

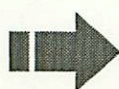
## サンプルプレートの準備

### サンプルプレート

#### プレートの種類

Axima には、サンプルプレート 2.8 mm リング× 384 ウェル (2 mm 厚) が標準付属しています。Axima で使用できるサンプルプレートの一覧は下表のとおりです。

品名	部品番号	備考
サンプルプレート 2.8 mm リング× 384 ウェル	223-25114-05	標準付属品 プレート番号 DE1580TA
サンプルプレート 4.7 mm リング× 96 ウェル	223-25114-04	プレート番号 DE1487TA
サンプルプレートフリーフォーマット	223-25114-06	プレート番号 DE1798TA
サンプルプレート外部標準用 1.5 mm リング× 96 ウェル付き 2.8 mm リング× 384 ウェル	223-25579-17	プレート番号 DE4555TA
FocusMass-T3	241-03680-91	MALDI-TOF/MS 用濃縮プレート



FocusMass-T3 を使用するには、上記製品以外にも専用ホルダーキット、専用の試薬キットが必要です。用途に応じて適切なキットを推奨させていただきますので、詳細については当社営業窓口または技術窓口までお問い合わせください。

#### 一回目の洗浄

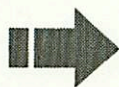
サンプルプレートは清浄な状態で出荷されますが、使用前にサンプルプレートを再度洗浄することを推奨します。

洗浄には HPLC 用溶媒を使用します。

1. パウダーフリーの手袋を着用します。
2. サンプルプレート上のサンプルをすべてメタノールで拭き取ります。
3. サンプルプレートを 1% のギ酸で 10 ~ 15 分間超音波洗浄します。
4. アセトンで 10 ~ 15 分間超音波洗浄します。
5. メタノールで 10 ~ 15 分間超音波洗浄します。
6. 水で 20 分間超音波洗浄します。
7. メタノールをサンプルプレートに振りかけた後、サンプルプレートを立てかけてメタノールを乾燥させます (拭き取らないこと)。
8. 一晩以上乾かします。

## 一般的な洗浄

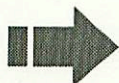
分析後、ウェルを再使用するまえに、サンプルプレートを洗浄します。



ここで述べるサンプルプレート洗浄法は、水溶性の高いサンプル（タンパク質・多糖類・DNA など）に対しては有効ですが、脂溶性のサンプルは除去しきれないことがあります。その場合は、良溶媒（≡サンプルの溶解に用いた溶媒）を用いて洗浄してください。

HPLC 用溶媒を使用します。

1. パウダーフリーの手袋を着用します。
2. サンプルプレート上のサンプルをすべてメタノールで拭き取ります。
3. アセトンで 10 ～ 15 分間超音波洗浄します。
4. メタノールで 10 ～ 15 分間超音波洗浄します。
5. 水で 20 分間超音波洗浄します。
6. メタノールをサンプルプレートに振りかけた後、サンプルプレートを立てかけてメタノールを乾燥させます（拭き取らないこと）。
7. 一晩以上乾かします。



サンプルプレートは十分乾燥させてください。十分乾燥していないと、サンプルがプレート表面で広がり、搭載しにくいことがあります。

洗浄してもなお以前に分析したサンプル由来の信号が検出されるときは、新品のプレートをご使用ください。

## サンプルの準備

このセクションに記載されている手順は、一例として参照してください。各手順は、個々の条件に応じて変更してください。

### 標準サンプルの調製と保存

下表は、Axima のキャリブレーションに使用できるペプチドおよびタンパク質の例を示します。また、一般的に使用されるマトリックスも示します。

製造販売元	カタログ 番号	解説 (アミノ酸配列)	(M+H) <sup>+</sup> モノアイソトピック質 量 (Mono) 平均質量 (Ave)
Sigma	MS-CAL1	ProteoMass Peptide & Protein MALDI-MS Calibration Kit	-
Sigma	B1651	Bradykinin Fragment 1-7 (RPPGFSP)	757.40 Da (Mono)
Sigma	A9525	Angiotensin II (human) (DRVYIHPF)	1046.54 Da (Mono)
Sigma	A9650	Angiotensin I (human) (DRVYIHPFHL)	1296.69 Da (Mono)
Sigma	P2613	ProteoMass P <sub>14</sub> R MALDI-MS Standard (PPPPPPPPPPPPPPR)	1533.86 Da (Mono)
Sigma	F3261	[Glu <sup>1</sup> ]-Fibrinopeptide B (human) (EGVNDNEEGFFSAR)	1570.68 Da (Mono)
Sigma	R5380	N-Acetyl-Renin Substrate Tetradecapeptide porcine (porcine) (C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O-DRVYIHPFLLVYS)	1800.94 Da (Mono)
Sigma	A2407	ACTH fragment 1-17 (human, rat) (SYSMEHFRWGKPVGKKR)	2093.09 Da (Mono)
Sigma	A0673	ACTH fragment 18-39 (human) (RPVKVYPNGAEDESAEAFPLEF)	2465.20 Da (Mono)
Sigma	A1527	ACTH fragment 7-38 (human) (FRWGKPVGKKRRPVVKVYPNGAEDESAEAFPLE)	3657.93 Da (Mono)
Sigma	I5500	Insulin (bovine)	5730.61 (Mono)
Sigma	C7752	Cytochrome c (equine heart)	12,361.96 Da (Ave)
Sigma	A8673	Apomyoglobin (equine)	16,952.27 Da (Ave)

