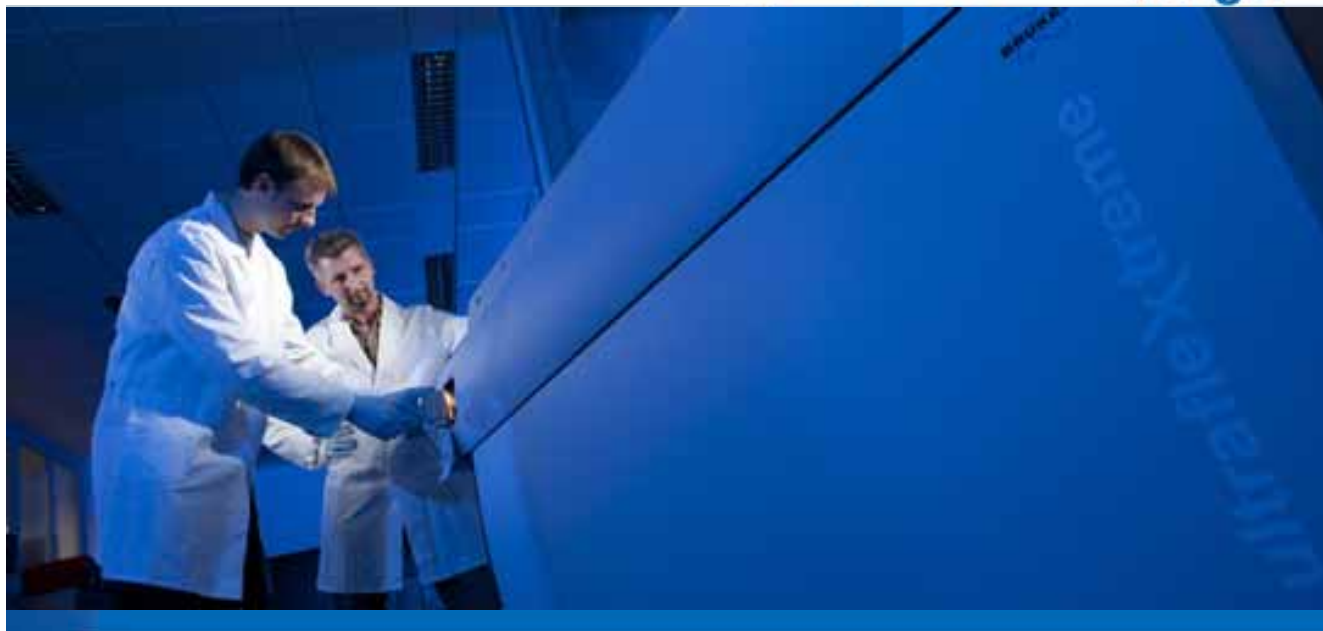


MALDI-TOF-MSによる イメージング質量分析アプリケーション



MALDI Molecular
Imager



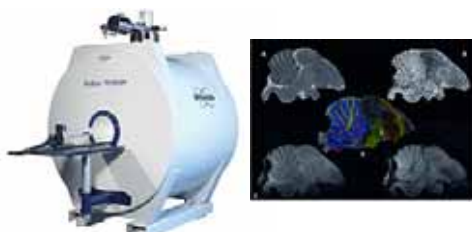
イメージング？



イメージング (英: imaging) とは、試料の情報を様々な方法で測定して画像化・視覚化すること。
あるいはそれに用いられる技術。レントゲン写真はX線イメージングの一例です。

「～イメージング」と記述して、応用の方法によって区別する場合があります。情報技術や医療分野でよく用いられます。

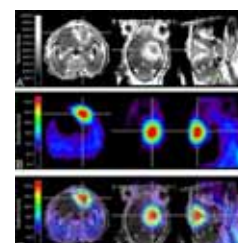
核磁気共鳴画像法(MRI/MRS)



コンピュータ断層撮影(CT)



陽電子放出断層撮影(PET)



質量分析法とは、

試料の質量電荷比を求めるとき に使用される分析法である。

高電圧をかけた真空中で試料をイオン化すると、静電力によって試料は装置内を飛行する。飛行しているイオンを電氣的・磁氣的な作用等により質量電荷比に応じて分離し、その後それぞれを検出することで、質量電荷比を横軸、検出強度を縦軸とするマススペクトルを得ることができる。

(出典:「質量分析法」 2009年8月8日 (土) 15:39 UTC ウィキペディア日本語版)

MALDI-IMS

Research use only

Imaging mass spectrometry(IMS) イメージング質量分析

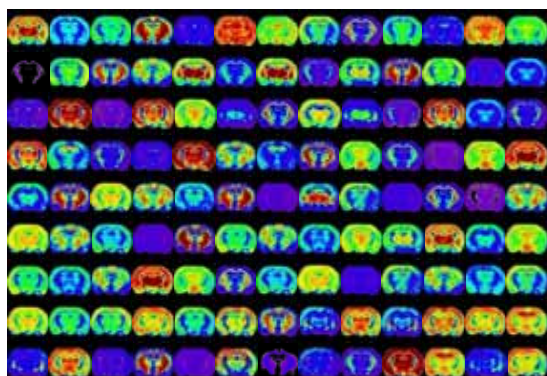


MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)

SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry)

DESI (desorption electrospray ionization)

等のイオン源を搭載した質量分析計を用いタンパク質、ペプチド、代謝物、バイオマーカーや薬物の分布を可視化します。

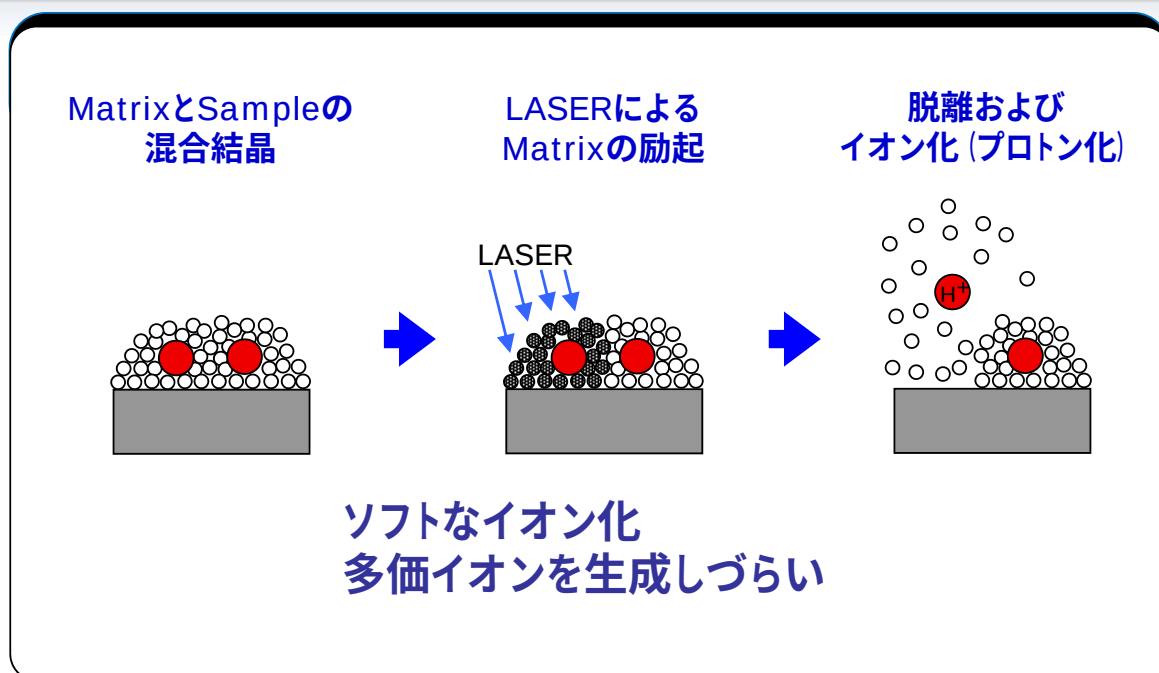


MALDI-IMS

MALDI-IMS

Research use only

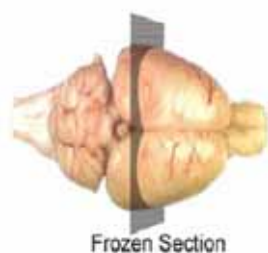
MALDIによるイオン化の原理



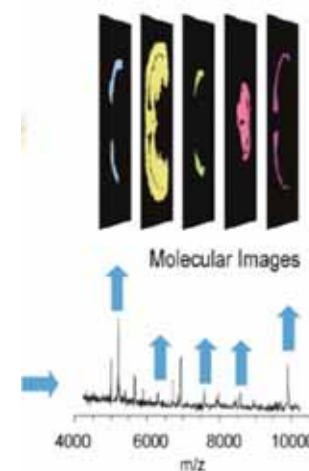
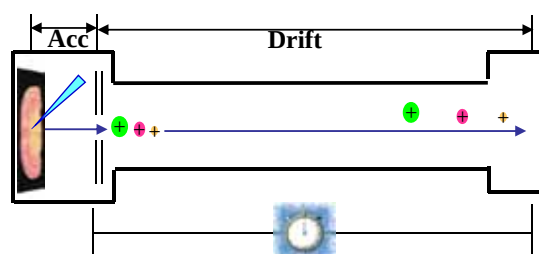
MALDI-IMS

Research use only

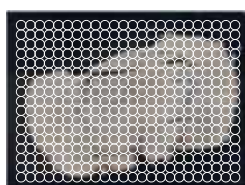
Imaging mass spectrometry(IMS) イメージング質量分析



