

【技術分類】 2-1-1-1 質量分析全般技術／マトリックスの取り扱い／スポットティング／マトリックスと試料混合

【技術名称】 2-1-1-1-1 Dried Droplet 法

【技術内容】

MALDI-TOF-MS では、試料とマトリックスを混合し、試料の微細な結晶をマトリックスの結晶で取り囲んだ状態のものを測定する。良好なマススペクトルを得るためには、試料とマトリックスの混合結晶ができるだけ均一であることが望ましい。試料とマトリックスの混合結晶の調製法はこれまでに数多くの方法が開発されているが、中でも Dried Droplet 法は最も一般的な方法として用いられている。

まず、タンパク質試料をアセトニトリル (ACN) とトリフルオロ酢酸 (TFA) を含む有機溶媒に溶解する。一方で、マトリックス剤も同様の溶媒に溶解し、タンパク試料溶液とマトリックス溶液を混合する。この混合液をマイクロピペットを用いて 0.5~1.0 μ L とり、試料プレートに気泡が入らないように滴下する。これを乾燥して結晶化させ、測定に用いる。試料溶液とマトリックス溶液を試料プレート上で混合する方法もある。

使用するマトリックスによっては、試料プレートとマイクロピペットが接触した場合、接触点から結晶が析出し始めて不均一な結晶になるので注意を要する。

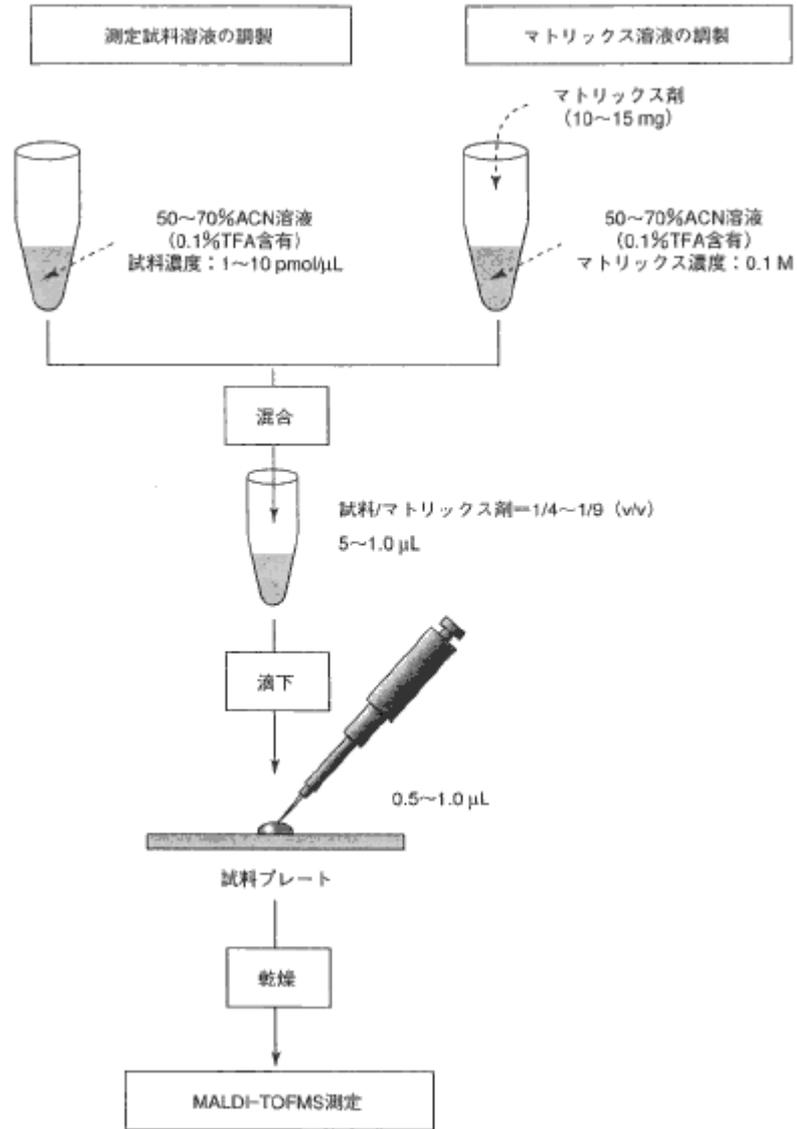
また、乾燥方法も以下のような方法があり、マトリックスや試料によって適当な方法が選ばれる。