製造販売元	カタログ 番号	解説 (アミノ酸配列)	(M+H) <sup>+</sup> モノアイソトピック質 量 (Mono) 平均質量 (Ave)
Sigma	A8811	Aldolase (rabbit)	39,212.28 Da (Ave)
Sigma	A0281	ウシ血清アルブミン (BSA)	66,430.09 Da (Ave)
島津 GLC	529-CHCA	$\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸 (CHCA)	190.05 Da (Mono)
島津 GLC	529-SA	シナピン酸 (SA)	225.08 Da (Mono)
島津 GLC	529-DHBA	2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB)	155.03 Da (Mono)
Fluka	56197	3-Hydroxypicolinic acid (HPA)	140.03 Da (Mono)
Fluka	91928	2',4',6'-Trihydroxyacetophenone monohydrate (2,4,6-THAP)	169.05 Da (Mono)
Sigma	T64408	2',3',4'-Trihydroxyacetophenone (2,3,4-THAP)	169.05 Da (Mono)
Fluka	10608	1,8-Dihydroxy-9(10H)-anthrac (Dithranol)	227.07 Da (Mono)

### 標準サンプルの調製

各標準サンプルの濃度を調整するために、下に示すような段階希釈で調製を行いません。fmol/ $\mu$ L オーダーの標準サンプルを調製するときは、100倍以上の希釈を行うこともできます。以下の手順は一例ですので、条件に応じて変更してください。

ストック溶液 (濃度  $10^{-3}$  M = 1000 pmol/ $\mu$ L) から、10倍の希釈溶液を作ります。

1. ピペットを使用し、0.1% トリフルオロ酢酸 90  $\mu$ L を 0.5 mL の微小遠心管 (または同等のもの) に入れます。
2. ピペットを使用し、10  $\mu$ L のストック溶液 (1000 pmol/ $\mu$ L) のサンプル溶液をはかり取ります (溶液をピペットから3回出し入れし、ピペットチップの先端を平衡化させます)。これを微小遠心管に入れます。5回ピペッティングによる混合を行います。
3. 溶液をボルテックスします。これで、100 pmol/ $\mu$ L の濃度になります。
4. 所要の濃度になるまで、この手順を繰り返します。一回ごとに新しいピペットチップを使用してください。キャリブレーションなどに用いる標準サンプルの濃度は通常、10 pmol/ $\mu$ L と 1 pmol/ $\mu$ L です。

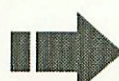
5 pmol/ $\mu$ L または 500 fmol/ $\mu$ L の濃度が必要であれば、20倍希釈を作ります。たとえば、0.1% のトリフルオロ酢酸を 95  $\mu$ L 取り出し、これに 5  $\mu$ L のサンプルを足すと、濃度は 5 pmol/ $\mu$ L になります。

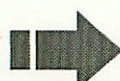
## キャリブレーション用ペプチド混合物の調製

キャリブレーション用の混合物は、対象となる質量範囲をカバーしている必要があります。通常、キャリブレーションには、対象となる質量範囲全体においてキャリブレーション用サンプルを等間隔に置きます。このとき、少なくとも3つのキャリブレーション用サンプルを使用します。

1. 各ペプチドについて、10 pmol/ $\mu$ Lの濃度を使用します。
2. 各ペプチド溶液を100  $\mu$ Lずつ、微小遠心管に入れます。
3. 溶液をボルテックスします。

同等強度のピークを持つ（モノアイソトピックピークの高さが同等になる）スペクトルを取得するため、各ペプチド濃度の調整が必要になることがあります。


 キャリブレーション用のストック溶液は、10～100 pmol/ $\mu$ Lの濃度になるように標準サンプルを0.1%トリフルオロ酢酸に溶解して調製します。保存溶液は適量を小分けし冷凍保存します。数ヶ月間は保存可能です。保存期間中は2～3回まで再溶解しても使用可能です。分析時は1～10 pmol/ $\mu$ Lに希釈して使用してください。

 MALDI法は不純物（界面活性剤、塩など）に対する許容性が比較的高いイオン化法ですが、不純物を多く含むサンプルについては脱塩処理を行なってください。ペプチドやタンパク質サンプルの脱塩には、例えば、ZipTip (Millipore Corporation) が汎用されています。

