

Technical Report

サンプル濃縮プレート FlexiFocus™ による MALDI-MS 生産性とスループットの向上

FlexiFocus Slides: Chemically Modified Sample-Focussing MALDI Targets to Enhance Productivity and Throughput

Simona Salivo¹

Abstract:

MALDI-MS 用サンプル濃縮プレート FlexiFocus は疎水性ウェルの中心に配置された小さな親水性領域がサンプル液滴を固定し、乾固する際にサンプルを収束させます。これによりサンプルや用途によっては感度性能を向上させることができます。また、島津製作所の卓上型 MALDI-TOF 質量分析計での自動分析を効率良く行うことができます。48 または 96 個のウェル配置から選択でき、すべての一般的な MALDI マトリックス・溶媒と互換性があるため、さまざまな用途にご利用いただけます。

Keywords: FlexiFocus、Focusing、MALDI-TOF、自動分析

1. はじめに

FlexiFocus は、島津製作所の卓上 MALDI-MS である MALDI-80X0 シリーズでのより高感度・高スループットで容易な自動分析のために開発された使い捨てサンプルプレートです。

このプレートは薄い金属板であるインサートと、アダプターとで構成されます。インサートはサンプルを滴下する円 (ウェル) の中心の小さな領域 (直径 900 μm) を除き、全体が疎水性となるように表面処理されているため、滴下されたサンプル液滴はその領域に固定されます。(Fig.1)。



Fig. 1 FlexiFocus: 化学的に処理された表面によりサンプル液滴の位置が固定される。

2. ウェル中心へのサンプル収束

サンプルスポットがウェルの中心に収束することで、中心から外れた位置にスポットが形成されることがなくなり、MALDI 自動分析の効率が向上します。これは、レーザーを照射する位置がサンプルスポットから外れていると一部分しか分析することができず、結果として弱い信号しか生成することができないからです。Fig. 2 は、FlexiFocus と (サンプル収束効果のない) FlexiMass™-SR48 とでサンプルスポットが形成される挙動を比較したものです。FlexiFocus に滴下した後 (Time point 1)、中心から外れた場所に付着したサンプル液滴はすぐに移動し、ウェルの中心で乾固します (Time point 2 および 3)。FlexiMass-SR48 では、サンプル溶液の液滴が付着した場所でそのままサンプルが乾固し、中心から外れた場所にサンプルスポットが形成されました。Fig. 3 に手でサンプルを滴下しサンプル収束の再現性を確認した例を示します。先ほどと同じように、中心から外れた多数のスポット (Fig. 3、右) がある FlexiMass-SR48 とは異なり、FlexiFocus では液滴が付着した場所 (Fig. 3、左) に関係なく、サンプルがウェルの中心で乾固します。

サンプルは、48 または 96 のウェル配置から選択可能な FlexiFocus インサートに滴下します (Fig. 4)。このインサートを FlexiFocus アダプターに装着し (Fig. 5)、島津製作所の卓上型 MALDI-TOF 質量分析計に挿入することで分析を行います。

Fig. 2 FlexiFocus と標準的なステンレス製 FlexiMass-SR48 のサンプル形成の比較。FlexiFocus (左): 中心から外れたところにスポットされたサンプル液滴は、ウェルの中心に移動して乾燥する。FlexiMass-SR48 (右): 中心から外れたところに滴下されたサンプル液滴は、そのままの場所で乾燥する。

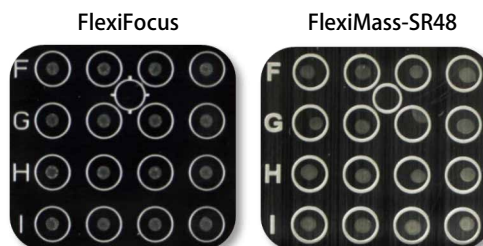
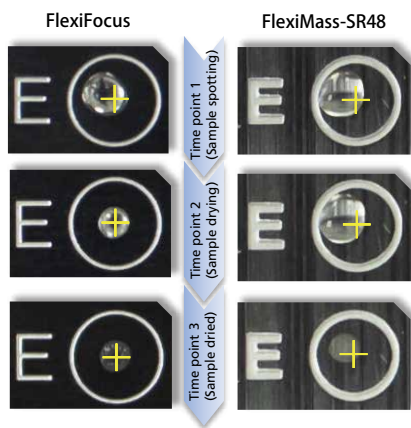