- ・ 自然乾燥
- ・ 真空乾燥器を用いる方法
- ・ 濃度が高い有機溶媒を用いて迅速に乾燥させる方法
- ・ 試料プレートを温める方法
- ・ 温風を当てて乾燥させる方法

【応用分野】

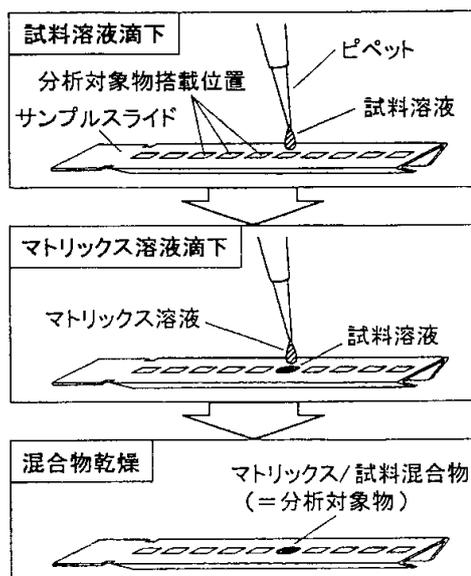
MALDI-TOF-MS 測定で一般的に用いられる。

【図】 Dried Droplet 法による試料の調製法



出典：「生命科学のための最新マスペクトロメトリー」、2002年5月10日、原田健一、田口良、橋本豊編、株式会社講談社発行、25頁 図I-8 試料調製の流れ (dried droplet 法)

【図】 試料プレート上での直接混合



出典：「バイオリジカルマスペクトロメトリー」、現代化学増刊 31、1997 年 4 月 3 日、上野民夫、平山和雄、原田健一編、株式会社東京化学同人発行、47 頁 図 3.28 MALDI 測定用試料の調製法

【出典／参考資料】

- ・ 「生命科学のための最新マスペクトロメトリー」、2002 年 5 月 10 日、原田健一、田口良、橋本豊編、株式会社講談社発行、25 頁
- ・ 「バイオリジカルマスペクトロメトリー」、現代化学増刊 31、1997 年 4 月 3 日、上野民夫、平山和雄、原田健一編、株式会社東京化学同人発行、47 頁

