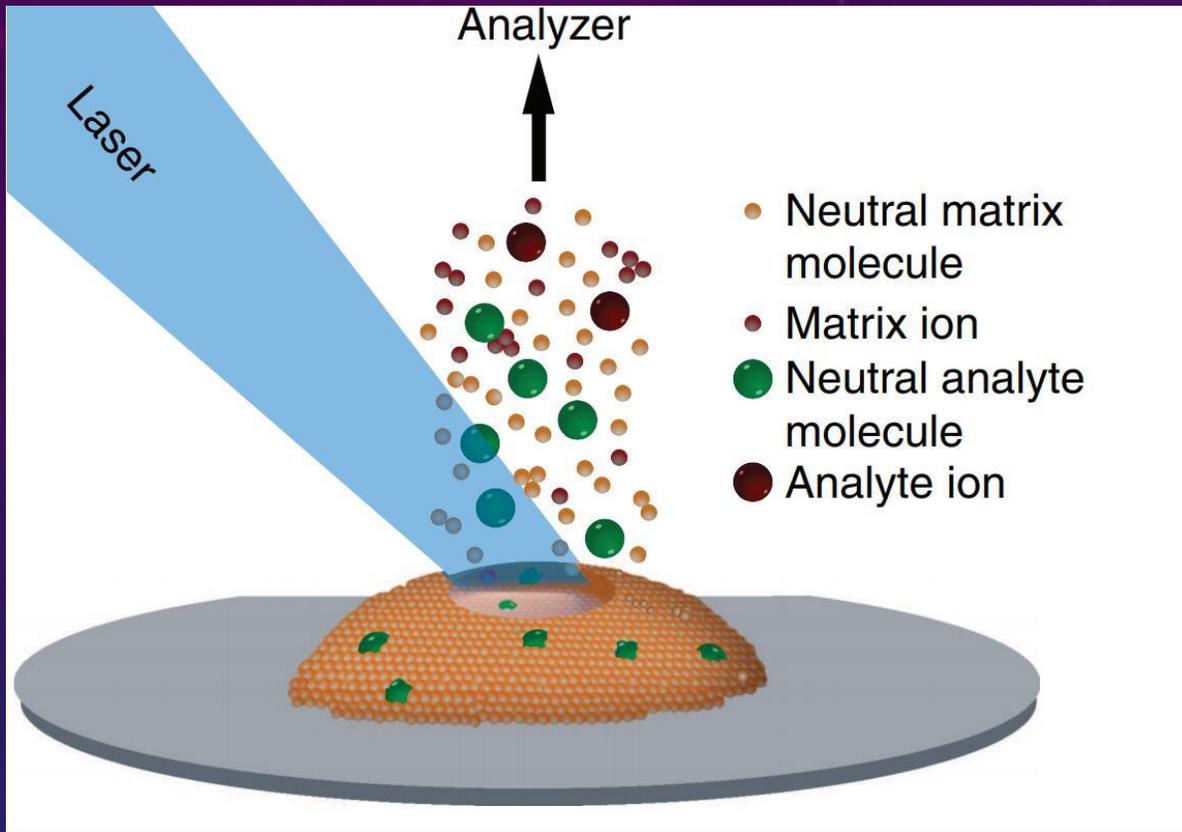
$$v = \frac{d}{t}$$

$$t = k \sqrt{\frac{m}{q}}$$





## DESORBIMENTO LASER



Il trasferimento di energia è dovuto all'assorbimento della luce del laser su un campione solido, andando a colpire su una porzione molto piccola del campione: 0.05-0.2 mm

L'energia viene assorbita dalla matrice e trasferita agli analiti

## TIPOLOGIE DI LASER

Intervallo spettrale	Lunghezza d'onda	Energia dei fotoni	Tipo laser
UV	193 nm	6.4 eV	Laser a eccimeri ArF
UV	248 nm	5.0 eV	Laser a eccimeri KrF
UV	266 nm	4.7 eV	Laser a Nd:YAG QIF
UV	308 nm	3.8 eV	Laser a eccimeri di XeCl
UV	337 nm	3.7 eV	Laser ad azoto
UV	355 nm	3.5 eV	Laser a Nd:YAG TIF
IR	1.06 $\mu\text{m}$	1.2 eV	Laser a Nd:YAG
IR	2.94 $\mu\text{m}$	0.4 eV	Laser a Er:YAG
IR	1.7-2.5 $\mu\text{m}$	0.7-0.5 eV	Laser OPO
IR	10.6 $\mu\text{m}$	0.1 eV	Laser a CO2

## MATRICI MALDI

Devono formare solidi cristallini con un bassa pressione di vapore in modo da non sublimare all'interno della sorgente MALDI

### MATRICI IR

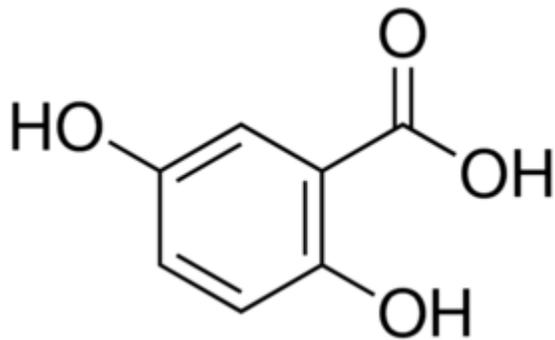
- Devono contenere gruppi OH o NH per assorbire a  $3\ \mu\text{m}$  tramite vibrazioni di stretching
- Oppure contenere un gruppo CO o NH che assorbono rispettivamente tramite vibrazioni di stretching e bi bending a  $10\ \mu\text{m}$

### MATRICI UV

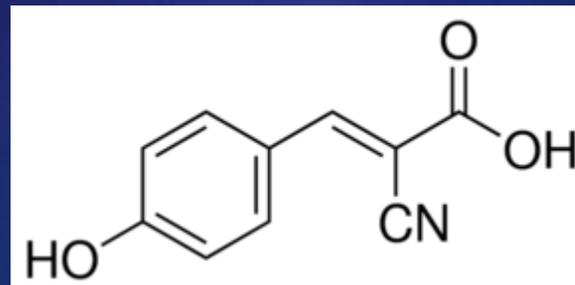
- Devono contenere gruppi cromofori che assorbono alla lunghezza d'onda del laser

## TIPOLOGIE DI MATRICE

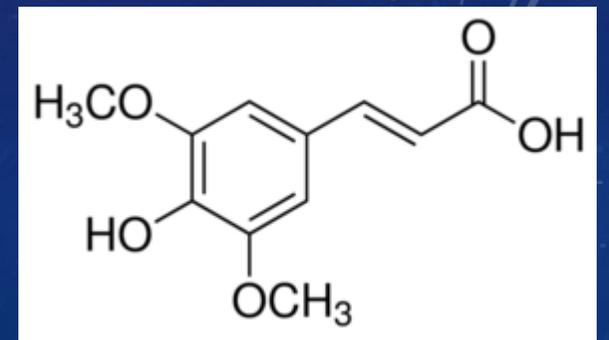
Composto	Nome alternativo	Solvente	Lunghezza d'onda	Applications
Acido 2,5-dihydroxybenzoico	DHB	Acetonitrile, acqua, metanolo, acetone, cloroformio	337, 355, 266	Peptidi, nucleotidi, oligonucleotidi, oligosaccaridi
Acido Sinapico	SA	Acetonitrile, acqua, acetone, cloroformio	337, 355, 266	Peptidi, proteine, lipidi
Acido Ferulico	FA	Acetonitrile, acqua, propanolo	337, 355, 266	Proteine
Acido $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico	CHCA	Acetonitrile, acqua, etanolo, acetone	337, 355	Peptide, lipidi, nucleotidi
Acido pinolinico	PA	Etanolo	266	Oligonucleotidi
Acido 3-idrossipinolinico	HPA	Etanolo	337, 355	Oligonucleotidi