Fig. 3 FlexiFocus (左): 16 のサンプルすべてがウェルの中央で乾固した。FlexiMass-SR48 (右): サンプルが滴下された位置を反映してサンプルスポットの一部が中心からずれている。

Fig. 4
左: FlexiMass-SR48
中央: FlexiFocus-48 イ
ンサートおよびアダプタ
右: FlexiFocus-96 イ
ンサートおよびアダプター

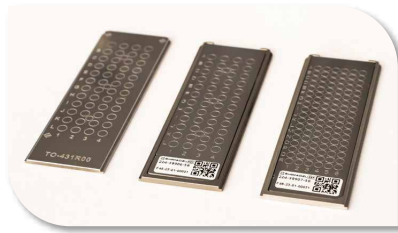


Fig. 5
FlexiFocusアダプ
ターとインサート。
アダプターには磁石
が組み込まれており、
インサートを正しい
位置に保持します。

3. 様々な用途への対応

FlexiFocusは、 α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA)、シナピン酸 (SA)、2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB)、3-ヒドロキシピコリン酸 (3-HPA) などの一般的に使用されるMALDIマトリックスと互換性があります。また、水、アセトニトリル、メタノール、エタノール、クロロホルム、トリフルオロ酢酸 (<0.1% (v/v)) などのほとんどの有機溶媒も使用できます。プロテオミクスやリポミクス、オリゴヌクレオチドから、ハイスループット分析が必要な状況まで、幅広い用途に使用することができます。

Fig. 6にIgA (ウェル上で5 pmol) のMALDIマスペクトルを示します。サンプルは0.1% TFAで10 pmol/ μ Lに調製し、シナピン酸マトリックスは1:1アセトニトリル/0.1% TFAで20 mg/mLに調製しました。乾燥し結晶化したサンプルスポットの外観は通常のFlexiMassステンレスプレートで得られるものと類似していました (Fig. 6B)。IgAモノマーの一価イオンが160 kDa付近に、二価イオンが80 kDa付近に検出されました (Fig. 6C)。54 kDaのピークは重鎖によるものと考えられます。

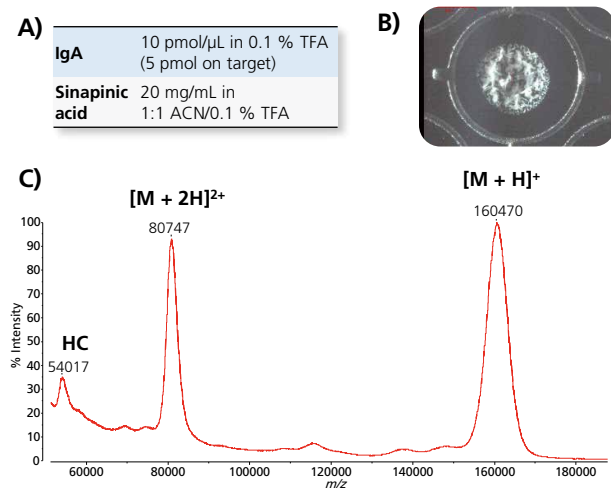


Fig. 6 A) サンプルとマトリックス条件。B) SAを用いて調製したIgAサンプルスポット。C) IgAのMALDIマスペクトル (ウェル上で5 pmol) : IgAモノマーの一価イオンと二価イオン、重鎖 (HC) のピークが検出されました (それぞれ m/z ~160k、~80k、~55k)。データはMALDI-8020で取得。

Fig. 7に、エクストラバージンオリーブオイル (EVOO) 中のトリアシルグリセロール (TAG) のMALDIマスペクトルを示します。EVOOはクロロホルム中で5 mg/mLに、DHBマトリックスは10 mMのトリフルオロ酢酸ナトリウム (NaTFA) を含むメタノール中で1 mg/mLに調製しました。スペクトルではトリオレイン (OOO) が支配的で、OOP、POLがそれに続きます。これはEVOO中のパルミチン酸 (P)、オレイン酸 (O)、リノール酸 (L) の天然の存在と存在量を反映しています。また、同位体ピークは分離され、TAG種が区別して検出されていることもわかります。

