

Technical Report

MSイメージングにおける簡便な前処理法のご紹介

One point advice: Spraying of the matrix for sample preparation

緒方是嗣¹、松本結実¹、原田高宏¹

Abstract:

iMScopeによるMSイメージングでは、詳細なサンプル画像を顕微鏡下で取得したあとに、位置情報を保持したまま、マトリックスを塗布することができます。マトリックスの塗布方法には、スプレー法や蒸着法、インクジェットによる滴下法などがありますが、その塗布の状態がイメージング結果に大きく影響を及ぼします。今回紹介するハンドスプレーによるマトリックスの塗布は、簡単な設備で行うことができますが、実施者の習熟度によってその成否に大きな差が出ます。本レポートでは、スプレーでマトリックスを塗布するための方法について、比較的差が出にくく、簡単にできる方法について2つの例を紹介します。

Keywords: イメージング、iMScope、iMLayer、マトリックス塗布

1. MSイメージング分析時のマトリックス塗布の重要性

イメージング質量顕微鏡iMScopeによるMSイメージングでは、切片を顕微鏡下で観察する際に、マトリックスを塗布する前に、詳細なサンプル画像を取得できます。顕微鏡画像(光学画像)を取得したあとに、マトリックスを塗布し、最小5 μm ピッチのMSイメージングを行うことで、iMScopeの特徴のひとつである光学画像と m/z イメージとの重ね合わせを高精度で行なうことができます。

マトリックスの塗布方法には、スプレー法や蒸着法、インクジェットによる滴下法などがありますが、再現性や解像度、処理時間などで、それぞれの手法で一長一短があります。マトリックスの塗布状態は、イオン化効率や解像度に大きな影響を与え、イメージング結果を左右することが知られています。また、マトリックスの結晶サイズも解像度に影響を与えます。

エアブラシによる手動のスプレー法(Fig. 1)は、ホビー用の安価な器具を使って、ドラフトチャンバー内で作業すれば良いため、比較的安価な設備で始めることができます。しかしながら、スプレーから吐出される粒子径や飛散量を定量的に制御することが困難であるため、実施者の習熟度によってその成否に大きな差が出ます。特に結晶の出来栄によって大きくマススペクトルに影響するDHBをマトリックスとして使用した場合に顕著です。最適なマススペクトルと微小な結晶径を得るためには実験者の手技を磨くことが重要といわれてきました。



Fig. 1 エアブラシとサンプルホルダ

2. DHBをマトリックスとする際の問題点

マトリックス支援レーザー遊離イオン化(MALDI)法では、イオン化のためのマトリックスの選択が重要になります。MALDI法を使ったMSイメージングでは、シナピン酸(SA)、2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)、 α -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸(CHCA)、9-アミノアクリジン(9-AA)などが利用されます。特にiMScopeでは、検出対象に合わせてDHBやCHCA、9-AAなどから、対象物が検出されやすいマトリックスを選択して分析することが一般的であり、脂質の分析においては、DHBがよく用いられます。MALDI法のサンプル調製時には、マトリックスは揮発性の溶媒に溶解され、サンプルとともに混合された後に溶媒が蒸発することで、結晶化します。DHBを使用した場合、針状結晶が形成されるために、結晶の大きさが、イメージングの際の解像度を大きく左右します。この結晶の大きさを再現性よく揃えることが、他のマトリックスに比べ難しい傾向があります。Fig. 2は、同じ検体に対して、日を変えて同じようにマトリックスを塗布した例ですが、見た目が大きく変わっており、左側のほうが結晶が長くなっていることが分かります。

Fig. 2では比較的厚くマトリックスを塗布しているため、組織切片の様子が全く分かりませんが、iMScopeでは、マトリックス塗布後のサンプルを分析する前に、あらかじめ撮像した光学画像を使用して、詳細な分析条件を設定することが可能です。位置合わせ機能を使用して、分析位置を正確に指定することができます。