Frozen Section



分子量で色分け
2Dで表示

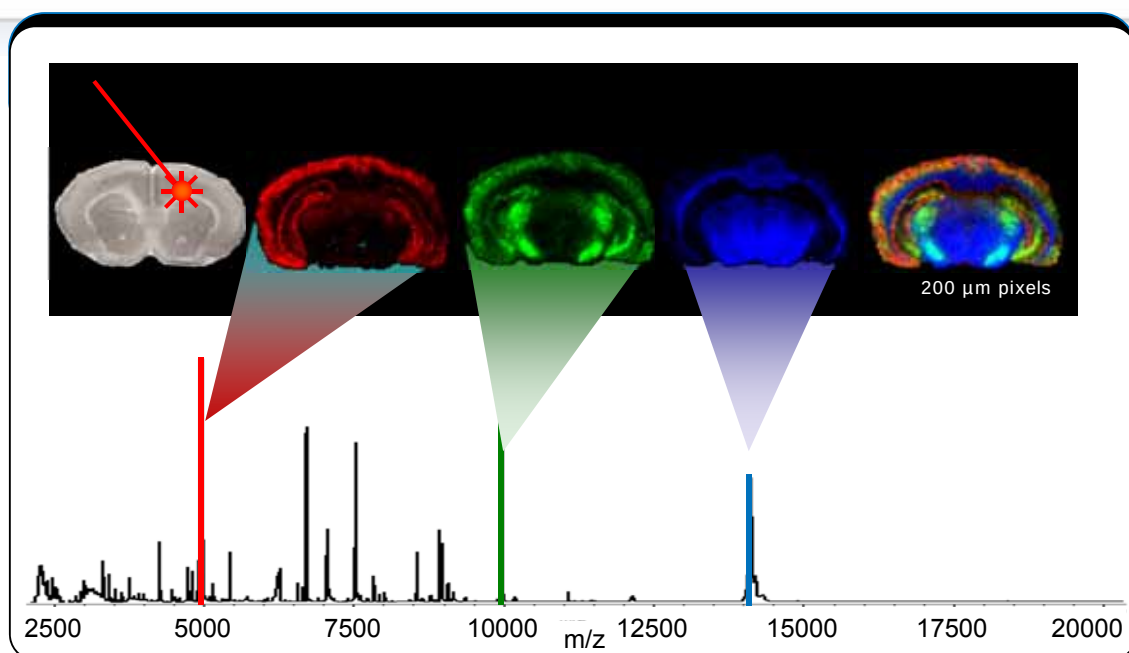


組織切片全体を
分割して測定

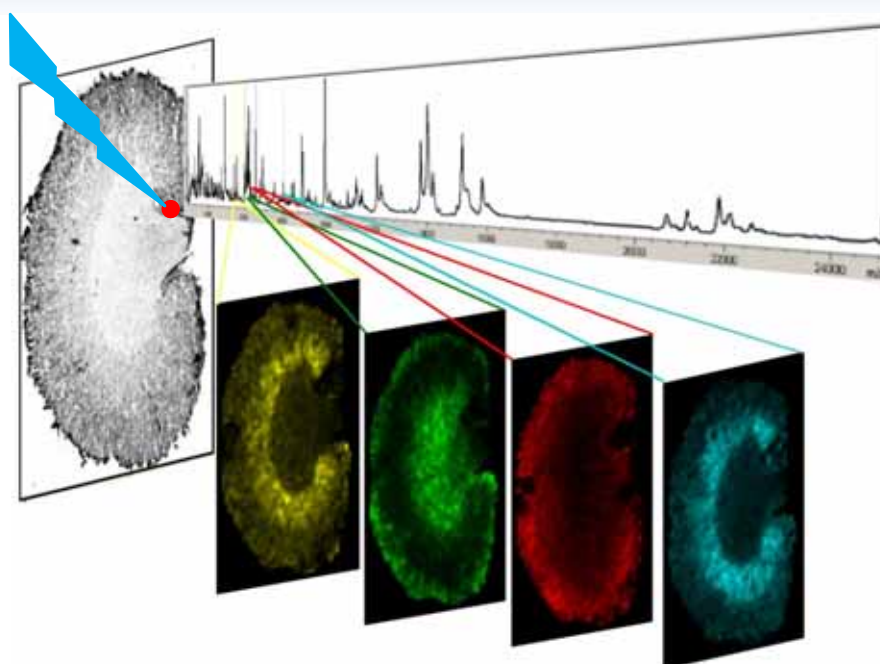
Modified from: Lottspeich, Zorbach, eds "Bioanalytik", Spektrum Akademischer Verlag, 1998
and M. Stoeckli et al. Analytical Biochemistry 311 (2002)33-39

MALDI-IMS

Research use only



MALDIイメージングの原理



- XYピクセル状にスペクトルを取得します
- 各シグナルは異なる物質を示します (タンパク質、ペプチド、薬物、代謝物など……)
- 各物質の分布は分子イメージに再構築されます



MALDI-MS



MALDI-TOF MS
autoflex speed



MALDI-TOF/TOF MS
ultraflexxtreme

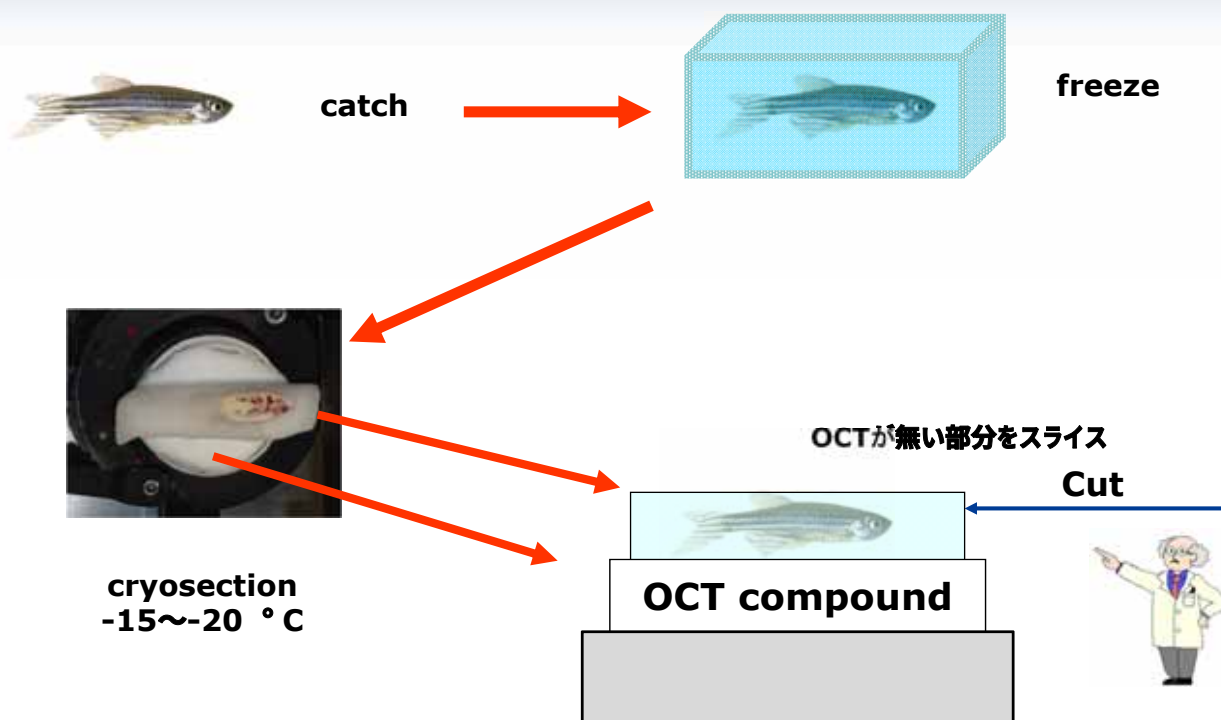
MALDI-TOF MSの特徴

高感度・高分解能
測定レンジが広い！

- タンパク質
- ペプチド
- 脂質
- 薬物 (低分子)
既知物質

selected reaction monitoring (SRM)

MALDIイメージング用凍結切片調製



MALDIイメージング用凍結切片調製-備品例



- クライオミクロトーム (Leica等)
- 凍結組織包埋剤 (OCTコンパウンド 等)
- 冷媒 (ドライアイス等)
- 溶媒
殺菌用アルコール、エタノール、リン酸緩衝液、milliQ水 等
- 組織洗浄用溶媒
洗浄溶媒1 : 70% エタノール水 (1%グリセロール含有)
洗浄溶媒2 : 70% エタノール水
洗浄溶媒3 : 100% エタノール
- Coplin Jar、シャーレ 等
- ITOコートスライドガラス: Glass Slides for MALDI Imaging : Part No. 237001
- スライドガラスアダプタ ターゲット: MTP slide-adapter II : Part No. 235380
- ドライヤー
- 真空乾燥器



Glass Slides for MALDI Imaging
Part No. 237001



MTP slide-adapter II
Part No. 235380

MALDI-IMS

Research use only

MALDIイメージング用凍結切片調製-薄切



- 凍結組織
OCT compoundを使用しない
- クライオミクロトーム
凍結切片 10 ~ 20 μm (10~12 μm が適当)
- 導電性スライドガラス (凍結) に保持
(#237001 Glass Slides for MALDI Imaging :BDAL)
- 真空乾燥

MALDI-IMS

Research use only

切片作成後の処理方法例

- 5分間真空乾燥 (脳の場合は45分)
切片をスライドガラス表面に固定します
- *70%EtOH (シャーレ等) で15から30秒洗浄-1回目
- *70%EtOH (シャーレ等) で15から30秒洗浄-2回目
- *96%EtOHもしくはpure EtOH (シャーレ)で15秒洗浄
- 真空乾燥
- 保存

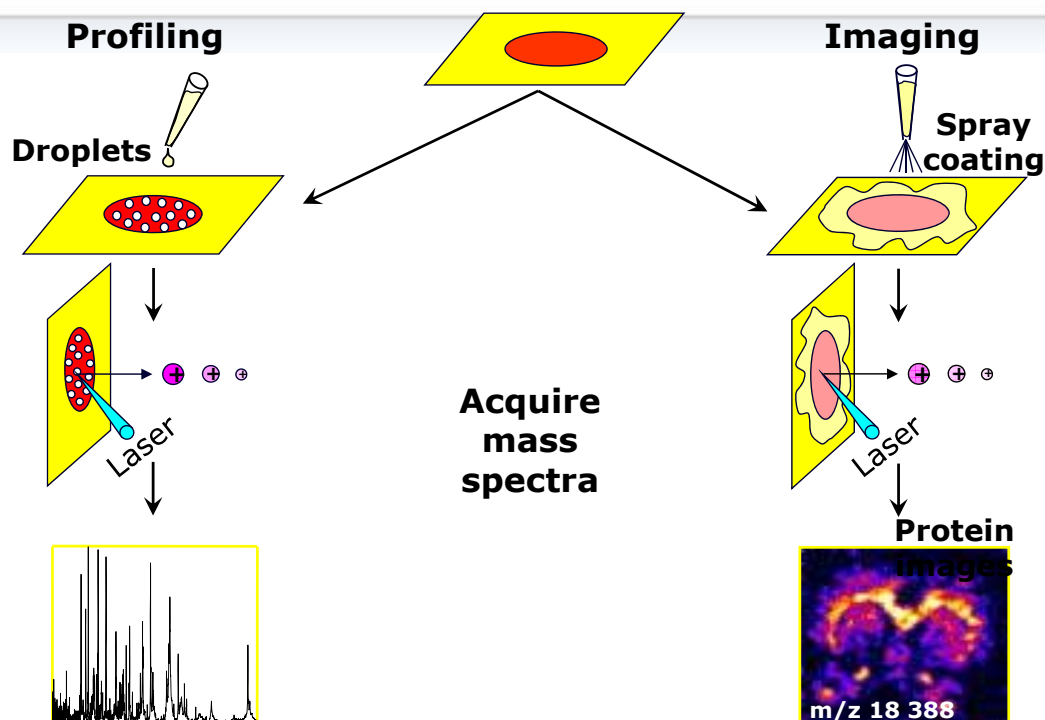
長期保存の場合は、アルミホイル等で包み冷凍する

***注意**

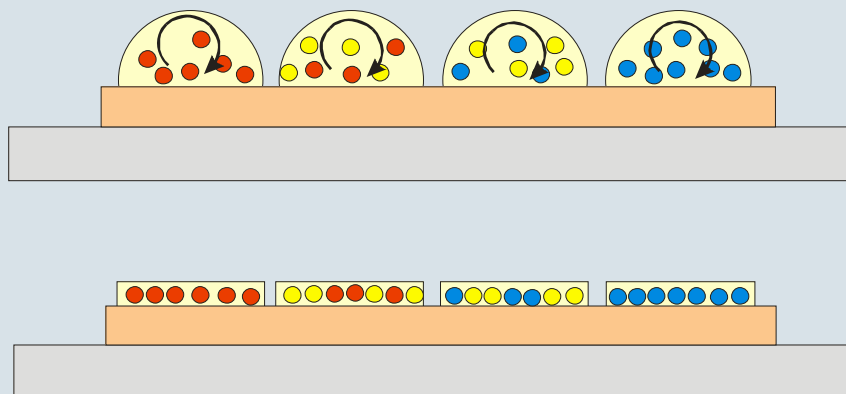
- Neuropeptide等のペプチドを測定する場合は、各ステップを短時間で行う
- 薬物および脂質を測定する場合は、洗浄ステップを行わずに測定する

"Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation" Schwartz SA, Reyzer ML, Caprioli RM, J. Mass Spectrom. (2003); 38(7): 699-708

マトリックス添加方法



液滴内部では、非局在化が発生します



大きな液滴: 良質なスペクトルが得られますが空間分解能は低下します

マトリックス溶液スプレー



エアースプレー

スプレーの微調整が可能
良好のコーティングが可能
マトリックス消費量: 約1ml

洗浄および使用頻度によりメッキ部分から銅が溶出し、銅アダクトピークが検出される場合がある
酸に弱い



TLC-Sprayer

ガラス製であるために銅アダクトの心配が無い

スプレーの微調整が困難
一度に多量のマトリックスを消費する
マトリックス消費量: 約10ml

乾燥窒素
圧縮空気 (オイルレス)



コンパクトな装置
タッチパネル式コンピュータ内蔵

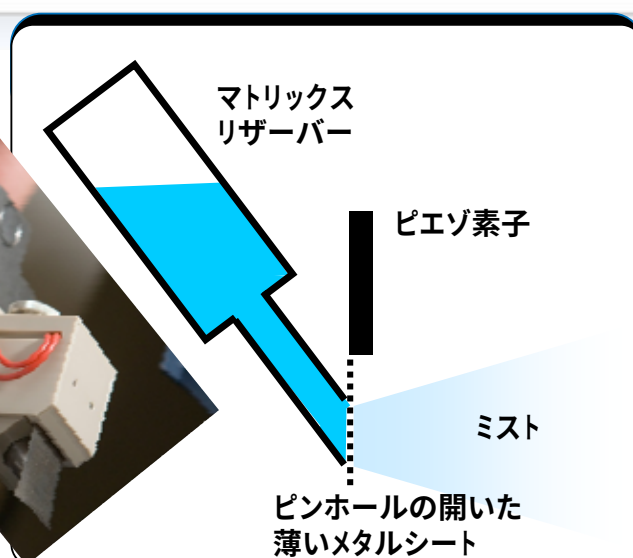
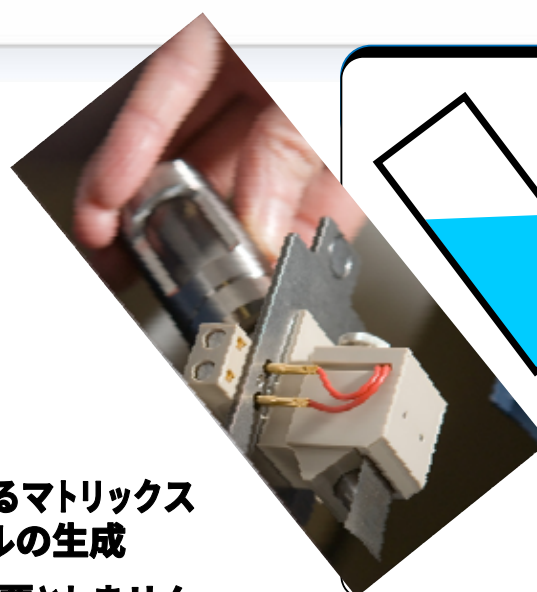


スプレーヘッド
光学センサー内蔵
テフロンコーティングスプレーチャンバー



スプレーヘッドと
マトリックスリザーバー

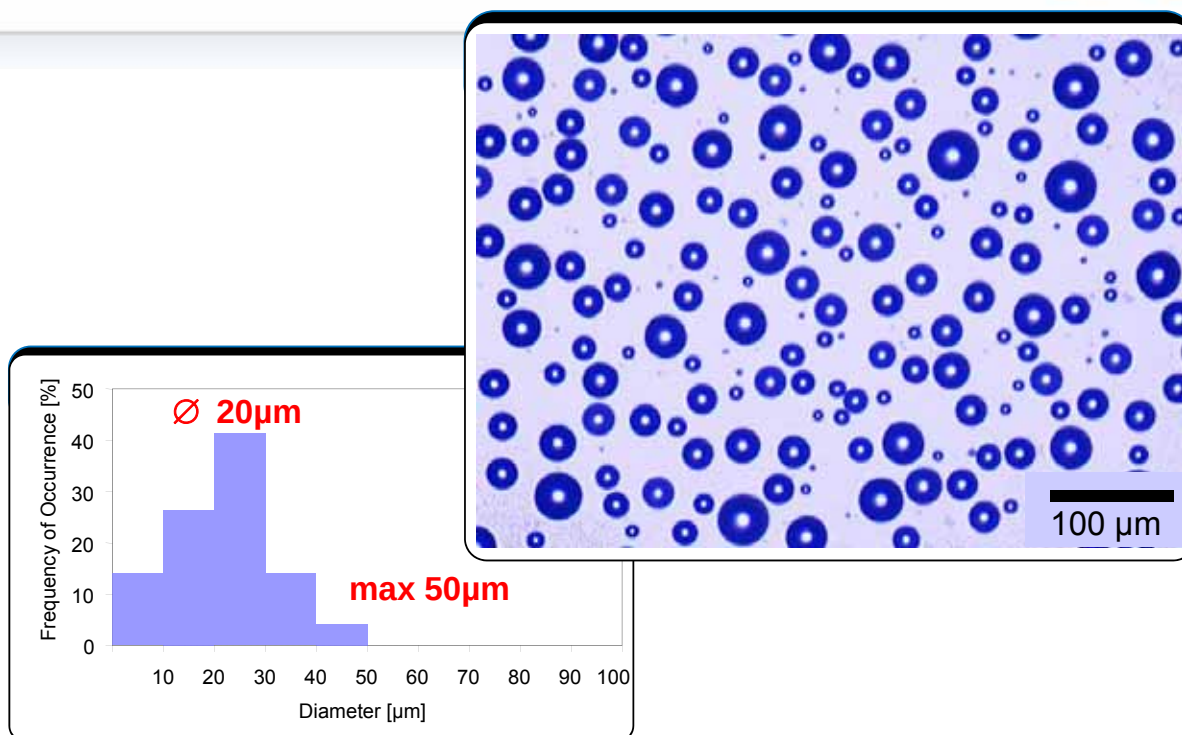
ImagePrep マトリックスミストの生成



- ・ 振動気化法によるマトリックス
エアロゾルの生成
- ・ ノズル、ガスを必要としません
- ・ ソフトな重力による液滴の添加
最適な湿度コントロール

ImagePrep スプレーヘッド

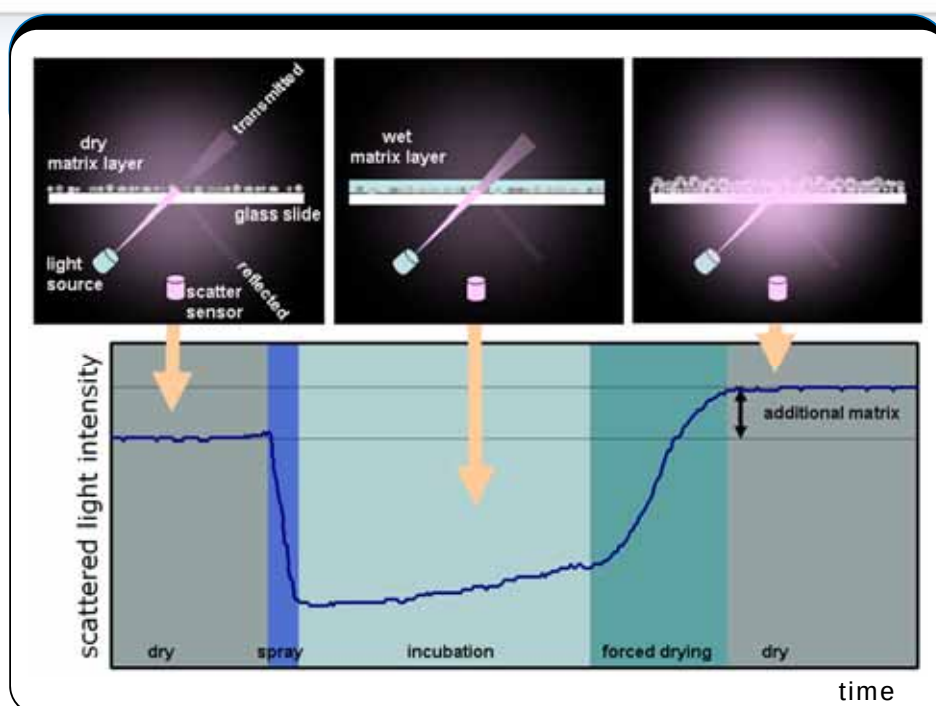
液滴のサイズ分布



MALDI-IMS

Research use only

光学センサー

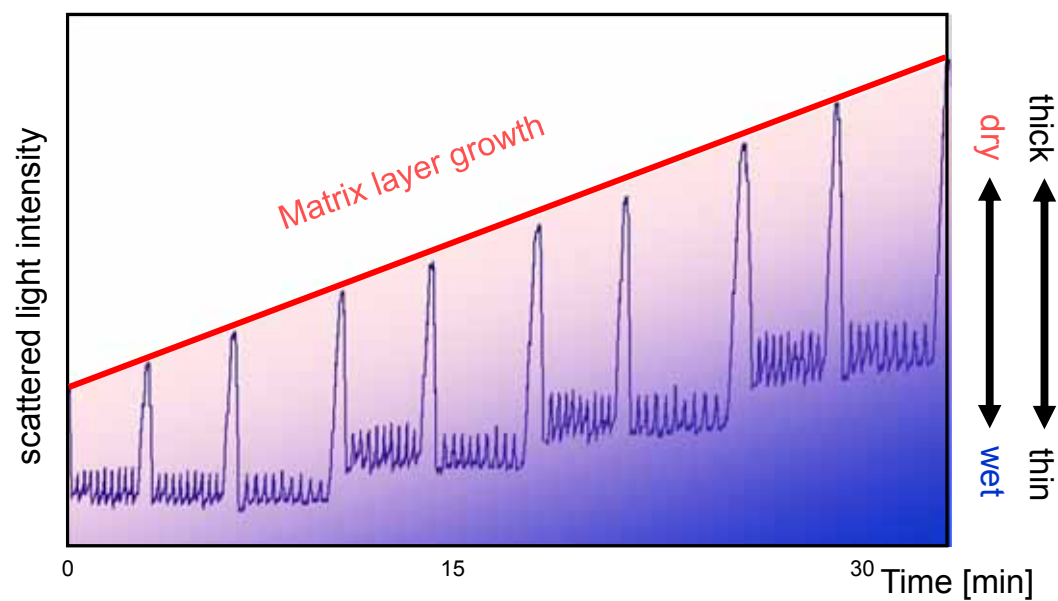


典型的なスプレーサイクルの散乱光強度

MALDI-IMS

Research use only

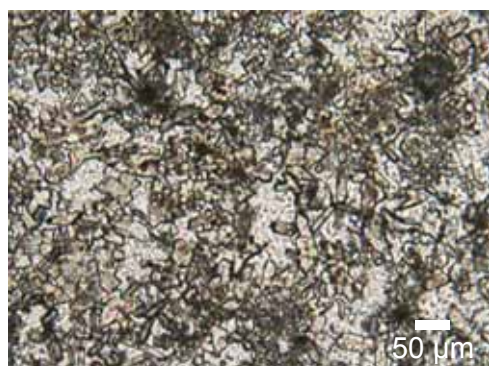
マトリックス調製工程の例



MALDI-IMS

Research use only

結晶形の例



ImagePrep (50µm crystals)