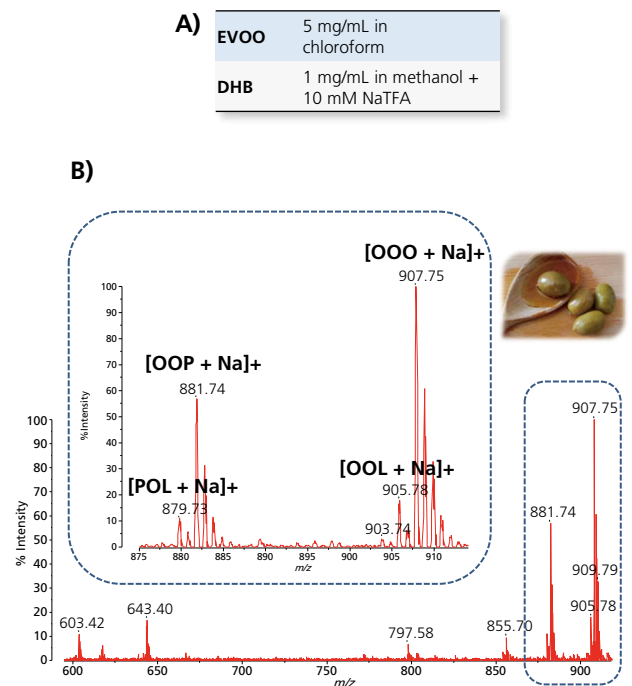


Fig. 7 A) サンプルとマトリックス条件。B) EVOO中のTAGsのMALDIマスペクトル。左上点線部: メインTAG領域の拡大図。OOO、OOP、OOL、POLは、EVOOの主要なTAGsです (P: パルミチン酸; O: オレイン酸; L: リノール酸)。TAGピークの同位体は分離しています。データはMALDI-8020で取得。

Fig.8はFlexiFocusの感度性能の例を示しています。Glu1 - フィブリノペプチドB (GluFib) を30:70アセトニトリル/0.1 % TFAで500、200、100及び50 amol/μLに段階希釈しました(ウェル上で250、100、50、25 amolに相当)。マトリックスはCHCAを1:1アセトニトリル/0.1 % TFAで0.25 mg/mLに調製しました。GluFibのピーク (m/z 1570.7) は、最も低い濃度(ウェル上で25 amol)を含むすべての濃度で確実に検出され、SN比 (>3:1) や同位体分離も良好でした。

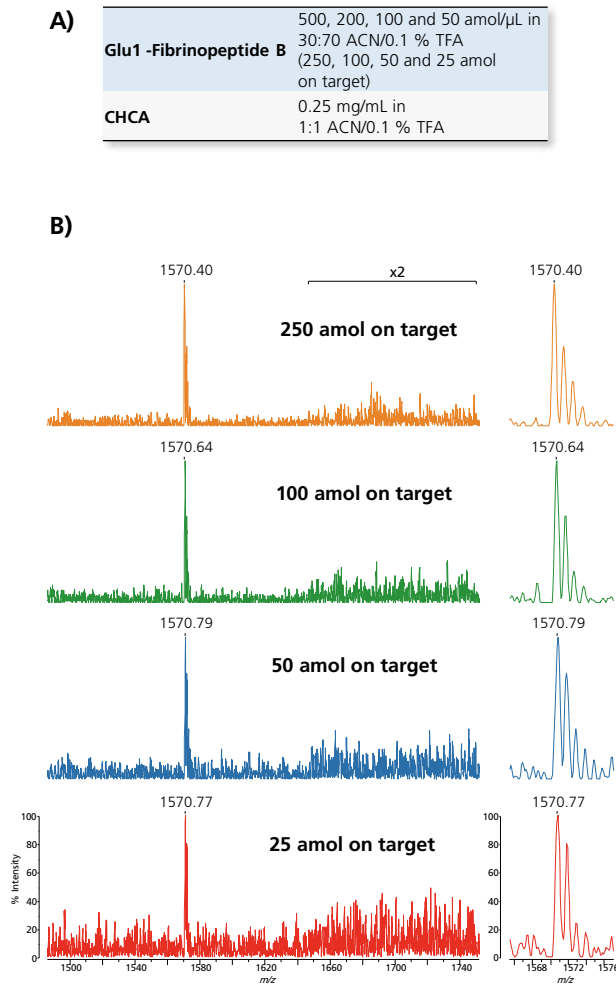


Fig. 8 A) サンプルとマトリックス条件。B) 異なる濃度のGluFibのMALDIマスペクトル: 250、100、50、25 amol (それぞれオレンジ、緑、青、赤)。GluFibのピーク (m/z 1570.7) は良好なSN比 (>3:1) と同位体が分離した状態で検出されました。データはMALDI-8020で取得。