【技術分類】 2-1-1-1 質量分析全般技術／マトリックスの取り扱い／スポットティング／マトリックスと試料混合

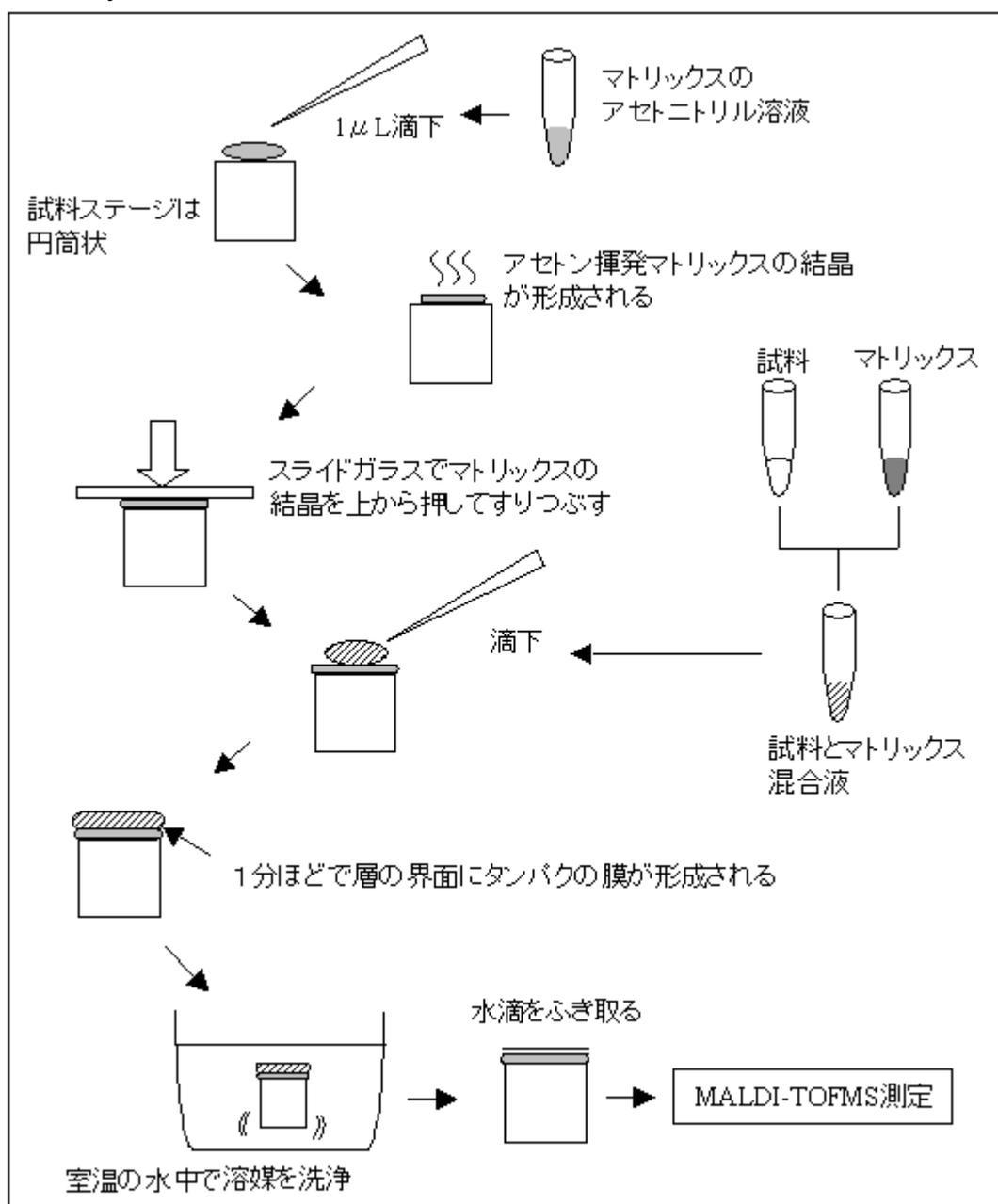
【技術名称】 2-1-1-1-2 Crash Crystal 法

【技術内容】

アセトニトリルなどの有機溶媒に溶解したマトリックスを、円筒状の試料ステージに滴下して風乾しマトリックスの結晶を形成させる。試料ステージにスライドガラスを乗せて上から弾力性のあるもの（たとえば鉛筆についている消しゴムなど）で押して結晶をすりつぶす。その後、マトリックスと試料を有機溶媒に溶解した混合液を滴下し室温で静置すると、すりつぶした結晶と試料混合液の界面にペプチドを含んだ膜が形成される。膜が形成されたら室温の水中で有機溶媒を洗い落とし、水滴をふき取った後、測定に用いる。

Dried Droplet 法にくらべ、より均一な試料表面を形成することが可能な方法である。

【図】 Crash Crystal 法の概略図



出典：本標準技術集のために作成

【出典／参考資料】

- 「生命科学のための最新マスペクトロメトリー」、2002年5月10日、原田健一、田口良、橋本豊編、株式会社講談社発行、27頁
- "A method to increase contaminant tolerance in protein matrix-assisted laser desorption/ionization by the fabrication of thin protein-doped polycrystalline films", Rapid Communications in MASS Spectrometry, Volume 8, Issue 2, February 1994, Fan Xiang, Ronald C. Beavis, Werner Ens