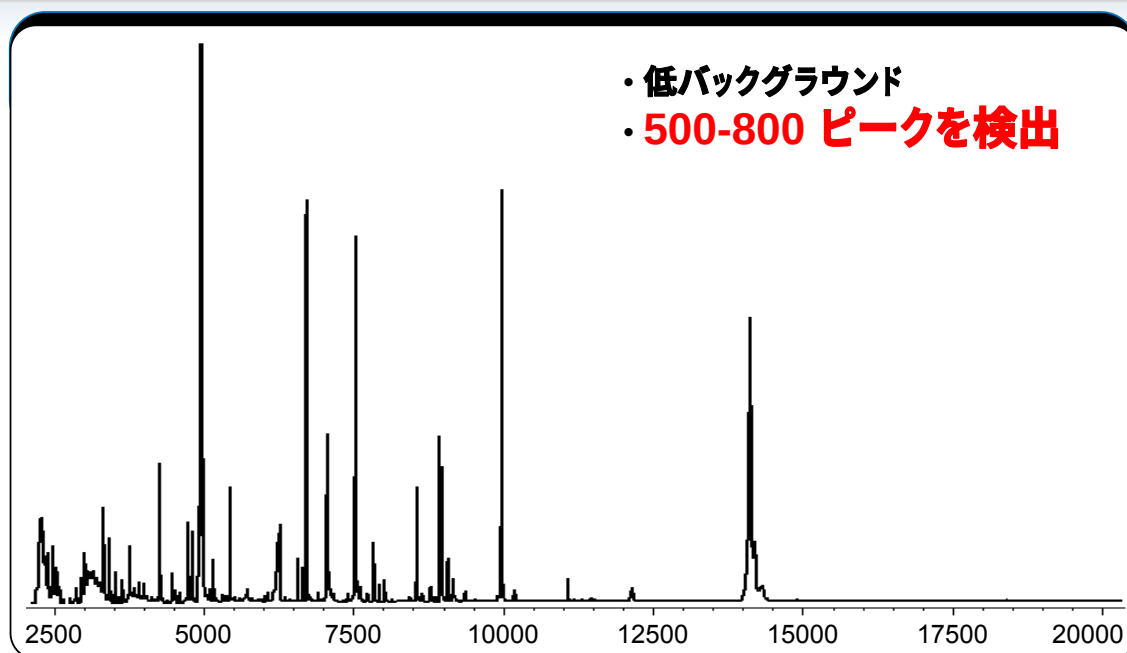


マニュアルスプレー

Sinapinic acid (20g/l in 50% acetonitrile)

MALDI-IMS

Research use only

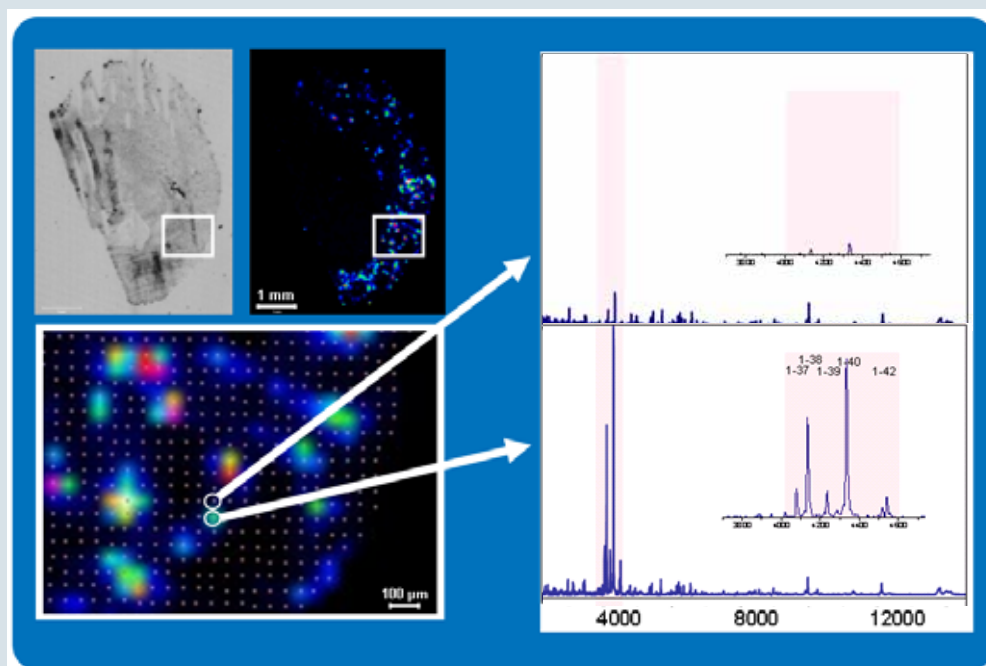


脳のTICスペクトル(全スペクトルの総和)

ペプチド・タンパク質領域

MALDI-IMS

ImagePrepデータ例



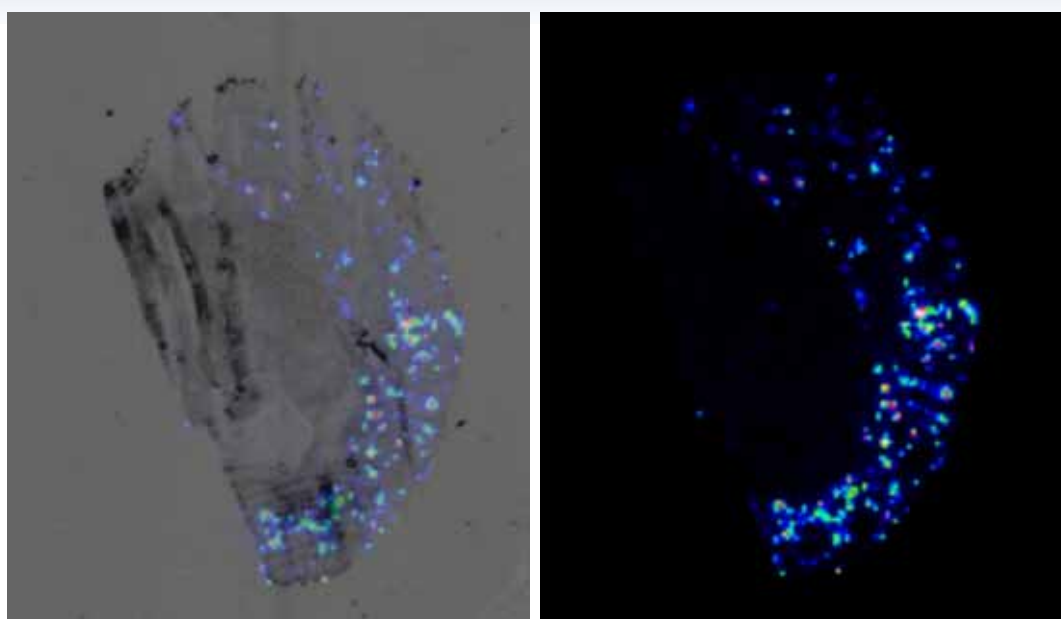
アルツハイマー
モデルマウス脳
空間分解能: 50 μm

Sample by courtesy of:
Matthias Riemenschneider
Neurochemistry and
Neurogenetics,
Dept. of Psychiatry and
Psychotherapy
Klinikum rechts der Isar,
Munich

MALDI-IMS

Research use only

空間分解能: 50 μm アルツハイマーマウス脳のイメージングMS

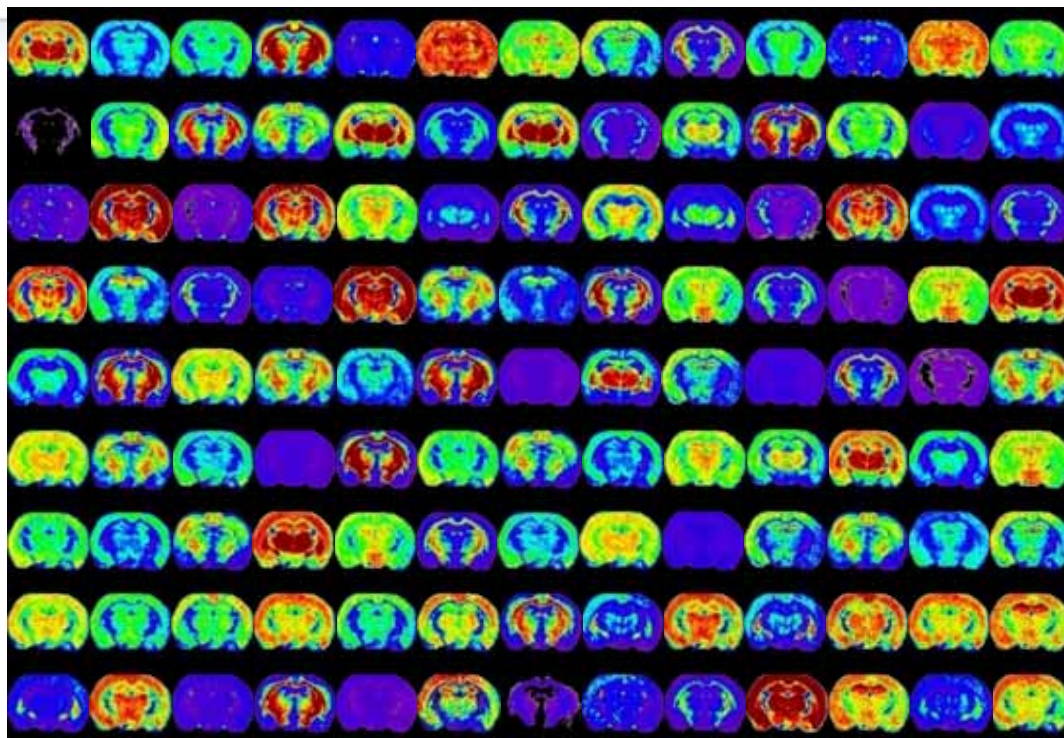


MALDI-IMS

Research use only

マウス脳切片から得られたイメージ

各イメージはそれぞれ異なる分子量を可視化 (前データセットの約1/5)