Fig.9にオリゴヌクレオチドの分析例を示します(20-mer; ACGTACGTACGTACGT)。サンプルは脱イオン水で100 μMに調製し、オリゴヌクレオチド中に含まれる塩を除去するためにDowexイオン交換樹脂で脱塩しました。クエン酸アンモニウム(二塩基)を70:30アセトニトリル/水で5 mg/mLに調製し、この溶液を用いて3-HPAマトリックスを10 mg/mLに調製しました。Fig.9Cに、FlexiFocusを用いて得られた20-merオリゴヌクレオチドのMALDIマスペクトルを示します。一価イオンが m/z 6118.68にわずかな塩付加体と共に検出されました。Fig.9Dは、この20-merオリゴヌクレオチドをMALDI-ISD (in-source decay; ISD) により配列解析を行った例を示しています。ISDフラグメントは75 %のシーケンスカバレッジを達成し良好なSN比で検出されました。

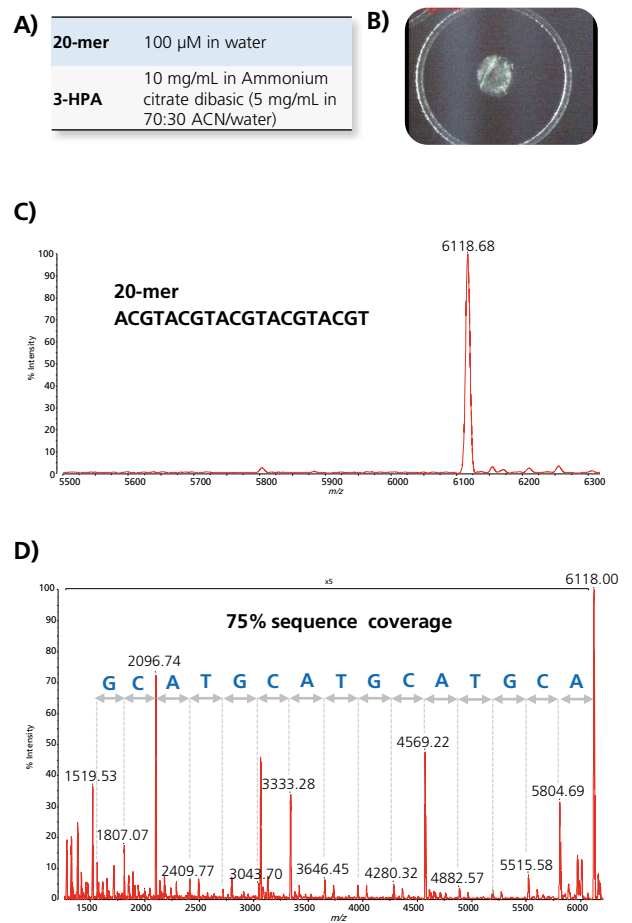


Fig. 9 A) サンプルとマトリックス条件。B) FlexiFocus上における3-HPAを用いて調製した20-merオリゴヌクレオチドサンプルスポット。C) 20-merオリゴヌクレオチドのMALDIマスペクトル。D) 20-merオリゴヌクレオチドのMALDI-ISDマスペクトル: 75 %の配列カバレッジを達成しました。データはMALDI-8020で取得。

FlexiFocusは、品質管理 (QC) など高スループットで自動化されたワークフローに最適なソリューションです。これらはすべての島津製作所製MALDI-TOFプラットフォームと、QC Reporter™のような自動分析ソフトウェアで使用できます。Fig.10はFlexiFocus-96とQC Reporterを使用して行われた合成ペプチドのQC分析の例を示しています。