DHB



CHCA



SA

## RESA IONICA E FLUENZA DEL LASER

Fluenza =  $F = E/A$  = energia del laser su un area



10-100 mJ/cm<sup>2</sup>

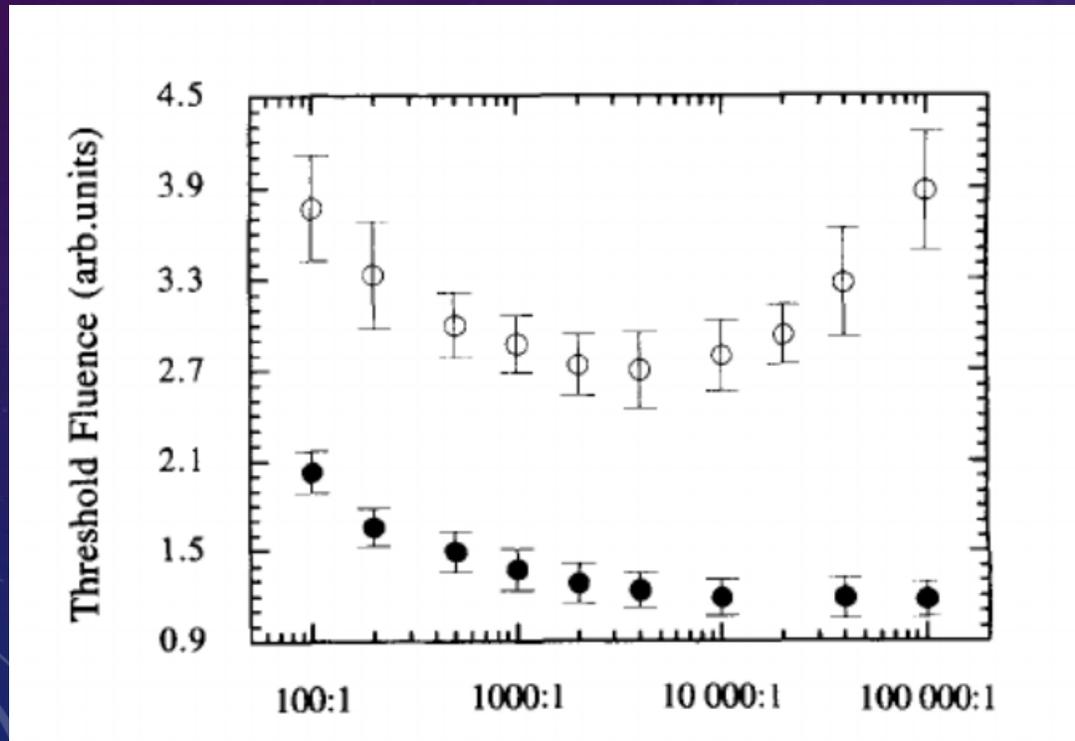
Irradianza =  $I = F/A$  = fluenza su area



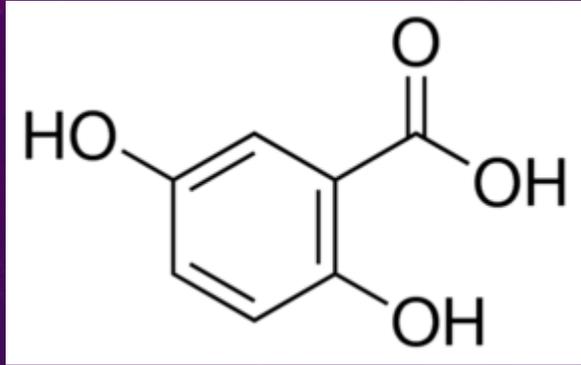
10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> mJ/cm<sup>2</sup>



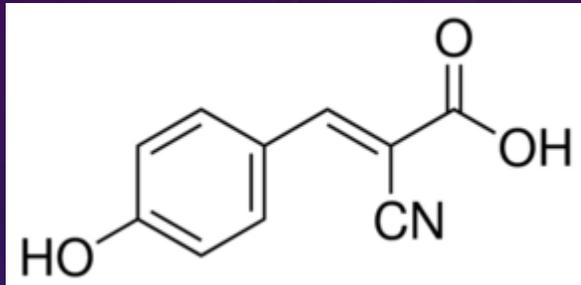
Incomincia la ionizzazione



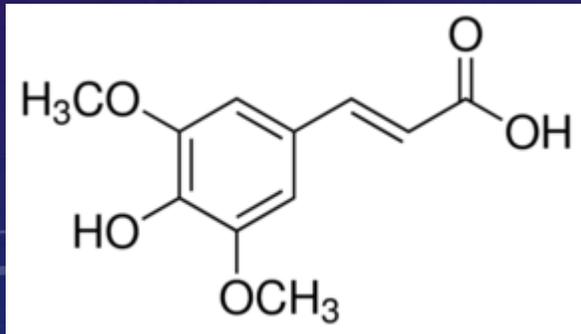
## FORMAZIONE DEGLI IONI



DHB



CHCA



SA

### **Protonazione influenzata dal pH**

La ionizzazione in MALDI necessita dell'incorporazione degli analiti nei cristalli prodotti nella matrice in forma pre-protonata, anche se la protonazione di piccole molecole può avvenire anche in fase gassosa dopo il desorbimento.

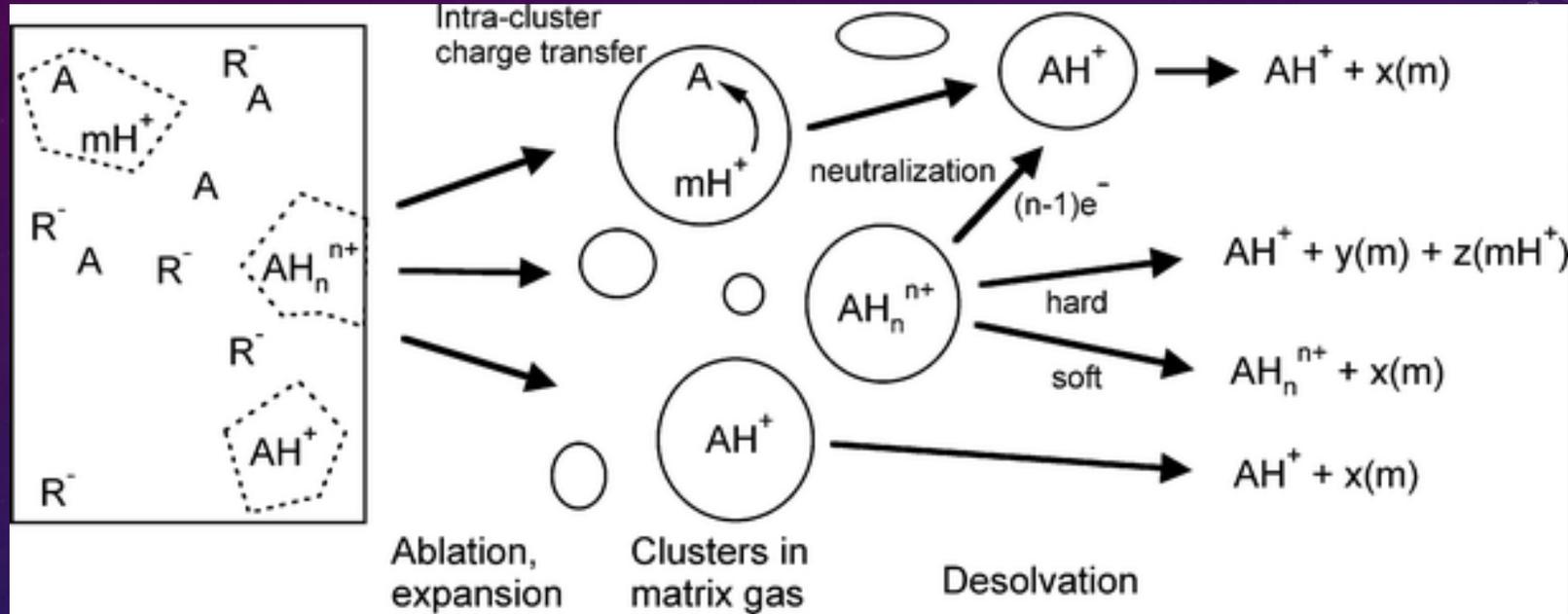
### **Ionizzazione per trasferimento di carica**