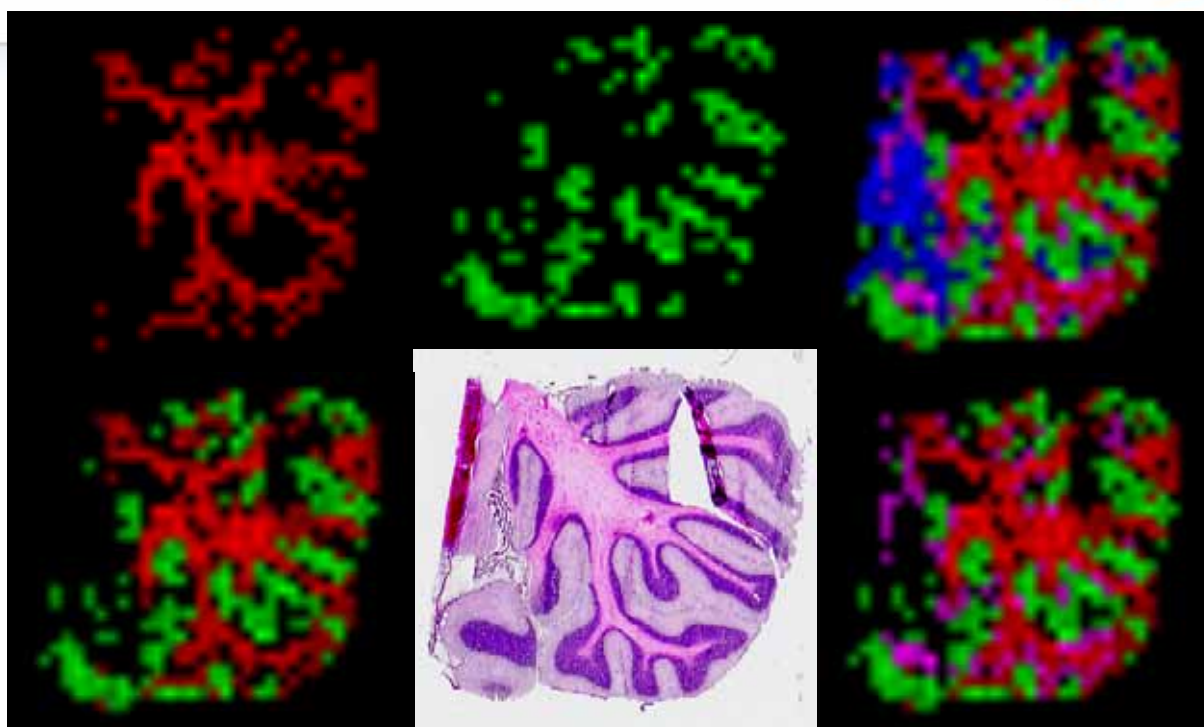


Richard Caprioli, Vanderbilt Univ. TN-USA

MALDI-IMS

Research use only

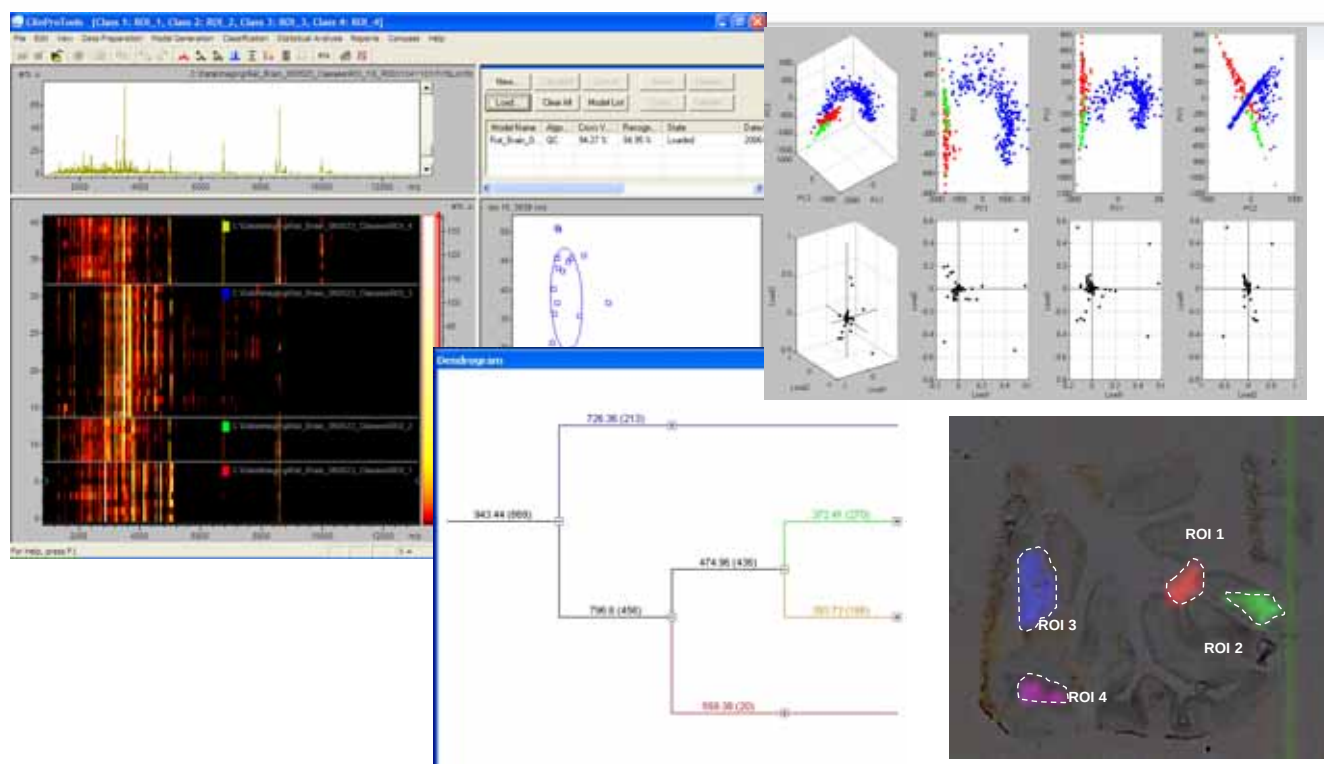
fleximaging (Imaging MSソフト) と ClinProTools (統計解析ソフト) の連携