## ペプチドのサンプル

### マトリックス

1 mLのアセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸(1:1)に10 mgのCHCA ( $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸)溶液を溶解したものを遠心、上清を使用します。

 マトリックス溶液は用時調製することを推奨します。翌日以降も使用するときには暗所（冷蔵）で保存して下さい。

## 一般的なサンプル調製

ピペットを使用し、ウェルにマトリックスとサンプルを滴下します。

1. 0.5  $\mu\text{L}$ のサンプルを搭載します。
2. サンプルが乾燥する前に0.5  $\mu\text{L}$ のマトリックスを搭載します。
3. サンプルプレートを室温に置き、サンプルを乾燥させます。

## 低濃度のサンプルに用いるサンプル調製

低濃度サンプルの場合は、サンプルウェルをマトリックスでコーティングします。CHCAの濃度は5 mg/mLにします。

1. 0.5  $\mu\text{L}$ のマトリックスを搭載し、数秒置いてから搭載したマトリックスを出来るだけピペットで吸い取り、乾燥させます。
2. 0.5  $\mu\text{L}$ のサンプルを搭載します。
3. サンプルが乾燥する前に0.5  $\mu\text{L}$ のマトリックスを搭載します。
4. サンプルプレートを室温に置き、サンプルを乾燥させます。

## タンパク質のサンプル マトリックス

1 mLのアセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸(1:1)に10 mgのシナピン酸を溶解したものを遠心、上清を使用します。

## サンプル調製

1. サンプルとマトリックス溶液を1:1の混合比で微小遠心管に加え、ボルテックス、遠心します。(サンプルとマトリックス溶液混合比は、サンプル濃度に応じて調整してください。)
2. サンプルプレートに、サンプルとマトリックスの混合溶液を1  $\mu\text{L}$ 搭載します。
3. サンプルプレートを室温下に置き、サンプルを乾燥させます。

## 糖類のサンプル

このセクションに記載の手順は、一例として参照してください。各手順は、個々の条件に応じて変更してください。

### マトリックス

一般的なマトリックスは以下の通りです。

- 1 mL のアセトニトリル / 0.1% トリフルオロ酢酸 (1:1) に、DHB (2,5 ジヒドロキシ安息香酸) 10 mg を溶解したもの

### サンプル調製

1. 0.5  $\mu$ L のマトリックスと 0.5  $\mu$ L のサンプルをサンプルプレートにスポッティングします。
2. 乾燥させます。

## オリゴヌクレオチドのサンプル

### 方法 1

通常はこのマトリックスを用いてオリゴヌクレオチドを分析します。

1. 以下の溶液を準備します。
  - 1 mL のアセトニトリル / 水 (1:1) に 97 mg の HPA と 16 mg の Ammonium citrate dibasic (Fluka 09833 など) を溶解したもの
2. サンプルと 1:1 の混合比で混合します。
3. サンプルプレートに 1  $\mu$ L を搭載し、乾燥させます。
4. ネガティブモードで分析します。

### 方法 2

この方法は、特に分解能の高いデータを得るために効果的です。

1. サンプルチューブに以下の試薬を入れます。
  - 12 mg の 2', 4', 6'-trihydroxyacetophenone
  - 6 mg の 2', 3', 4'-trihydroxyacetophenone
  - 5 mg の Ammonium citrate dibasic (Fluka 09833 など)
2. 1 mL のアセトニトリル / 水 (1:1) に溶解します。これがマトリックスです。
3. サンプルプレートに、0.5  $\mu$ L のオリゴヌクレオチドを搭載します。
4. 引き続き 0.5  $\mu$ L のマトリックスを搭載し、サンプルと混合します。
5. 乾燥させます。
6. ネガティブモードで分析します。

## 参考文献

MALDI 法で使用されるマトリックスとサンプル調製についての参考文献を以下に示します

- [http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Fluka\\_\\_\\_Riedel\\_Home/Bioscience/Peptide\\_Analysis/MALDI\\_Mass.html](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Fluka___Riedel_Home/Bioscience/Peptide_Analysis/MALDI_Mass.html)  
(2006年8月現在)
- David J. Harvey; MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION MASS SPECTROMETRY OF CARBOHYDRATES; , Mass Spectrometry Reviews, Vol. 18, Pp. 349-451 (1999).
- 志田保夫、笠間健嗣、黒野定、高山光男、高橋利枝 ; , これならわかるマスペクトロメトリー, Pp. 86-90, 141-143 (2001).
- 原田健一、田口良、橋本豊 ; 生命科学のための最新マスペクトロメトリー, Pp. 17-33 (2002).
- Michel W.F. Nielen; MALDI TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY OF SYNTHETIC POLYMERS; , Mass Spectrometry Reviews, Vol. 18, Pp. 309-344 (1999).
- マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による合成高分子の分析 ; , ぶんせき, Vol. 9, Pp. 467-473.