Ci sono anche composti che non riescono a ricevere l'H<sup>+</sup> dai gruppi carbossilici (analiti leggermente basici) e la cationizzazione può avvenire anche per trasferimento protonico dovuto all'eccitazione conseguente al laser

### **Ionizzazione per assorbimento**

Si possono avere quando gli analiti stessi assorbono alla lunghezza d'onda del laser ovvero di creano ioni radicali come M<sup>o+</sup> oppure M<sup>o-</sup>

# FENOMENO LUCKY SURVIVOR



Durante il desorbimento gli ioni tendono a neutralizzarsi



Più cariche avrà la molecola più velocemente questa tenderà a neutralizzarci



Le molecole monocariche tenderanno a neutralizzarsi più lentamente

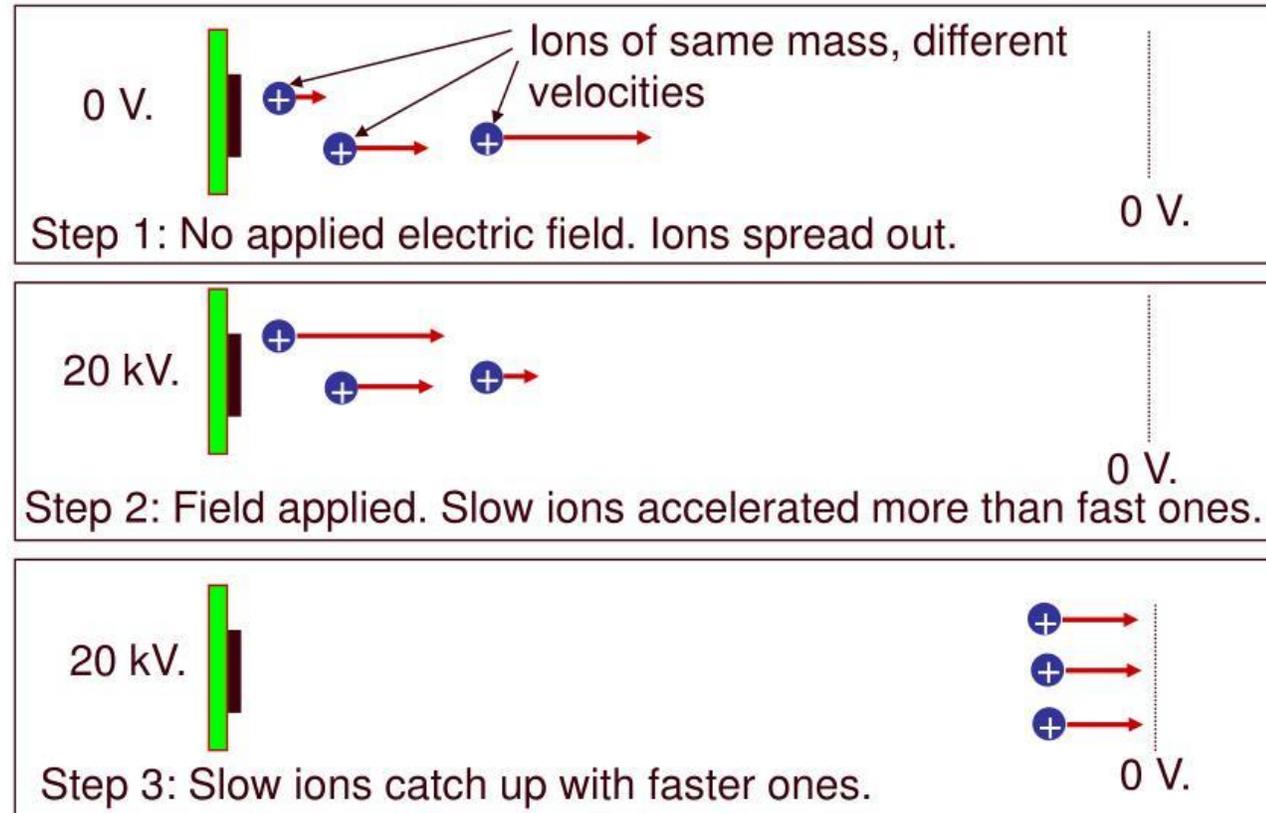


ABBONDANZA DI IONI MONOCARICATI

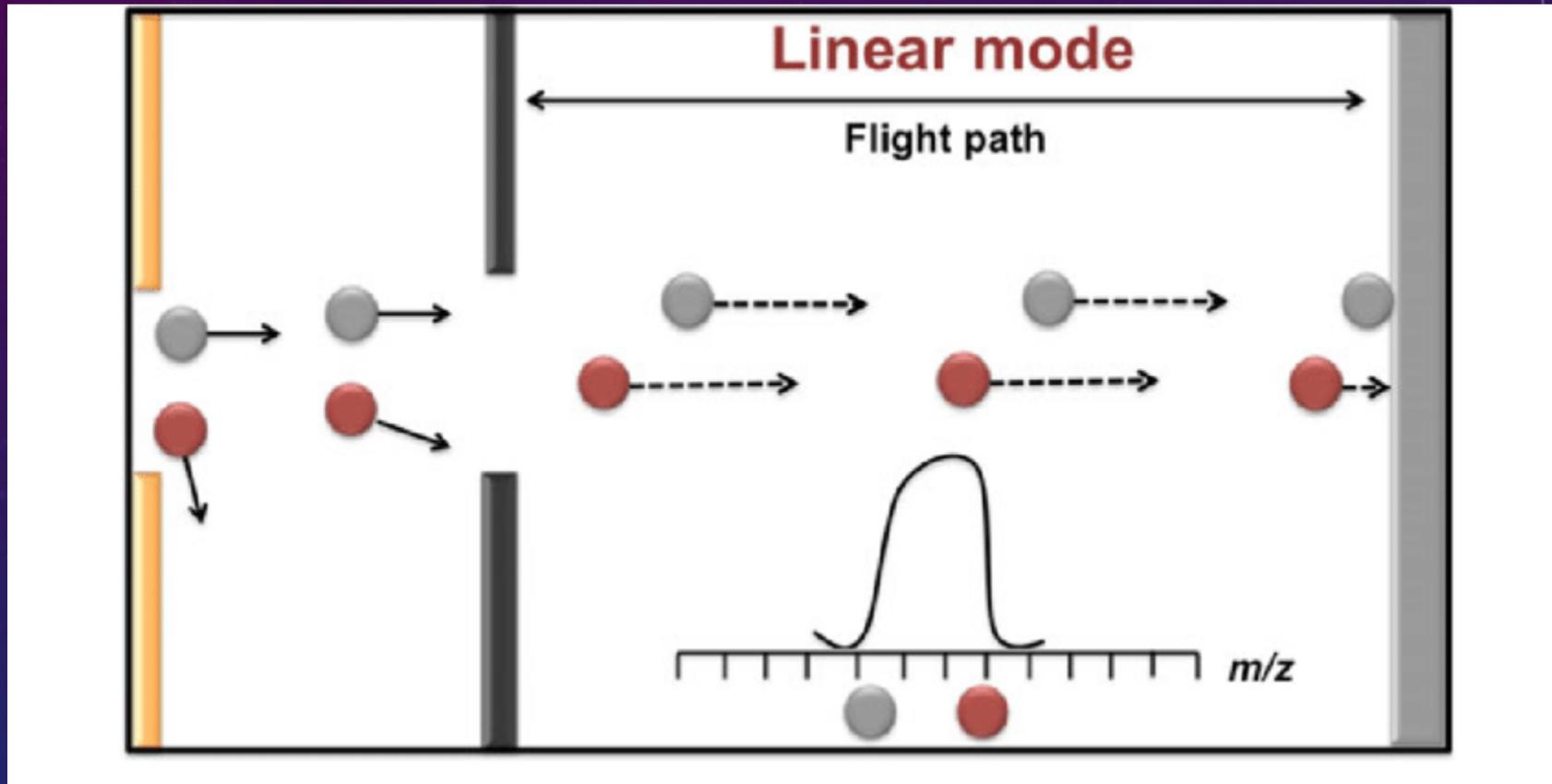


## DELAYED EXTRACTION

### *Delayed Extraction (DE) improves performance*



# MODALITA' DI ACQUISIZIONE: LINEAR



METHODS MANUSCRIPT

## MALDI-TOF MS protein fingerprinting of mixed samples

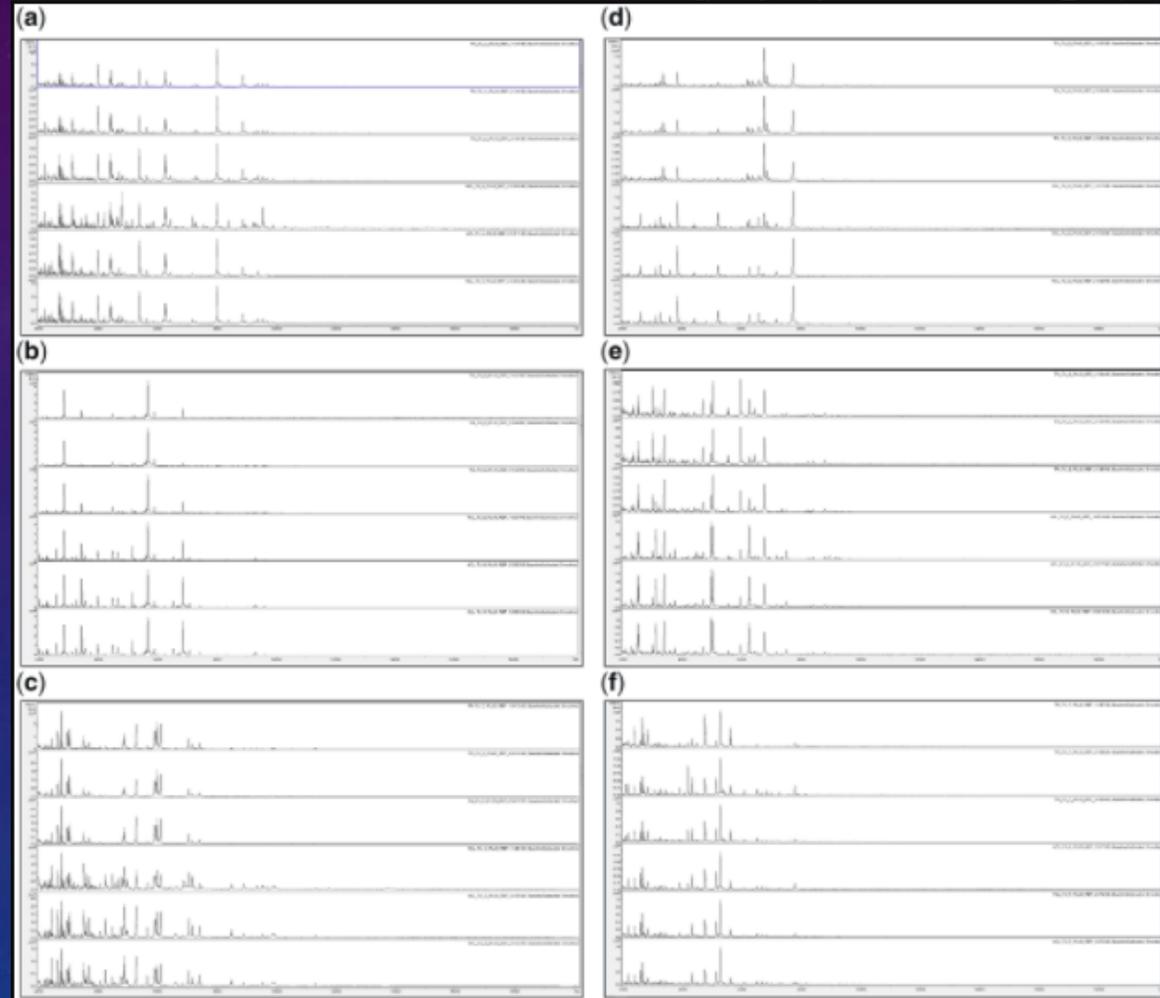
Michael A. Reeve\* and Denise Bachmann

Department of Bioscience, CABI Bioscience, Bakeham Lane, Egham, Surrey TW20 9TY, UK

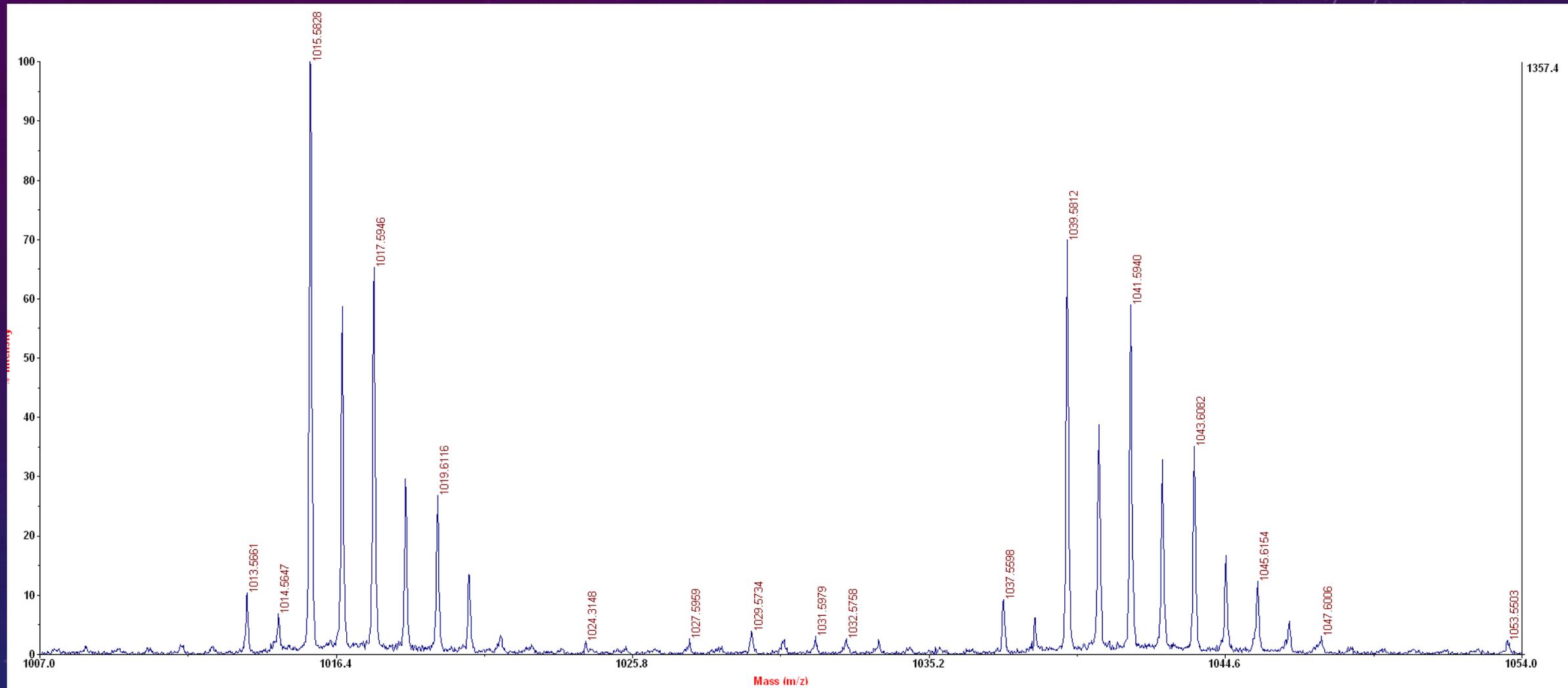
\*Correspondence address. Department of Bioscience, CABI Bioscience, Bakeham Lane, Egham, Surrey TW20 9TY, UK. Tel: +44 (0)1491-829033; Fax: +44 (0)1491-829100; E-mail: M.Reeve@cabi.org