【技術分類】 2-1-1-2 質量分析全般技術／マトリックスの取り扱い／スポットティング／マトリックス膜形成

【技術名称】 2-1-1-2-1 薄膜法 (Thin Layer 法)

【技術内容】

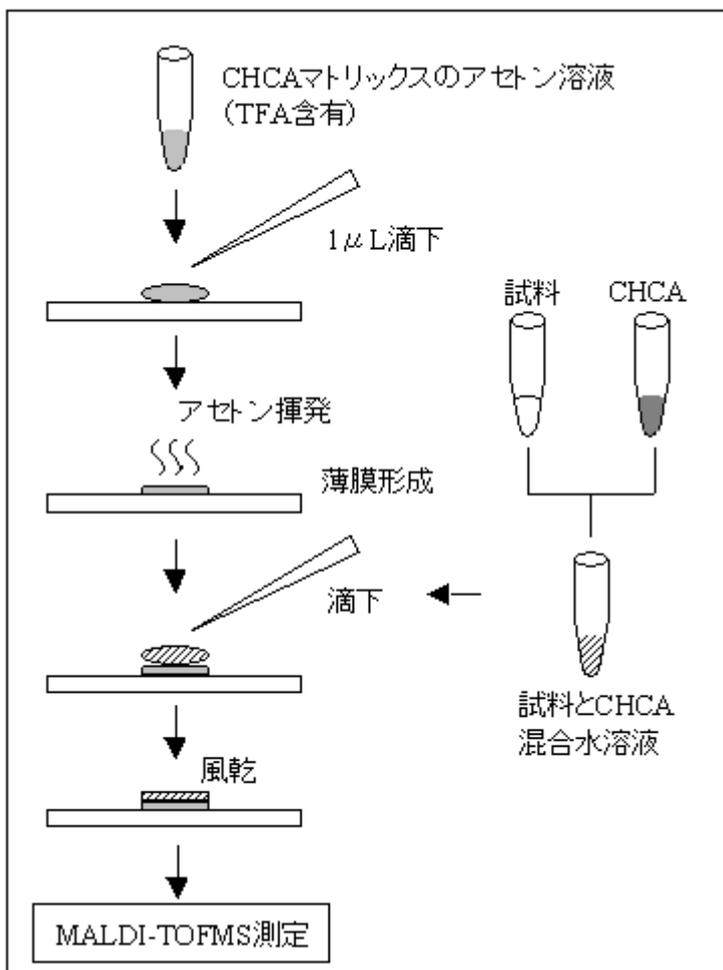
α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸 (CHCA) マトリックス (CHCA については2-1-2-1-1 も参照) をアセトン溶液に溶解し、試料プレートに滴下する。試料プレート上でアセトンが揮発し、CHCA マトリックスの薄膜層が形成される。これとは別に、ペプチド試料と CHCA の混合溶液を調製しておき、CHCA マトリックスの薄膜上に滴下して風乾させ、これを測定に用いる。

Dried Droplet 法では試料を有機溶媒に溶解したが、薄膜法では試料プレートに形成した薄膜層を再び溶解させないように、試料はなるべく水溶液にする。

【応用分野】

この方法は、MALDI-TOF-MS での $0.1\text{pmol}/\mu\text{L}$ 以下のペプチド試料の測定に有効。精製度の高い試料であれば $100\text{amol}/\mu\text{L}$ でも良好なピークが検出可能。

【図】 薄膜法の概略図



出典：本標準技術集のために作成

【出典／参考資料】

- ・ 「生命科学のための最新マスペクトロメトリー」、2002年5月10日、原田健一、田口良、橋本

豊編、株式会社講談社発行、26 頁

- “Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation”, *Anal. Chem.*; 1994; 66(19) , Ole Vorm, Peter Roepstorff, and Matthias Mann, pp 3281 - 3287