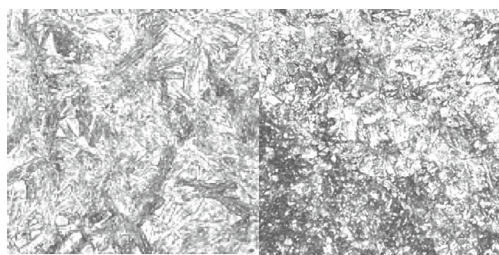


Fig. 2 DHB塗布後の観察画像

3. スプレー時の塗布量の影響確認

スプレーの吹き出し量を変化させた際の表面状態を確認しました。

方法:

- スプレー : プロコンBOY FWAプラチナ 0.2
ダブルアクション (Fig. 3)
- コンプレッサー : Mr.リニアコンプレッサーL5
(仕様)
- 適応気体 : 空気
- 定格圧力 : 0.1 MPa
- 最高圧力 : 0.12 MPa
- 吐出空気量 : 5.27 L/min. 0.05 MPa
- マトリックス : DHB (Sigma Aldrich)
- DHB調製 : 30 mg/mL in 70 % methanol/0.1 %TFA
- DHB溶液総量 : 1 mLをカップに分注
- スプレーの位置 : スライドガラスから170 mm離れた位置に固定
- エアアジャストネジ : 全開
- 噴射ボタン : 完全に押し、完全に引く
- エア圧 : 0.065 MPa
- 吹き出し量 : ニードルストッパーの回転数で調整
(完全に締めた状態から 0.25回転~2回転)



Fig. 3 エアブラシの詳細

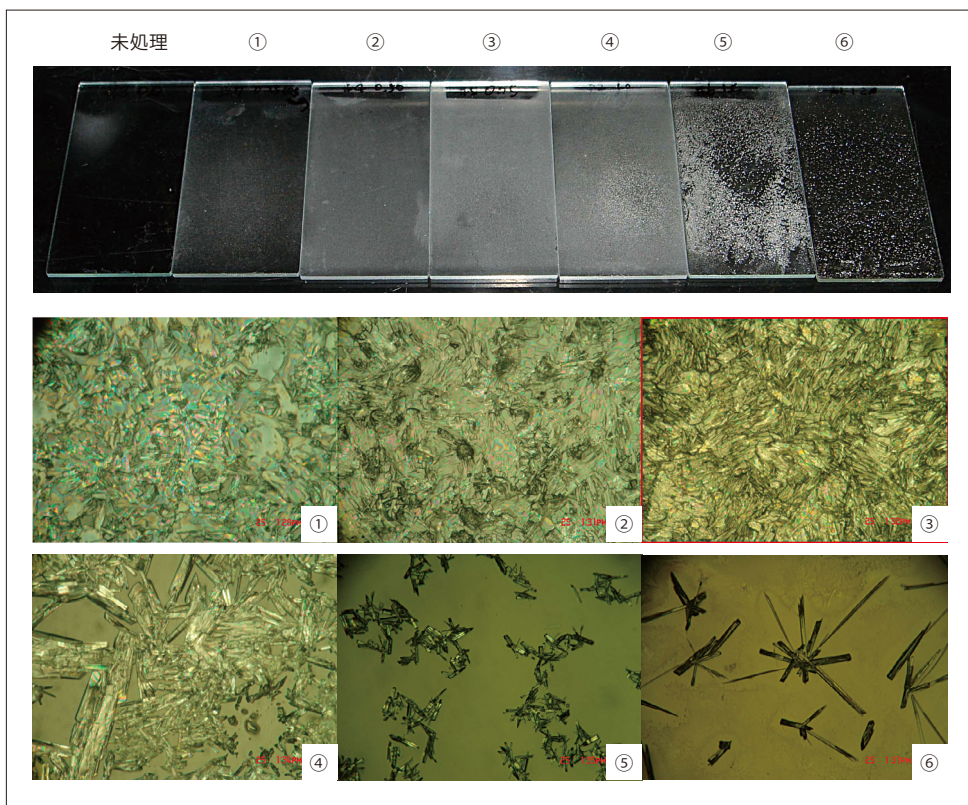


Fig. 4 スライドガラス表面 上段:全体、下段:拡大像
ニードルストッパー回転数① 0.25 ② 0.5 ③ 0.75 ④ 1.00 ⑤ 1.50 ⑥ 2.00