Matrix: HCCA + TFA 1%

Mode: Linear Positive



# MODALITA' DI ACQUISIZIONE: REFLECTRON

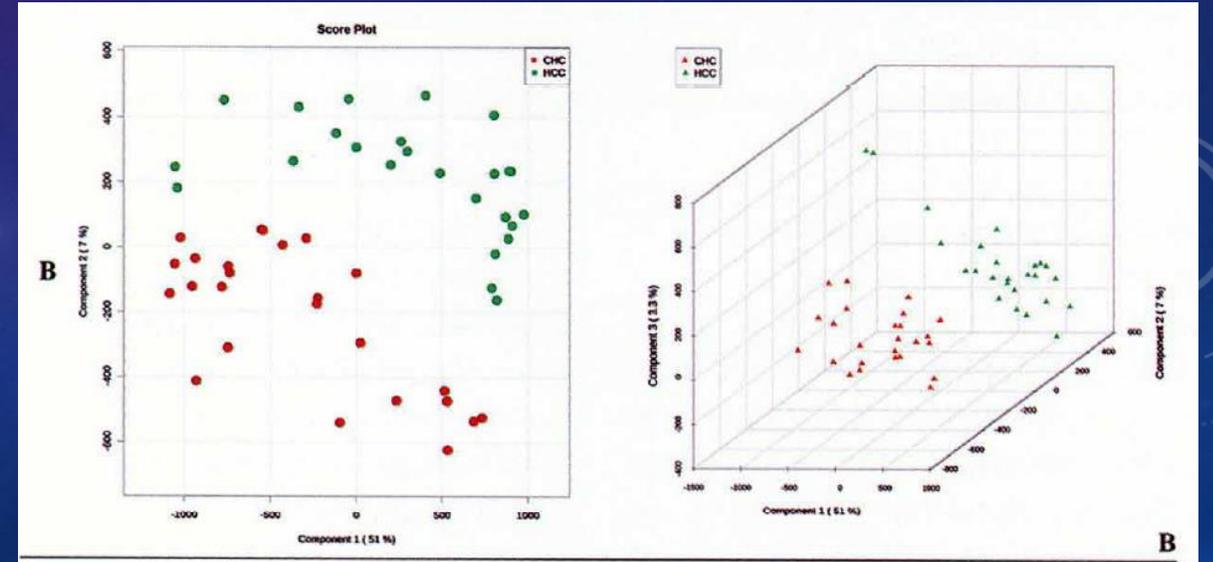
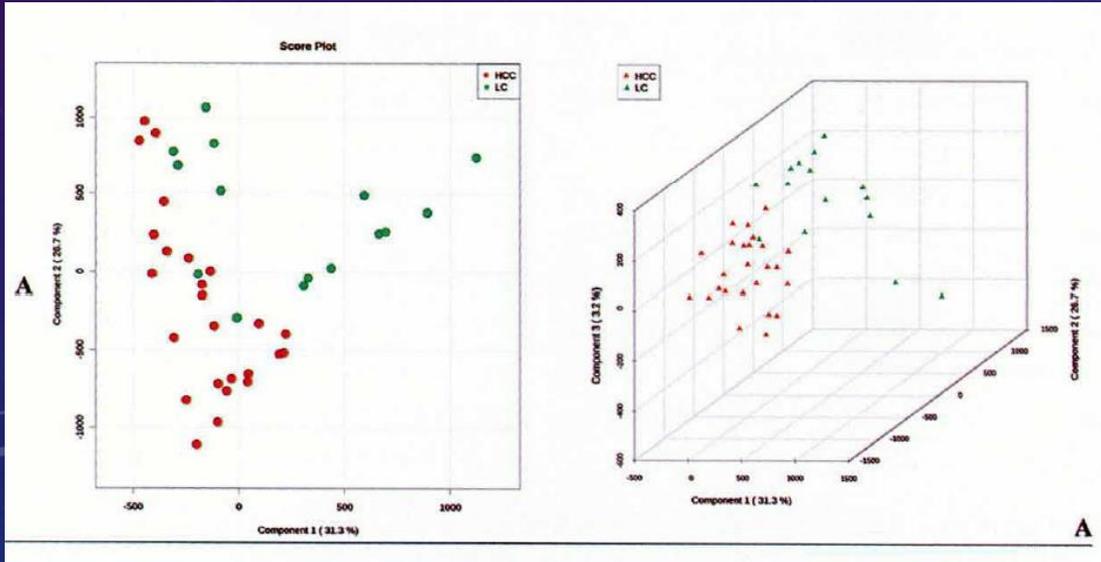
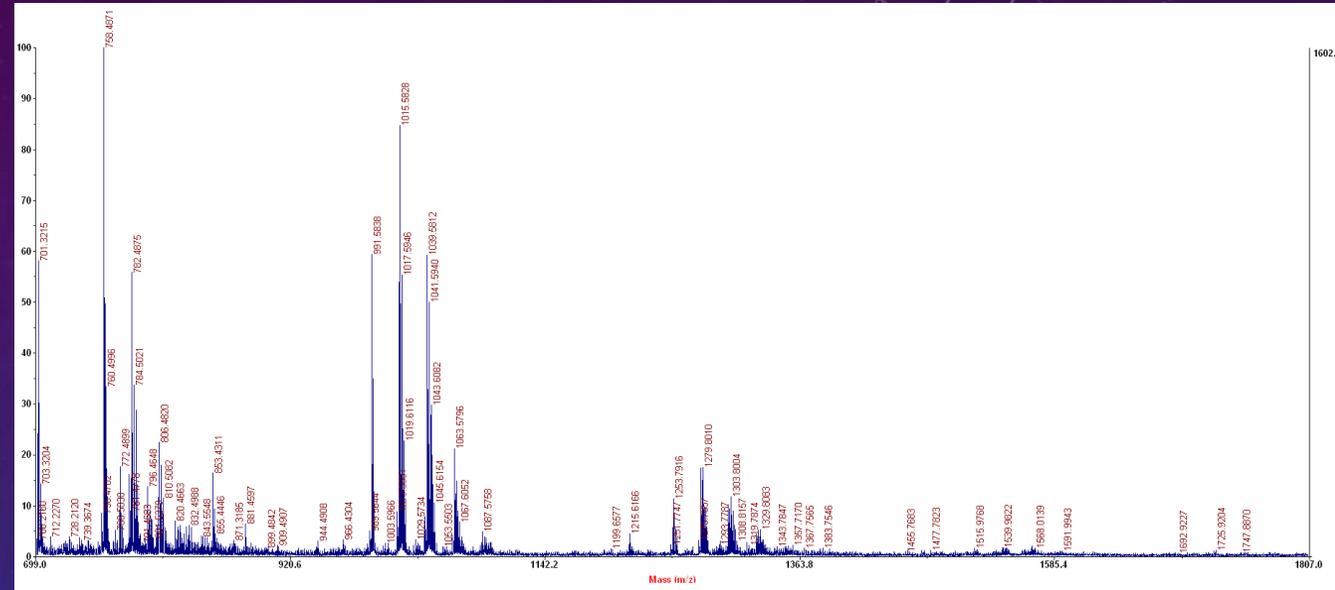