【技術分類】 2-1-1-2 質量分析全般技術／マトリックスの取り扱い／スポットティング／マトリックス膜形成

【技術名称】 2-1-1-2-2 二層法 (Two-Layer 法)

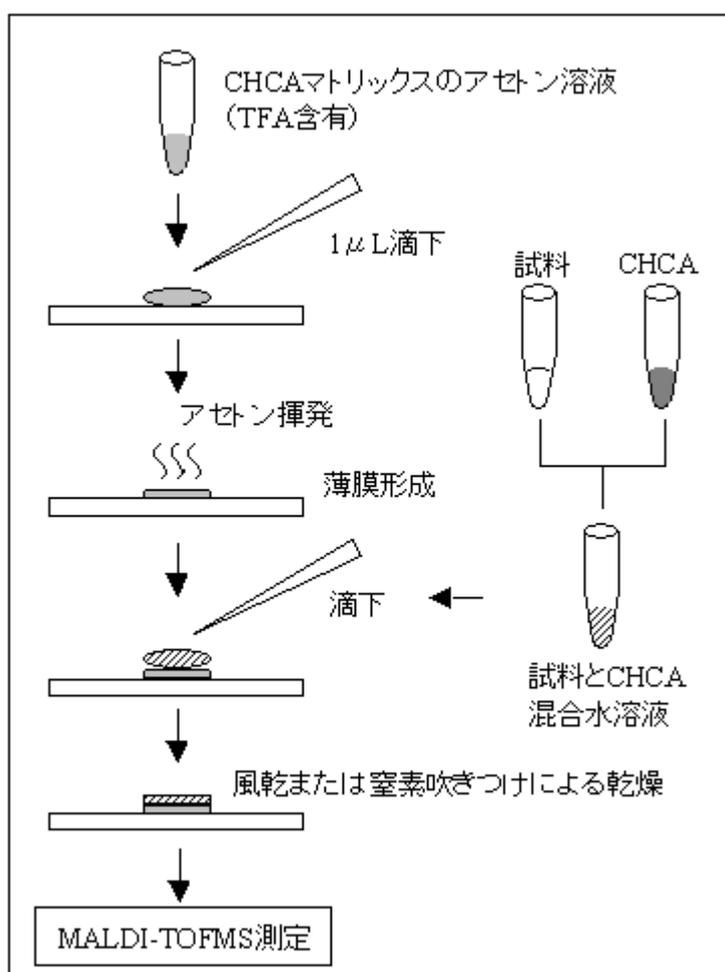
【技術内容】

CHCA やシナピン酸 (SA) (SA については2-1-2-1-1も参照) マトリックスの飽和溶液を試料プレートに滴下して風乾させる。これとは別に調製した試料とマトリックス飽和溶液の混合液を、試料プレート上のマトリックス飽和溶液の上に滴下して乾燥させ、これを測定に用いる。前項の薄膜法と異なる点はマトリックスの飽和溶液を用いる点であり、薄く均一な結晶の層が形成される。

【応用分野】

比較的広い質量範囲の検出が可能な方法であるため、タンパク質の酵素消化物を測定するペプチドマッピング法などに有効。

【図】 二層法の概略図



出典：本標準技術集のために作成

【出典／参考資料】

- ・ 「生命科学のための最新マスペクトロメトリー」、2002年5月10日、原田健一、田口良、橋本豊編、株式会社講談社発行、26頁
- ・ “Two-Layer Sample Preparation: A Method for MALDI-MS Analysis of Complex Peptide and

Protein Mixtures”, *Analytical Chemistry*, 1999; 71(5), Yuqin Dai, Randy M. Whittal, and Liang Li, pp 1087 - 1091

- “Confocal Fluorescence Microscopic Imaging for Investigating the Analyte Distribution in MALDI Matrices”, *Analytical Chemistry*, 1996; 68(15), Yuqin Dai, Randy M. Whittal, and Liang Li, pp 2494 - 2500