結果:

1 mLのマトリックス溶液(DHB:30 mg)について、噴霧量をニードルストッパーの回転数を①0.25から②0.5、③0.75、④1.0、⑤1.5、⑥2.0回転まで6段階に変化させた場合の所要時間、表面の濡れ具合、表面の観察像(結晶状態)を比較しました。噴霧時間は、順に①1200秒、②320秒、③100秒、④70秒、⑤25秒、⑥20秒と、回転数に

応じて短くなりました。1回転以上廻す(④⑤⑥)と、表面が濡れた状態になり、均一性が無くなりました。また、表面拡大像で結晶状態を確認したところ、ガラス面が見えており、分析しても良い解像度が得られないことが予想されました。一方、①0.25、②0.5回転では、ガラス表面が完全に覆われていることが表面拡大像から分かりま

すが、ガラス全面を見ると表面の均一性があまり無いことが分かります。このなかで比較をすると、③0.75回転100秒かけてスプレーしたものが最も分析に適したマトリックス状態といえます。

経験的には、0.7~1.2 mLのマトリックス溶液を、エアブラシとスライドグラスまでの距離を150~180 mm離して、100~150秒程度でスプレーし終わるぐらいの噴霧量(ストッパーで調整)で塗布すると、比較的うまく分析できると感じています。

マトリックスの最適な塗布量は、サンプルの状態や検出したい物質によって大きく変わるので、特に量については、適宜ご検討ください。

4. 安定したマトリックス塗布のために

コンプレッサーの性能やノズルの状態などで塗布量が変わる場合もあることから、慣れるまではキムタオルなどでマトリックス溶液の広がりを確認したり、いきなり実サンプルにスプレーするのではなく、安価な通常のスライドグラスを使って練習することをお勧めします。

作業により、エアブラシ本体を固定したり動かし、スライドグラスを縦にしたり下に置いたりするなど、慣れてくれば、独自のやりやすい方法が編み出されます。

もしエアブラシ本体を比較的大きく動かして塗布する場合には、マトリックス溶液の使用量が多い割りに、表面にマトリックスがのっていないことがしばしば発生します。エアブラシを動かす量を固定することはなかなか難しいため、塗布後の表面状態を再現良く仕上げるためには注意が必要です。再現性を高める方策としては、マトリックス塗布後の表面写真を取ること、マトリックス塗布前後の重量を測定して記録をすることが有効です。これにより塗布量・結晶状態をある程度正確に把握することができ、定量的な議論ができるようになります。

その他、マトリックスはボルテックス等で溶解後、超音波洗浄機で10分程度処理することでわずかに残ったマトリックスも完全に溶解します。最後に遠心(8000 rpm以上、2分)し、上清のみ使用することで、ノズルのつまりなどを防止します。

5. マトリックス重層法

MALDI法は、マトリックスと溶媒がサンプルと混合され、溶媒が蒸発し、マトリックスが結晶化する際にサンプルを取り込んだものを、イオン化するものと考えられています。

一方結晶は、初期に形成された微小な結晶核を中心に、その周囲に同一成分を集めて成長します。

つまり、MSイメージングにおけるサンプル表面のマトリックス結晶の形成も同様に、均一な結晶核をまず全面に配置し、その後、結晶を成長させることで安定したマトリックス状態を再現できるはずなのです。