ORIGINAL PAPER

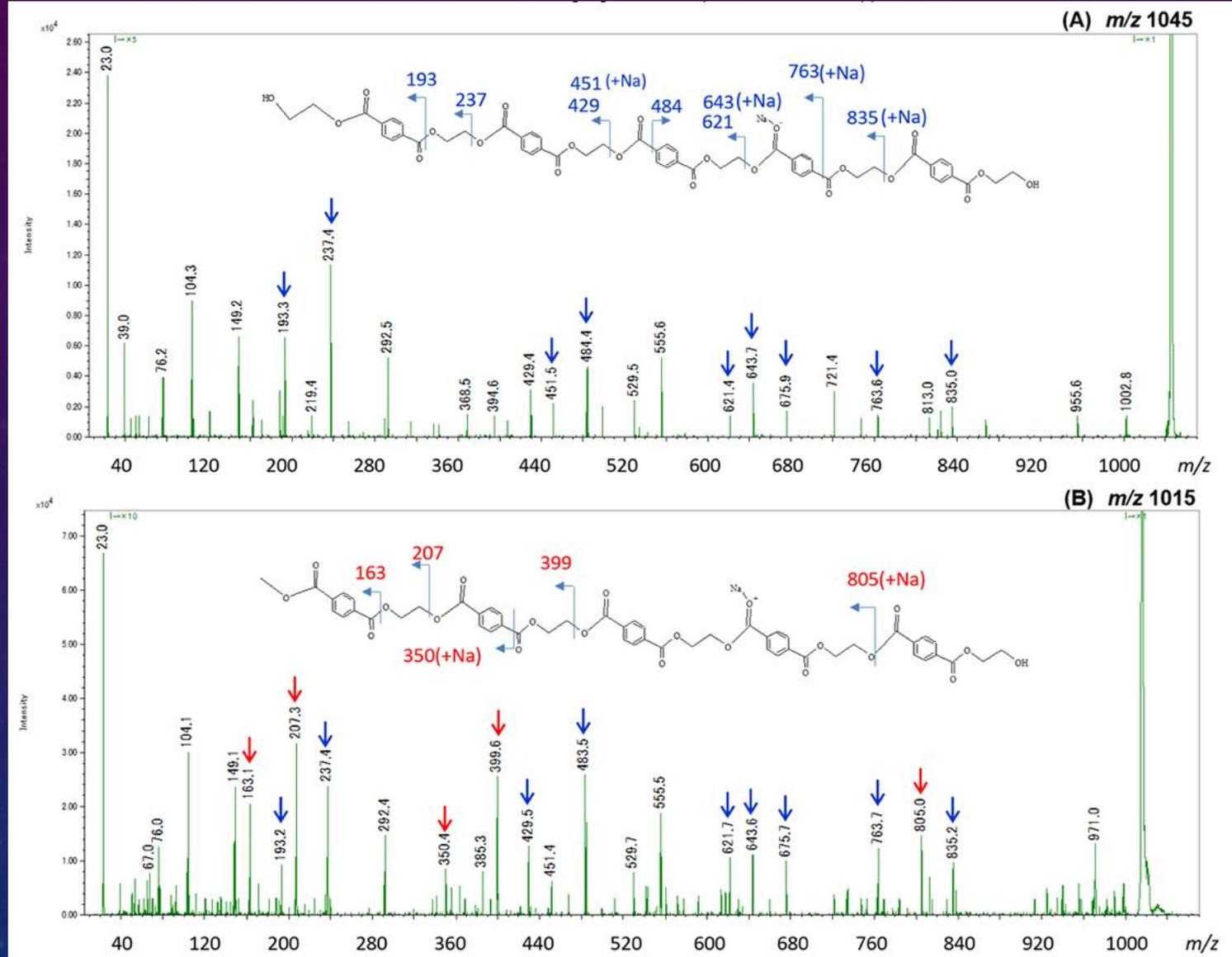
Available from: URL: <http://www.jgld.ro/2015/1/10.html>  
DOI: <http://dx.doi.org/10.15403/jgld.2014.1121.pas>

## Plasma Lipidomic Fingerprinting to Distinguish among Hepatitis C-related Hepatocellular Carcinoma, Liver Cirrhosis, and Chronic Hepatitis C using MALDI-TOF Mass Spectrometry: a Pilot Study

Ana Maria Passos-Castilho<sup>1</sup>, Edson Lo Turco<sup>2</sup>, Maria Lúcia Ferraz<sup>3</sup>, Carla Matos<sup>3</sup>, Ivonete Silva<sup>3</sup>, Edison Parise<sup>3</sup>, Eduardo Pilau<sup>4,5</sup>, Fabio Gozzo<sup>4</sup>, Celso Granato<sup>1</sup>



# MODALITA' DI ACQUISIZIONE: MS/MS



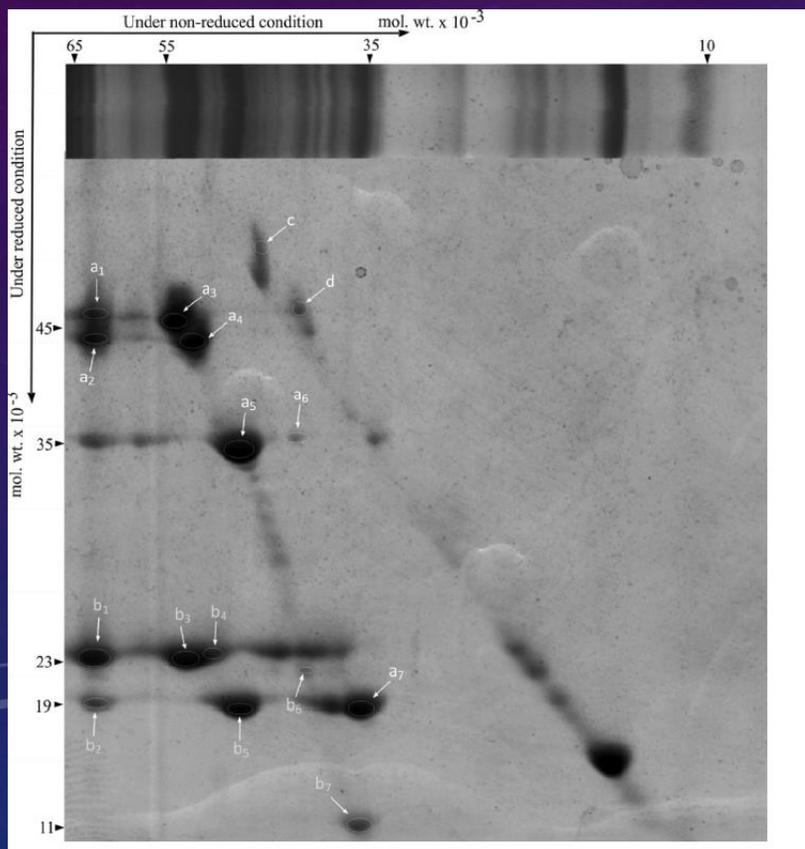
# ANALISI DI PROTEINE CON LA TECNICA MALDI-MS/MS

## Identificazione di proteine

### Proteome Profiling of Seed Storage Proteins Reveals the Nutritional Potential of *Salicornia brachiata* Roxb., an Extreme Halophyte