MALDI-IMS

Research use only

主成分分析 & クラスタ解析



MALDI-IMS

Research use only

ガン研究におけるMALDIイメージング



腫瘍



質量分析/プロテオミクス
スペシャリスト

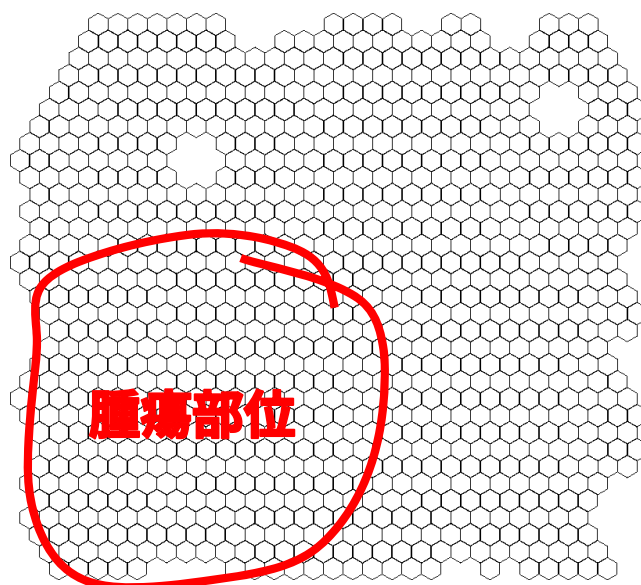


臨床医/病理学者

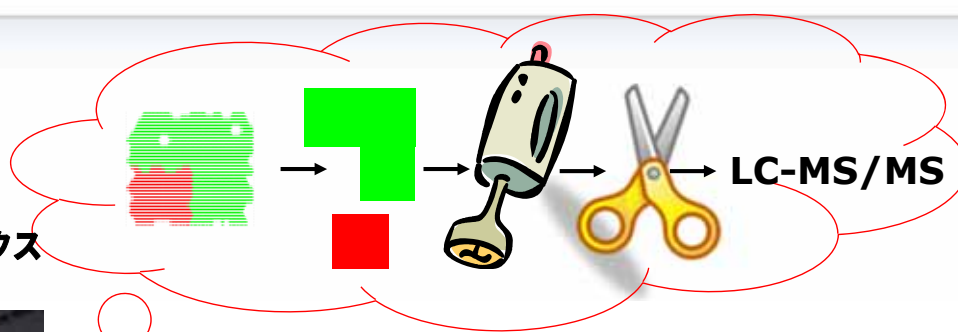
MALDI-IMS

Research use only

- 組織サンプルにおけるタンパク質の局在分布は、有用な情報が含まれています
- 右図は、組織サンプル中に腫瘍部位が存在する模式です



質量分析/プロテオミクス
スペシャリスト

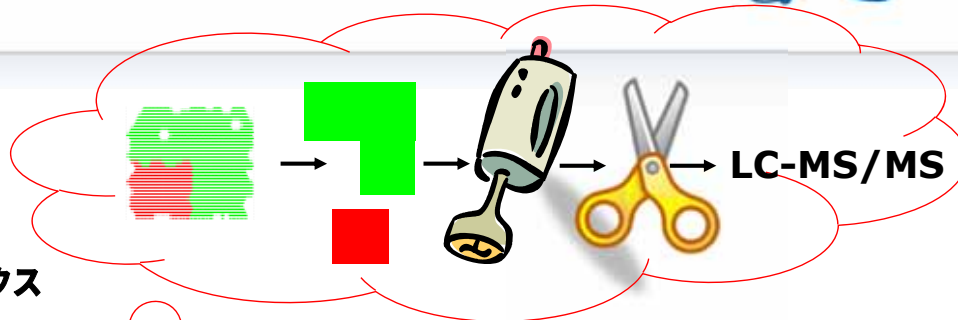


腫瘍部位を切り取り、ショットガン解析により
マーカータンパク質を解析すれば良い！！

ガン研究におけるMALDIイメージング



質量分析/プロテオミクス
スペシャリスト



腫瘍部位を切り取り、ショットガン解析により
マーカータンパク質を解析！！

同定されたタンパク質：1000種類



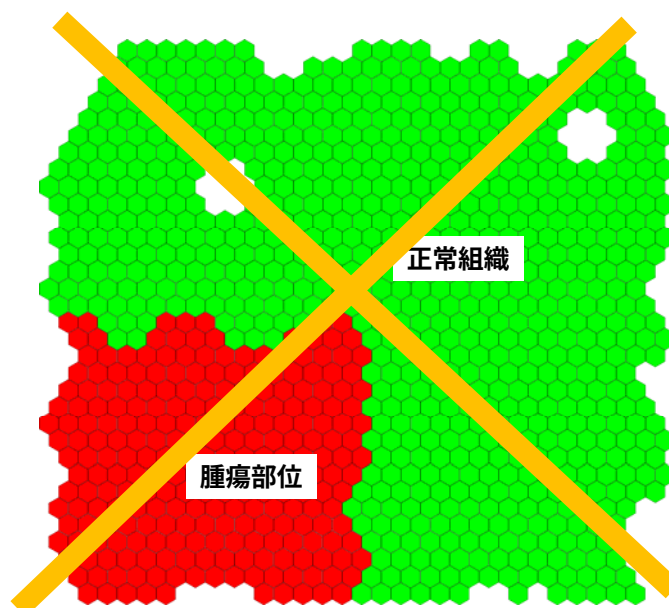
MALDI-IMS

Research use only

ガン研究におけるMALDIイメージング

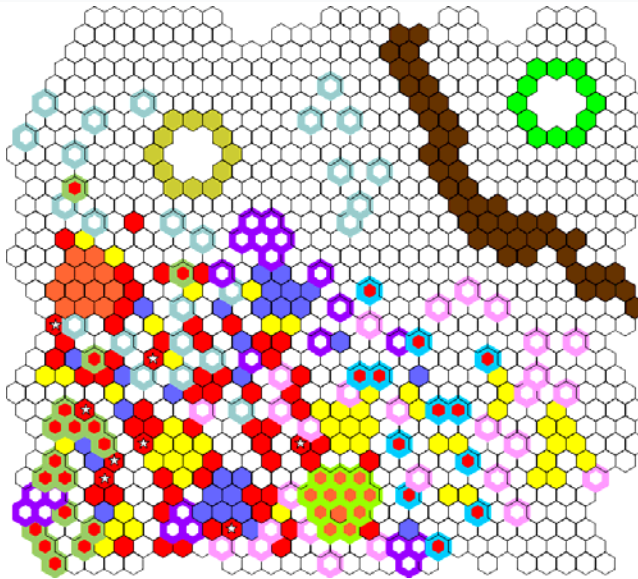


- 現実には右図のような単純なモデルでは表現できません
- 単純なモデルでは不十分です



MALDI-IMS

Research use only



浸潤性の腫瘍細胞

カルシノーマ インサイチュ(初期段階の腫瘍)

悪性新生物(前ガン細胞)

上皮細胞

リンパ球の浸潤

炎症

結合組織

腫瘍は、複合的な細胞集団で構成されています:

腫瘍幹細胞(*)

異なるステージ

異なるクローン

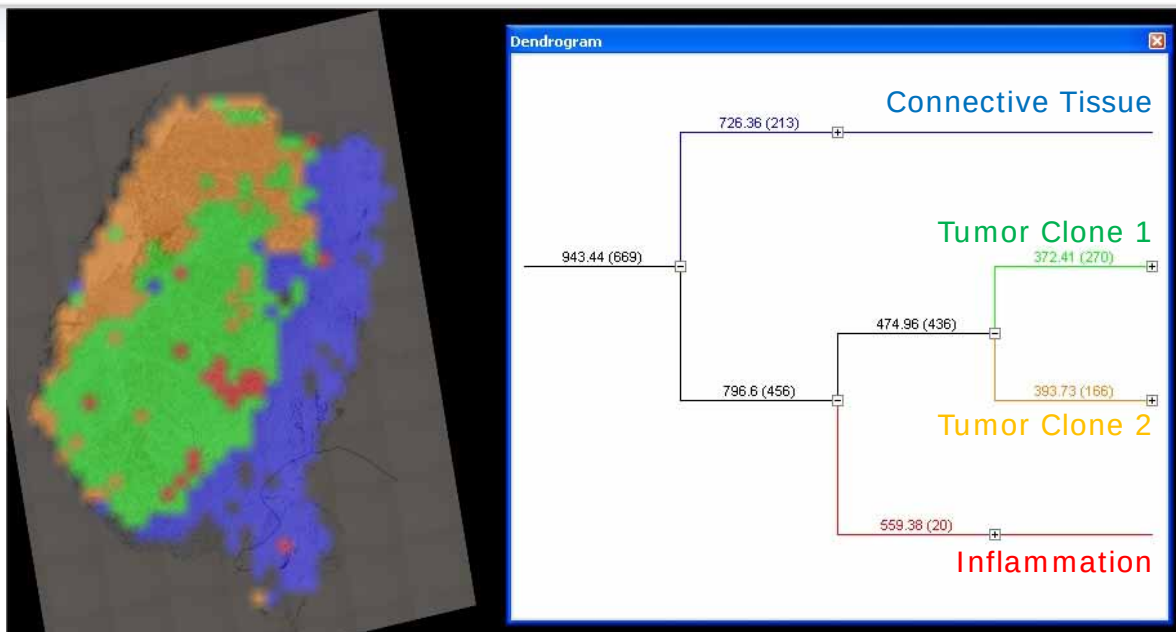
腫瘍の周辺環境(ストローマ)が、腫瘍そのものに影響します:

腫瘍内微小環境

分子生物学的に見た細胞の分化

ガン研究におけるMALDIイメージング





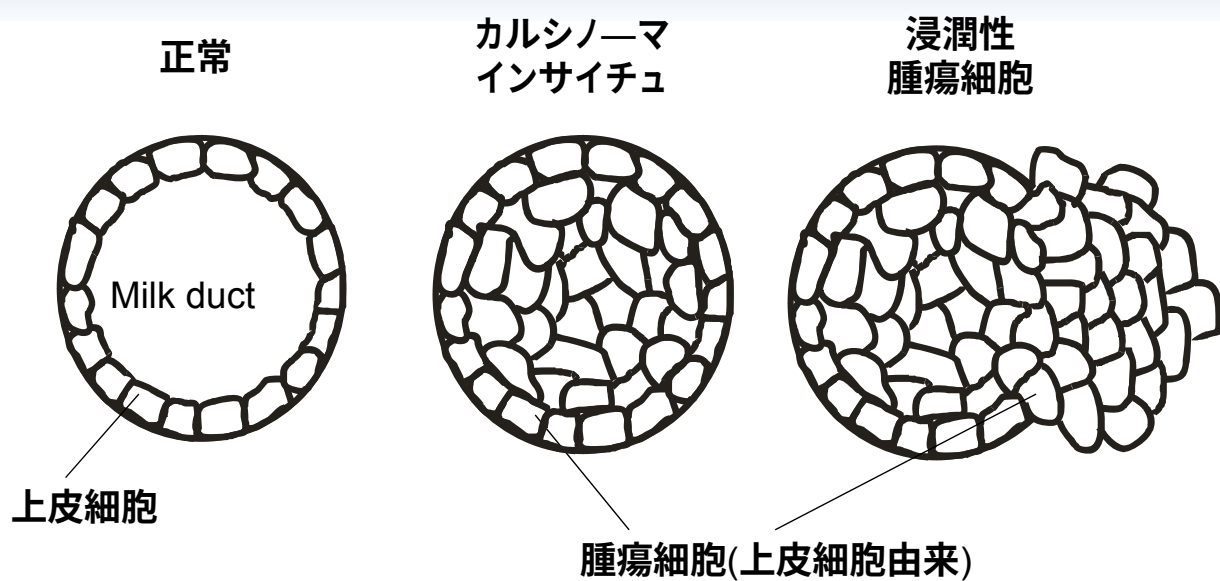
Deininger, S., Ebert, M., Fütterer A., Gerhard M., Röcken, C. (2008)
J. Proteome Res. 7(12), 5230-5236

MALDI-IMS

Research use only

Research use only

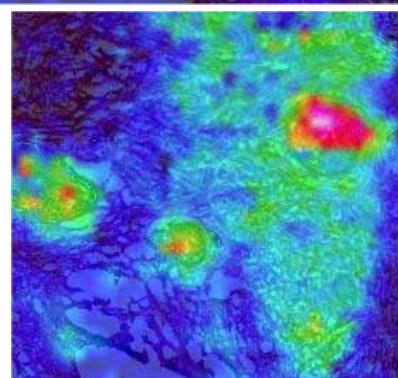
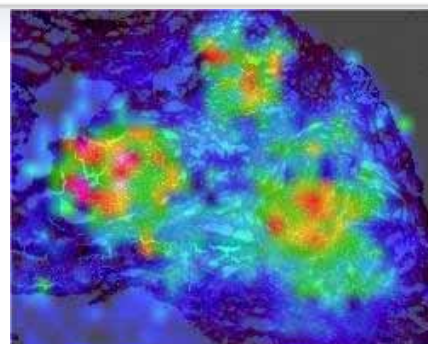
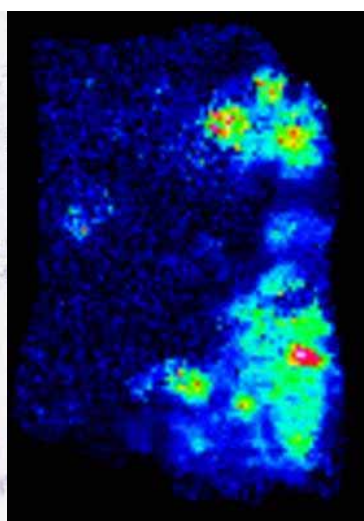
ヒト乳がん