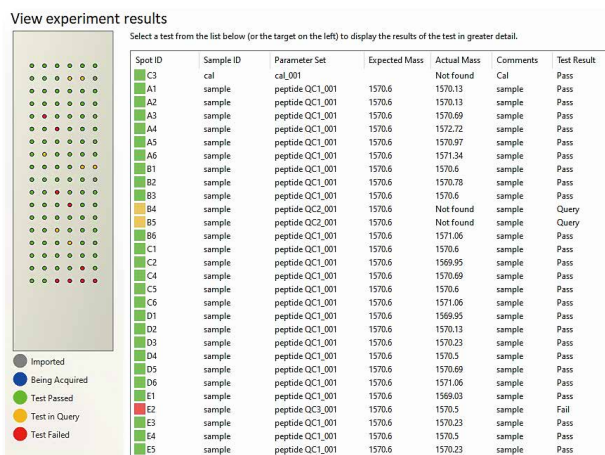


Fig. 10 FlexiFocus-96とQC Reporterを用いたQCテスト結果の例。色分けされたサンプルプレートのグラフィックとサマリーテーブルにより、テスト結果を直感的に表現します。

結果を色分けして視覚化することで、分析の結果 (Passは緑、Queryはオレンジ、Failは赤) を簡単に読み取ることができ、サマリーテーブルにはスポットID、QCメソッド、予測/検出された質量情報、テスト結果など各サンプルの詳細が表示されます。

4. 感度性能の向上

サンプル液滴が十分に収束した場合、サンプルや用途によっては分析の感度性能を向上させることができます。

Fig.11にFlexiFocusとFlexiMass-SR48の感度性能比較の例を示します。市販のBSA消化物を30:70アセトニトリル/0.1% TFAで段階希釈し、3 fmol、1 fmol、300 amol、100 amol及び30 amol/μLに調製しました (ウェル上で3 fmol、1 fmol、300 amol、100 amolおよび30 amolに相当)。CHCAマトリックスは1:1アセトニトリル/0.1% TFAにより0.25 mg/mLに調製しました。プロファイル当たり10ショットの積算で、FlexiMass-SR48と比較してFlexiFocusでは感度性能が向上することが示されました (Figure 11B)。十分な質のスペクトルが得られる最も低い濃度、つまりFlexiFocusでは100 amol (Fig.11C)、FlexiMass-SR48では300 amol (Fig.11D) のスペクトルを Mascot PMF 検索することにより、良好なタンパク質IDが得られました。