Bhavanath Jha,\* Nater Pal Singh, and Avinash Mishra

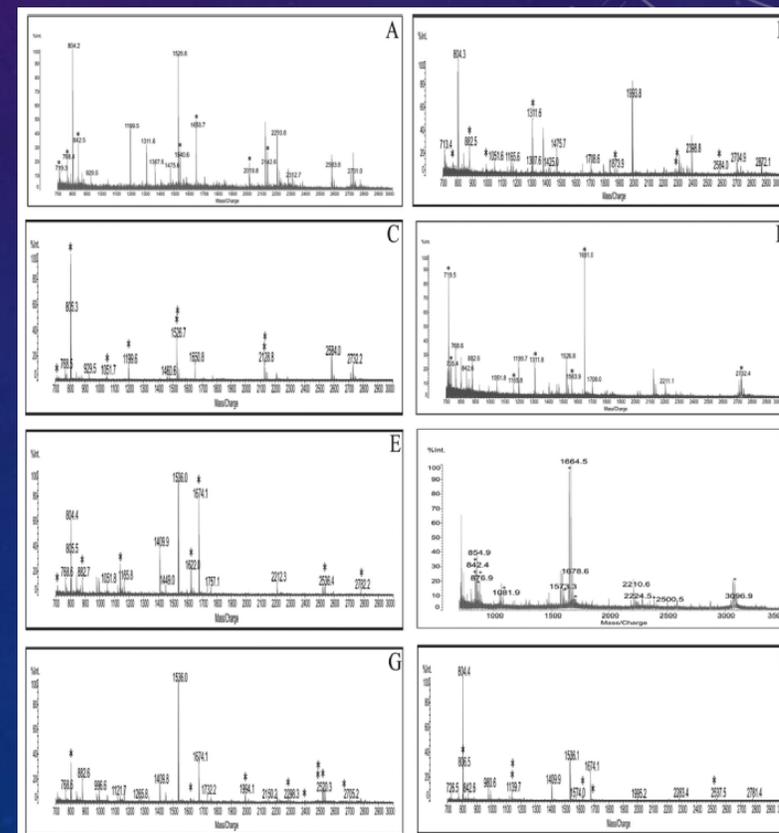
Discipline of Marine Biotechnology and Ecology, CSIR – Central Salt and Marine Chemicals Research Institute, G. B. Marg, Bhavnagar 364002, Gujarat, India



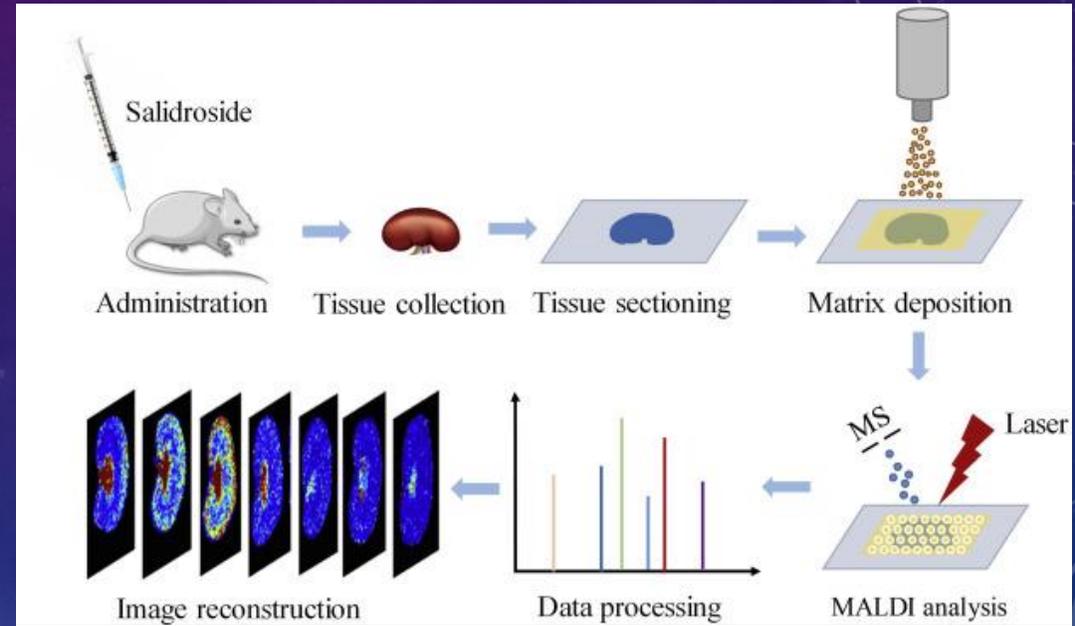
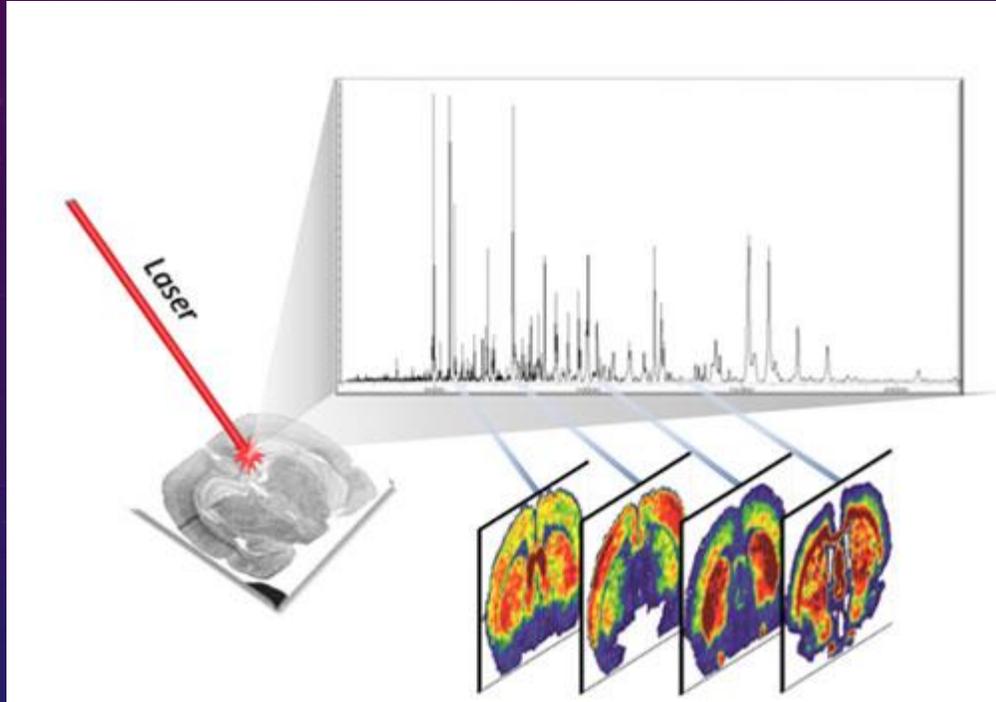
Digestione in tripsina