MALDI-IMS

Research use only

乳がんのMALDIイメージング

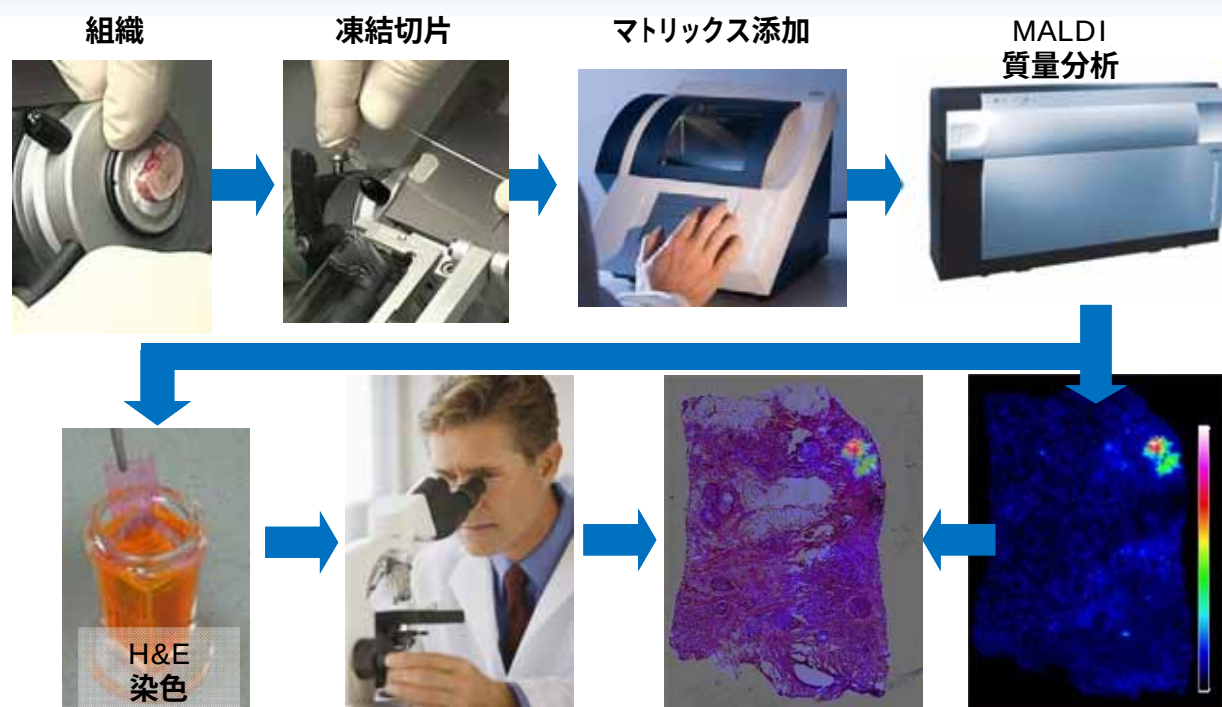


ガン部位

MALDI-IMS

Research use only

MALDIイメージングワークフロー 顕微鏡画像と統合



MALDI-IMS

Research use only

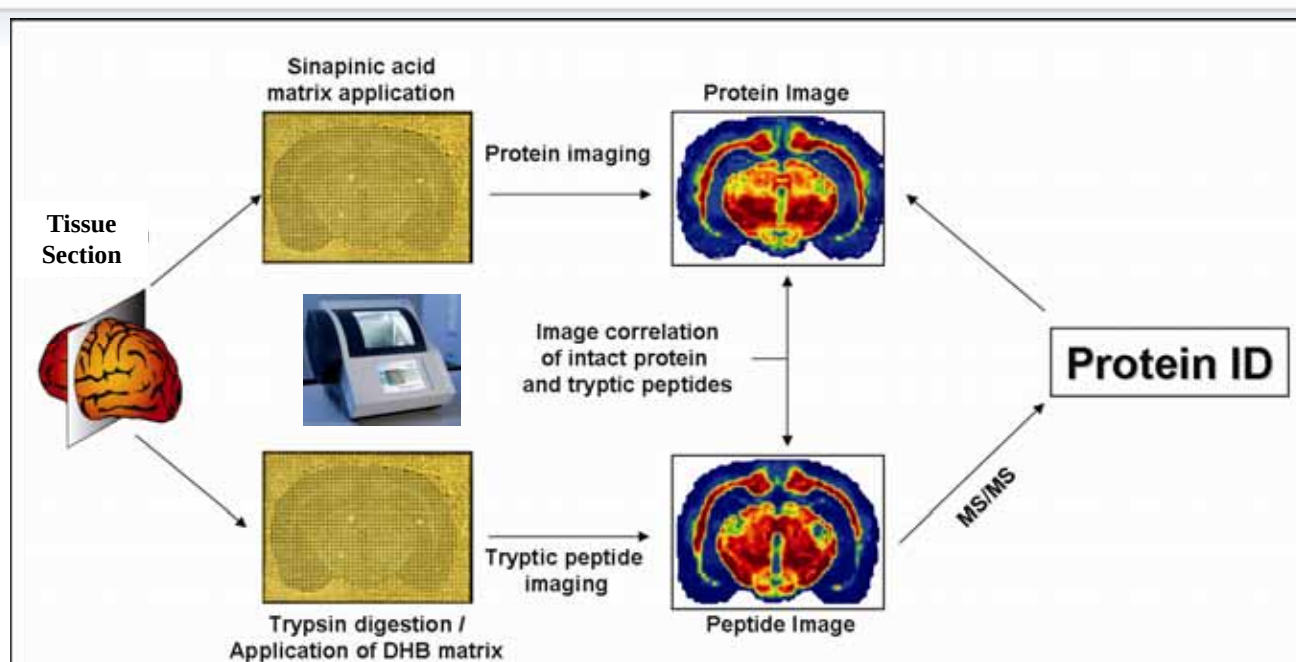
ペプチド・タンパク質の同定

MALDI-IMS

MALDI-IMS

Research use only

組織から直接タンパク質の同定



Groseclose *et al.*, J. Mass Spectrom. 42, 254-262 (2007)

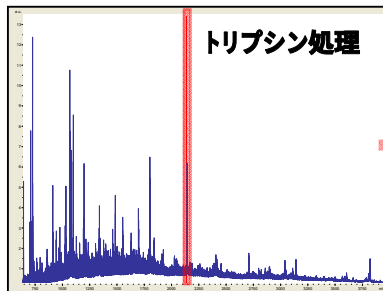
MALDI-IMS

Research use only

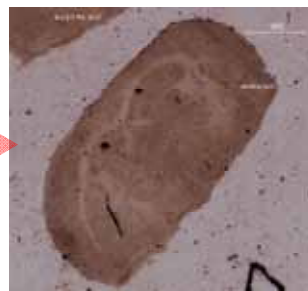
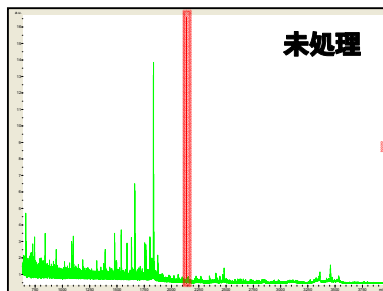
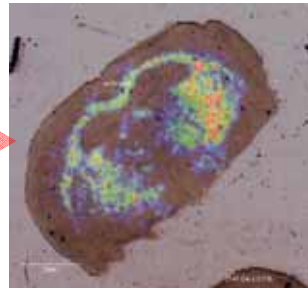
トリプシン処理 vs. 未処理



平均スペクトル



m/z 2141 (MBP) を可視化



- トリプシンで処理を行うことでスペクトルパターンが大きく変化。トリプシン消化物ペプチドのシグナルが多数観測。
- 任意のシグナルを選択し、TOF/TOFによるLIFT測定を行うことで得られるMS/MSフラグメンテーションスペクトルをデータベース検索(MASCOT)することによって組織切片からの直接タンパク同定が可能。

MALDI-IMS

Research use only

例) m/z 2141 Myelin Basic Protein



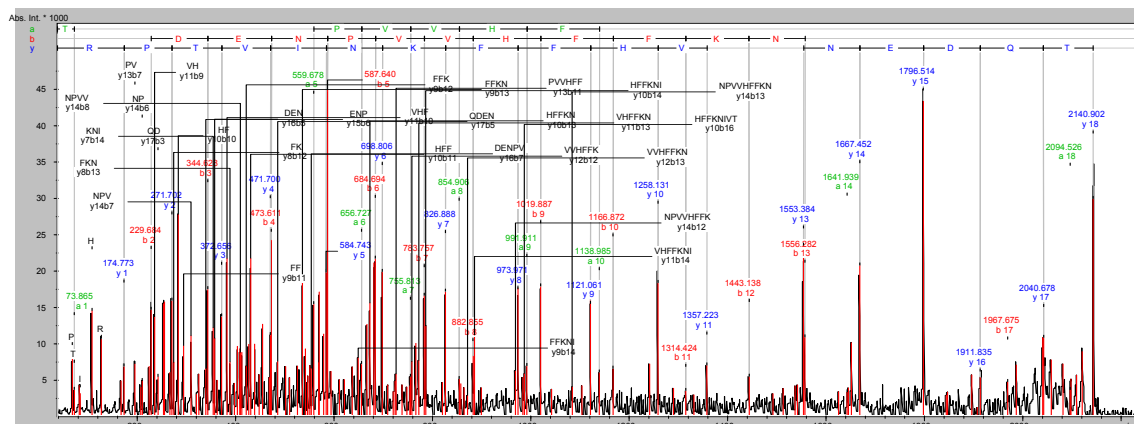
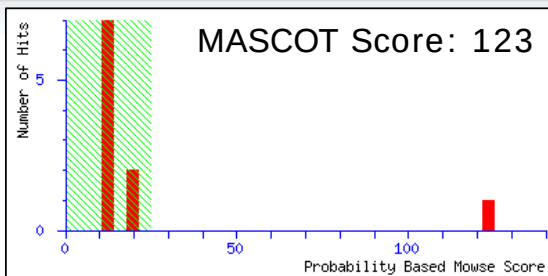
トリプシン処理