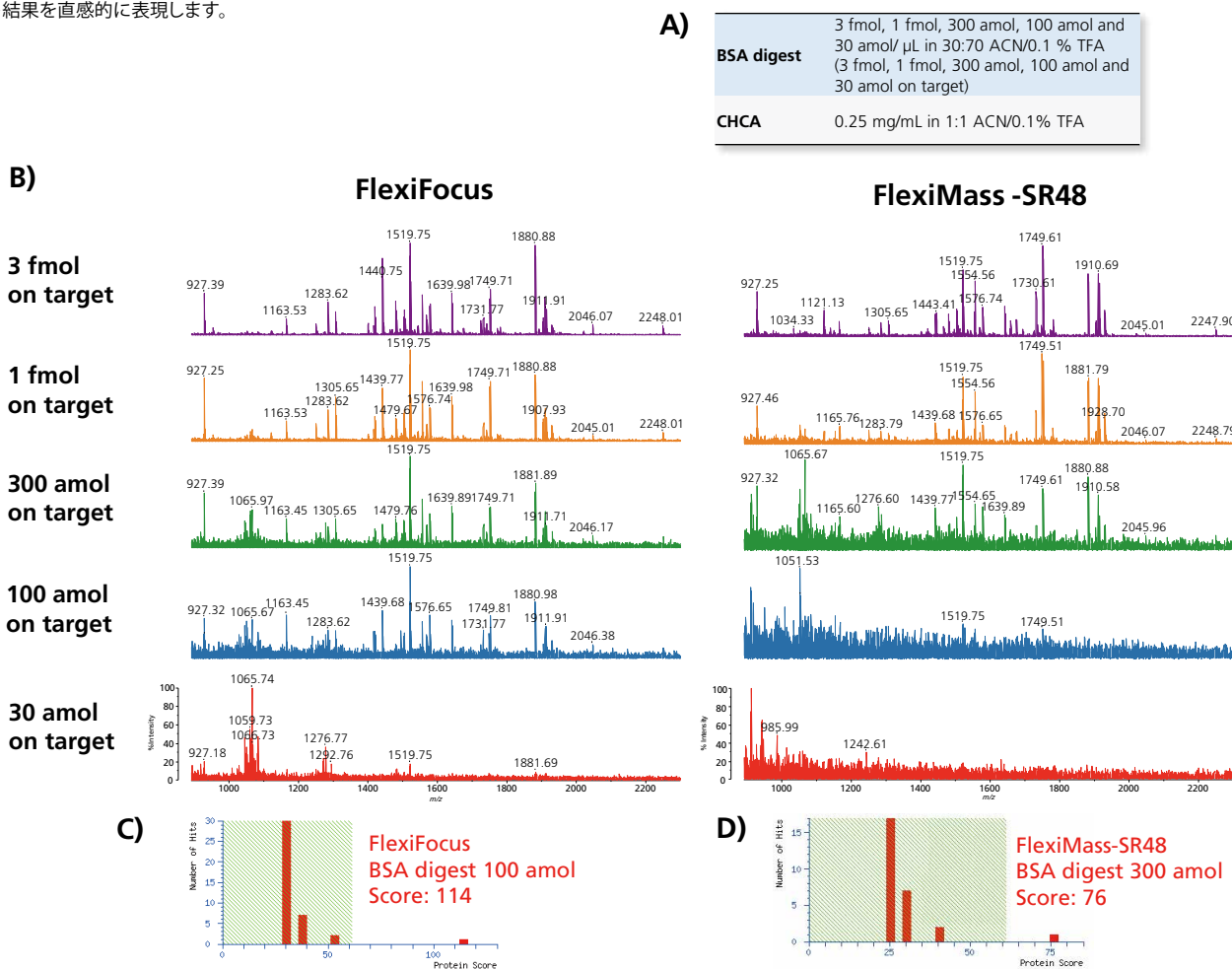


Fig.12は、FlexiFocusのプロファイルあたり50ショットの積算で得られたBSA消化物 30 amol/μL (ウェル上で30 amol) のスペクトルの例です。マトリックスクラスタを抑制するためにリン酸アンモニウム塩基 (ADHP) を 10 mM濃度で添加しました。Mascot PMF 検索により正しいIDを得ることができました。

A)

BSA digest	30 amol/μL in 30:70 ACN/0.1 % TFA (30 amol on target)
CHCA	0.25 mg/mL in 1:1 ACN/0.1 % TFA + 10 mM ADHP

B)

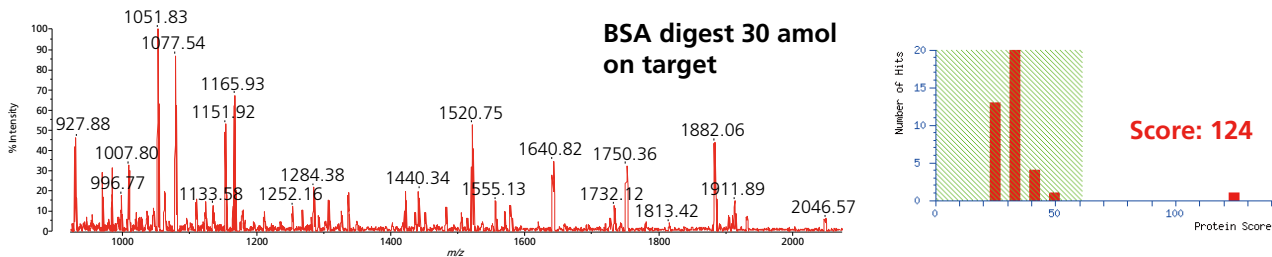


Fig. 12 A) サンプルとマトリックス条件。B) 左：プロファイルあたり50ショットの積算で得られたBSA消化物 (ウェル上で30 amol) のMALDIマススペクトル。右：Mascot PMFによるタンパク質の同定。データはMALDI-8020で取得。

FlexiFocus 製品詳細

スターターキット

P/N	品名
223-26510-91	FlexiFocus-48ウェル スターターキット
223-26510-92	FlexiFocus-96ウェル スターターキット

<キット内容>

- 48 または 96ウェルインサート 20枚
- アダプター 1枚

消耗品、保守部品

P/N	品名
223-26511-03	FlexiFocus-48ウェルインサート 10枚入り
223-26511-04	FlexiFocus-96ウェルインサート 10枚入り
223-26511-05	FlexiFocusアダプター 1枚入り

FlexiMass は、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。
FlexiFocus および QC Reporter は、Kratos Analytical Ltd. の商標です。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <https://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作者に帰属しており、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：2023年10月
© Shimadzu Corporation, 2023