CHCA + 0.1%TFA

Reflectron positive mode

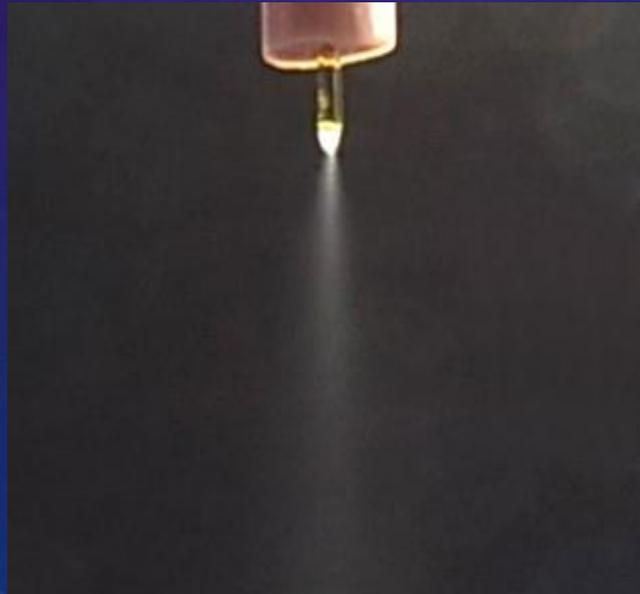
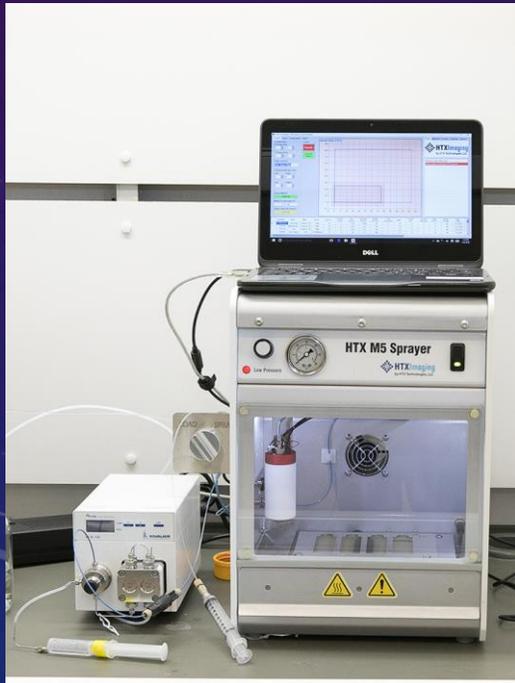


# MALDI IMAGING



# MALDI IMAGING

Taglio preciso  
~ 10  $\mu\text{m}$



Matrice uniforme

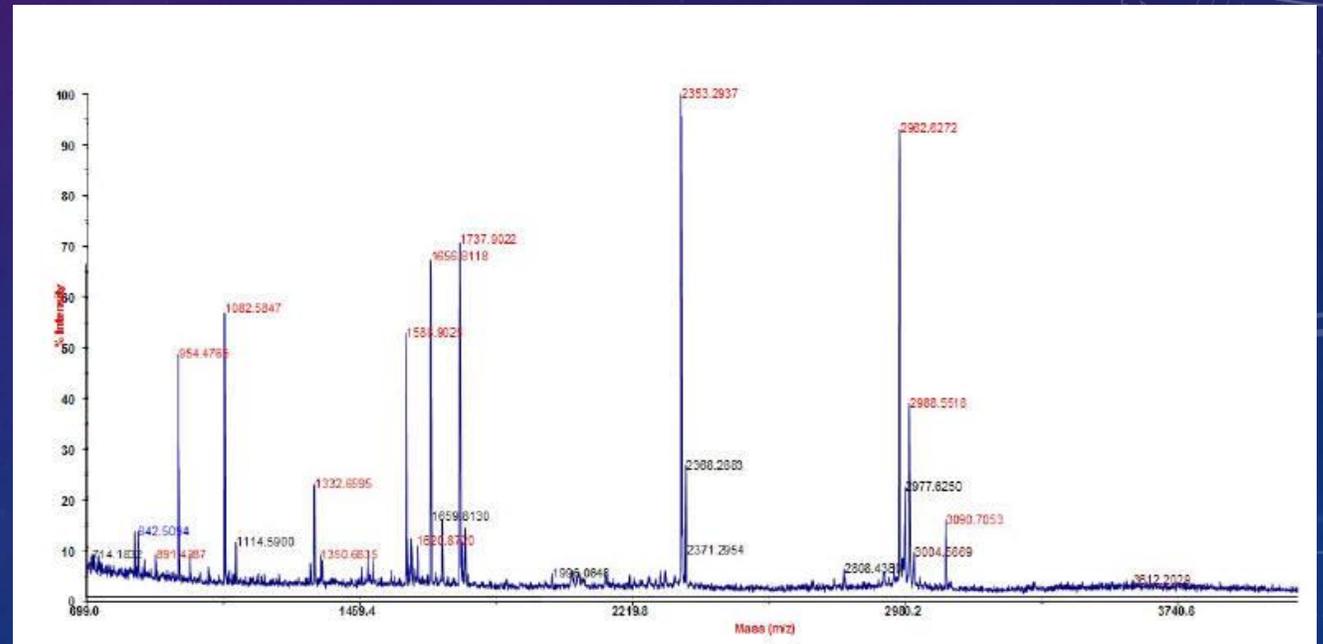
# ANALISI DI PROTEINE CON LA TECNICA MALDI-MS

## Fingerprinting proteico

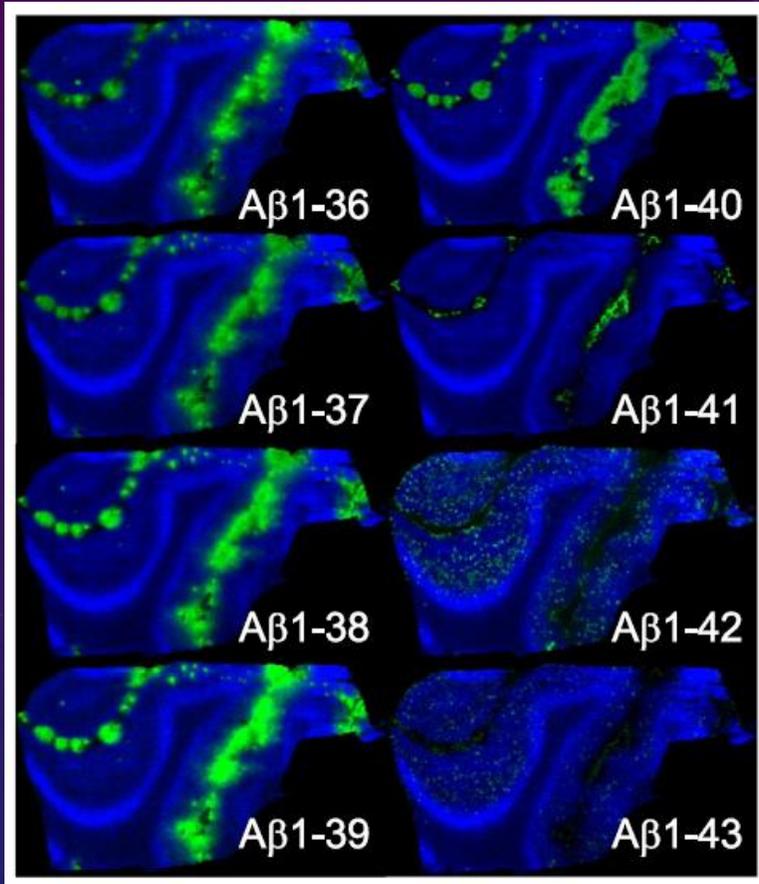
E' la tecnica di analisi MALDI più utilizzata ma anche la più semplice

Le matrici comunemente utilizzate sono DHB e SA

Viene utilizzato il TOF in modalità linear



# ANALISI DI PEPTIDI CON LA TECNICA MALDI-IMAGING



Kakuda et al. *Acta Neuropathologica Communications* (2017) 5:73  
DOI 10.1186/s40478-017-0477-x

Acta Neuropathologica  
Communications

RESEARCH

Open Access



## Distinct deposition of amyloid- $\beta$ species in brains with Alzheimer's disease pathology visualized with MALDI imaging mass spectrometry

Nobuto Kakuda<sup>1†</sup>, Tomohiro Miyasaka<sup>2†</sup>, Noriyuki Iwasaki<sup>3</sup>, Takashi Nirasawa<sup>3</sup>, Satoko Wada-Kakuda<sup>2</sup>, Junko Takahashi-Fujigasaki<sup>4</sup>, Shigeo Murayama<sup>4</sup>, Yasuo Ihara<sup>5</sup> and Masaya Ikegawa<sup>1\*</sup>