以下に紹介する方法は、比較的少ない練習でもうまくできる方法です。あくまでも一例なので、アレンジを加えて実践してください。

5-1. 低濃度マトリックス エアブラシ重層法

マトリックス : DHB (Sigma Aldrich)
DHB調製 : 溶液① 20 mg/mL in 70 % methanol /0.1 %TFA 350 μ L
溶液② 50 mg/mL in 70 % methanol /0.1 %TFA 700 μ L

エアブラシ先端から

スライドグラスまでの距離 : 1,2回目20 cm以上 3回目15~20 cm
スプレー等 : 3章と同じ

低濃度マトリックス溶液①の塗布: ニードルストッパーを0.25~0.3回転程度回した状態でエアブラシを大きく動かしながらサンプルプレート全体に噴霧します(Fig. 5)。350 μ L噴霧後、ガラス表面がわずかに曇っている程度。

高濃度マトリックス溶液②の塗布: エアブラシの直付けカップに溶液②を350 μ L入れます。ニードルストッパーの位置と、スライドグラスまでの距離は①と同じまま、エアブラシを大きく動かしながら、全量を噴霧します。

高濃度マトリックス溶液②の再塗布: エアブラシのカップに溶液②の残り350 μ L入れます。ニードルストッパーを少し開き、噴霧量を増やします。距離も少し近づけて、エアブラシの動かす量も減らして、噴霧量を多くします。表面の状態を見ながら、十分に塗れたら途中で止めます。

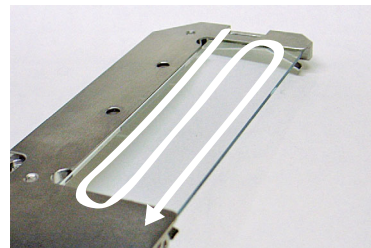


Fig. 5 スプレーノズルの動かし方の例

本手法の狙いは、まず低濃度の溶液を使って確実に結晶核を作ることにあります。そのあとは、その結晶核を基に大きく成長させるだけなので、大雑把にやっても失敗は少ないです。

注意すべき点は、あまり最初の低濃度溶液を少なくしすぎないことです。慣れるまでは、低濃度での塗布を2回繰り返してください。低濃度で、かつスライドガラスの外側にもはみ出して塗布するため、サンプルひとつあたり、10分以上かかることも普通です。ですが、上達の早い方は2回程度の練習でうまく分析できるぐらい、失敗の少ない方法なので、慣れるまではこれでやってみると良いでしょう。

注意: iMScopeでは、スプレーをする前に付属のサンプルホルダにサンプルプレートを装着し、顕微鏡で観察します。サンプルホルダには位置校正用のマーカーがついていますので、スプレーする際に付属のマスクを装着し、マトリックスによるマーカーの汚染を防止してください。

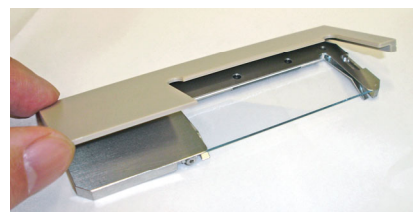


Fig. 6 スプレーマスク

5-2. 蒸着装置併用スプレー重層法

この手法は、イメージング質量顕微鏡iMScopeのオプション品であるiMLayerを使って結晶核を形成させるものです。マトリックスを蒸着するためのiMLayerを利用することで安定してマトリックスを塗布する方法として、スプレー重層法を紹介します。

薄膜検体に対し、顕微鏡観察を行なった後、蒸着によりマトリックスの薄膜を形成し、その後エアブラシによるマトリックス塗布を行います。

蒸着装置 : iMLayer (E-250MA)
マトリックス : DHB (Sigma Aldrich)
DHB調製 : 50 mg/mL in 70% methanol/0.1%TFA 100 μ L
エアブラシ先端からスライドガラスまでの距離 : 15~20 cm
スプレー等 : 3章と同じ
蒸着 : 0.4~0.6 μ m厚 (通常 2 μ m)
エアブラシ : DHB 50 mg/mL 100 μ L (通常 300 μ L)

蒸着によるマトリックスの薄膜が、次段階のエアブラシによるマトリックス溶液の噴霧時に結晶核の基となり、均一なマトリックス結晶膜の形成を助けます。Fig. 7は、スプレーのみで塗布した場合と、蒸着とスプレーを併用した場合の表面状態の比較を行なったものです。DHBはスプレーのみでは針状結晶となってしまいますが、蒸着と組み合わせることにより、非常に微細な表面構造を作ることができます。

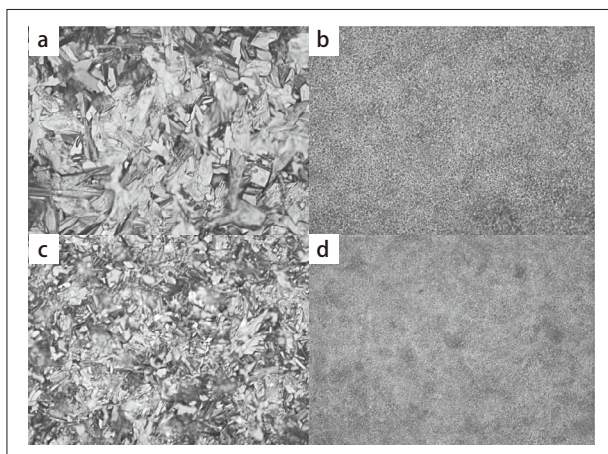


Fig. 7 サンプル表面拡大図
上段 (a, b): 切片上、下段 (c, d) : スライドガラスのみ
左 (a, c) : DHBスプレーのみ (300 μ L)、右 (b, d) : 蒸着+スプレー (100 μ L)

分析したスペクトロパターンでは、蒸着では検出できないピークを多数検出することができました(データ非公表)。結晶構造が小さいことにより、高密度のイメージング画像の取得ができるものと期待されます。また、先述の低濃度マトリックス溶液重層法と同様に作業者のスキルによらないマトリックス塗布が可能となります。

Fig. 8は、分析の流れを示したものです。実線枠は作業者の手が掛かる時間であるのに対し、点線枠の部分は作業者の手を離れる部分になります。蒸着とエアブラシを併用することは、一見手間が掛かるように感じますが、実際の作業時間は短くなります。実際の作業時間が短く、かつ安定したマトリックス塗布も可能な本手法を一度お試しください。

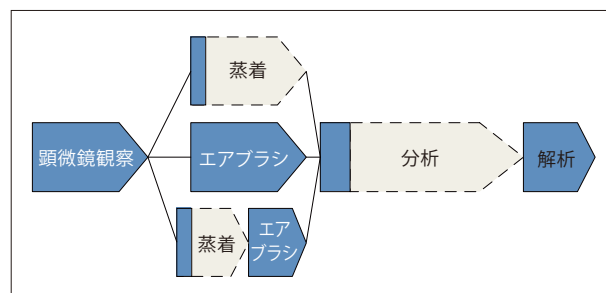


Fig. 8 分析の流れ
色塗: 作業者の手が必要な時間 破線囲み: 装置での時間(イメージ)

4. 最後に

熟練した技術をもったユーザーであれば、比較的簡単に実現できるマトリックス塗布ですが、あまり頻繁に作業をされないユーザーにも、利用可能なアプリケーションとして、2つの方法を紹介しました。

イメージング質量顕微鏡iMScopeは、顕微鏡で観察された高解像度の形態画像と、最小5 μ mのレーザー径で質量分析したイメージング画像を重ね合わせて解析することができる装置です。

顕微鏡での形態画像とイメージングデータの重ね合わせは、高解像度のデータにより、よりいっそうの価値を持ちます。エアブラシとiMLayerとの組み合わせによるマトリックス塗布など、安定したサンプル調製は、より美しいデータ取得の可能性を実現します。

iMScopeは、医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。治療診断目的にはご使用になれません。研究用途にのみ使用可能です。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行 : 2013年4月
© Shimadzu Corporation, 2013