未処理



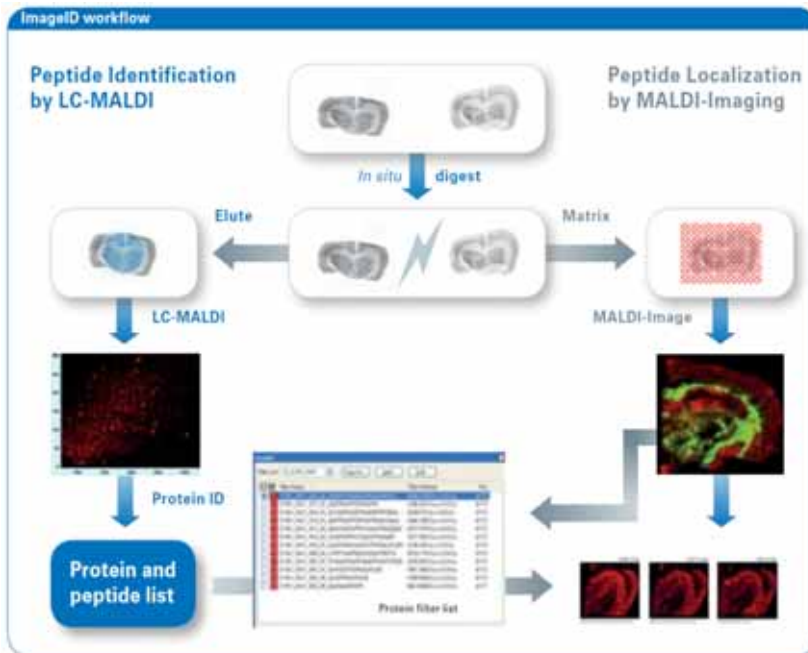
MASCOT Score: 123



MALDI-IMS

Research use only

ImageID™ ワークフロー

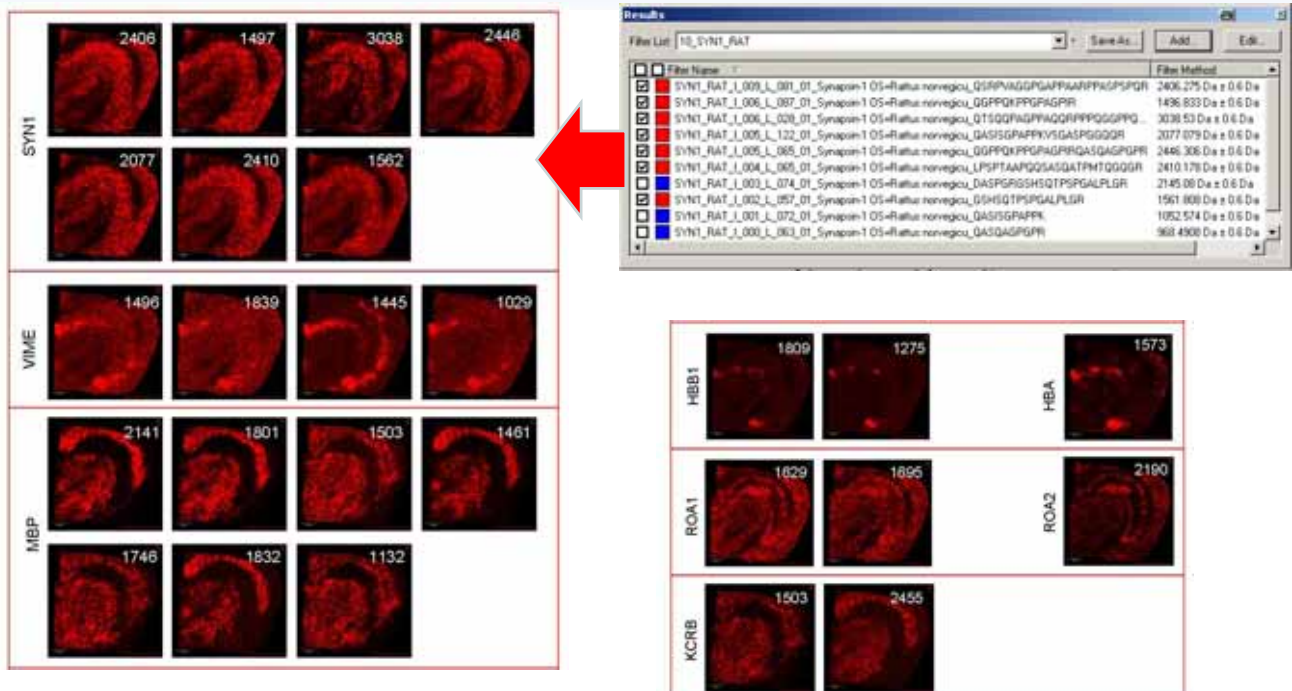


- MALDIイメージングと LC-MALDIの統合アプローチ
- FFPE (ホルマリン固定) 組織および巨大タンパク質の解析が可能

MALDI-IMS

Research use only

空間的プロテオミクス



MALDI-IMS

Research use only

低分子・脂質領域

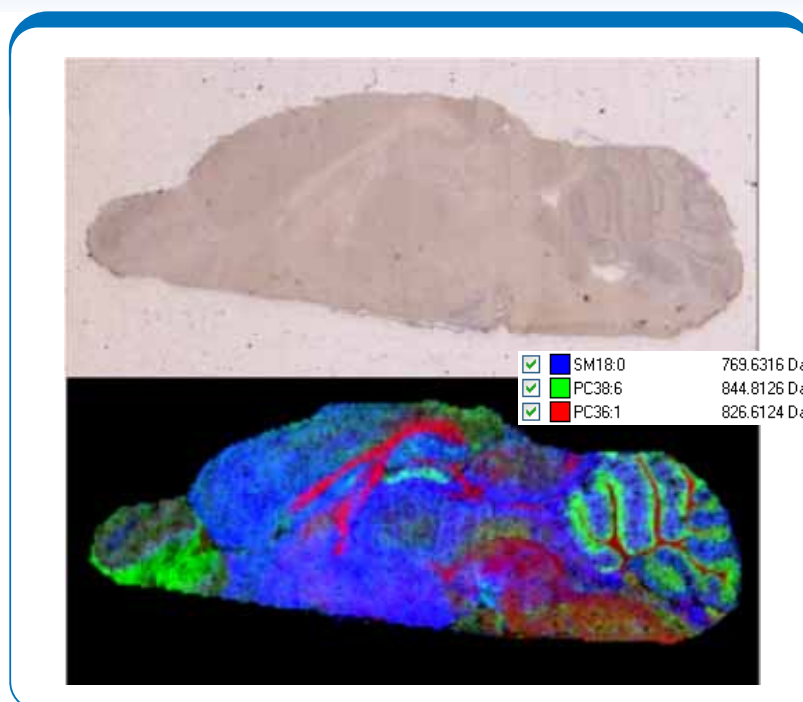
MALDI-IMS

MALDI-IMS

Research use only

MALDI Imaging — 脂質の分布

空間分解能: 20 μ m



MALDI-IMS

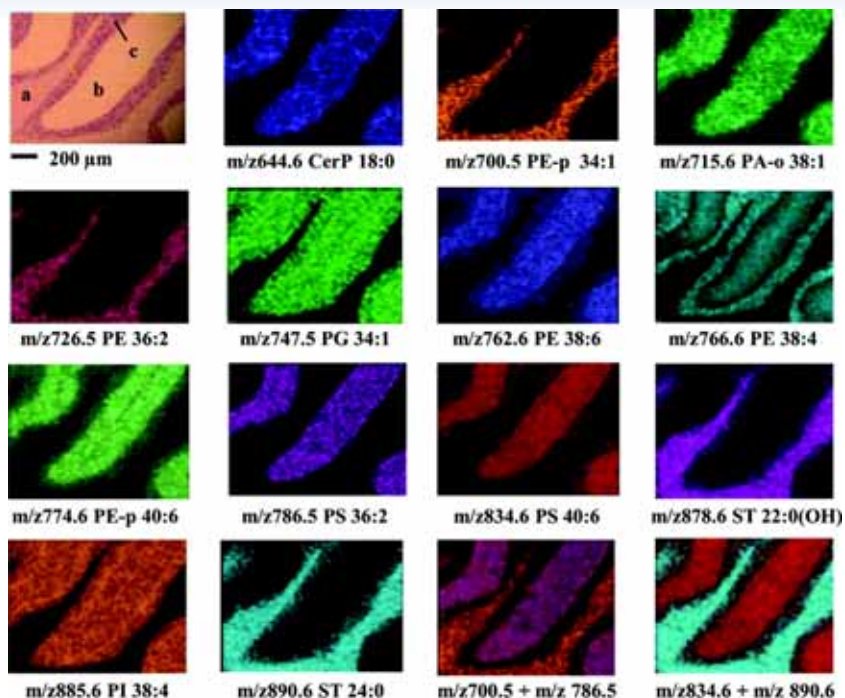
Research use only

Lipid Imaging at 10 μ m

Smartbeam laser: Industry-leading performance
in MALDI imaging at 2 kHz



Different lipid species in mouse brain measured at a spatial resolution of 10 μ m on an ultrafleXtreme.



from:
Chaurand P et al.

Sublimation of new matrix candidates for high spatial resolution imaging mass spectrometry of lipids: enhanced information in both positive and negative polarities after 1,5-diaminonaphthalene deposition.

Anal Chem. 2012;84(4):2048-54

MALDI-IMS

Research use only



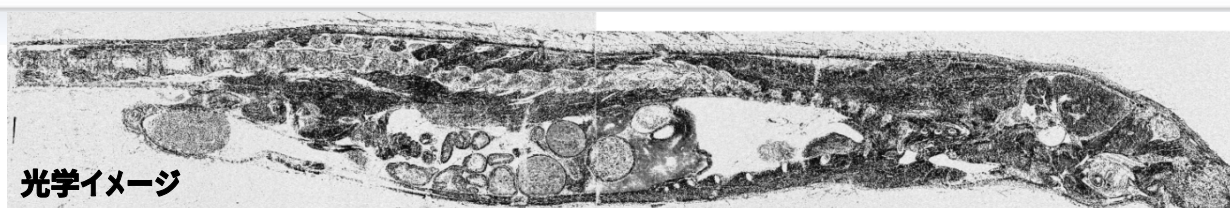
低分子
薬物

MALDI-IMS

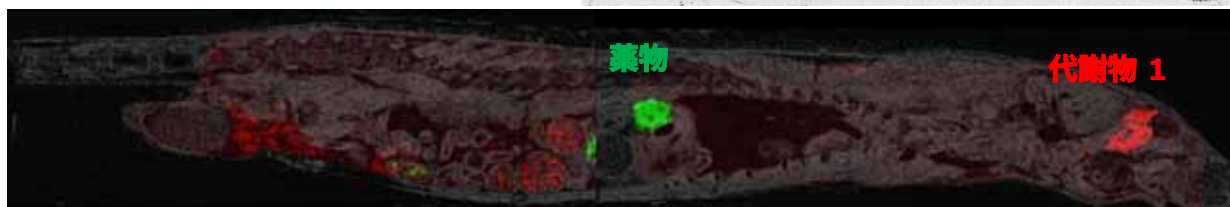
MALDI-IMS

Research use only

ラット全身：薬物・代謝物のイメージング



光学イメージ

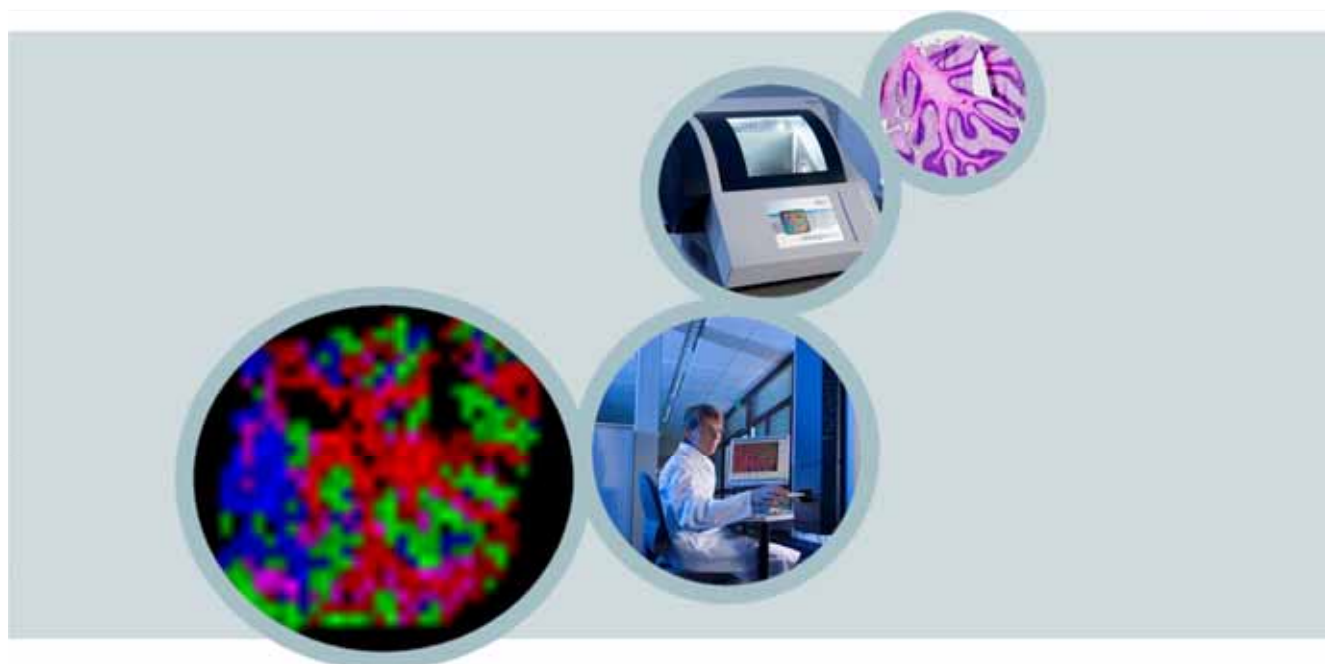


MALDIイメージングは、薬物イメージングのための放射性標識を必要とせず、薬剤と代謝物を区別することができます

MALDI-IMS

Research use only

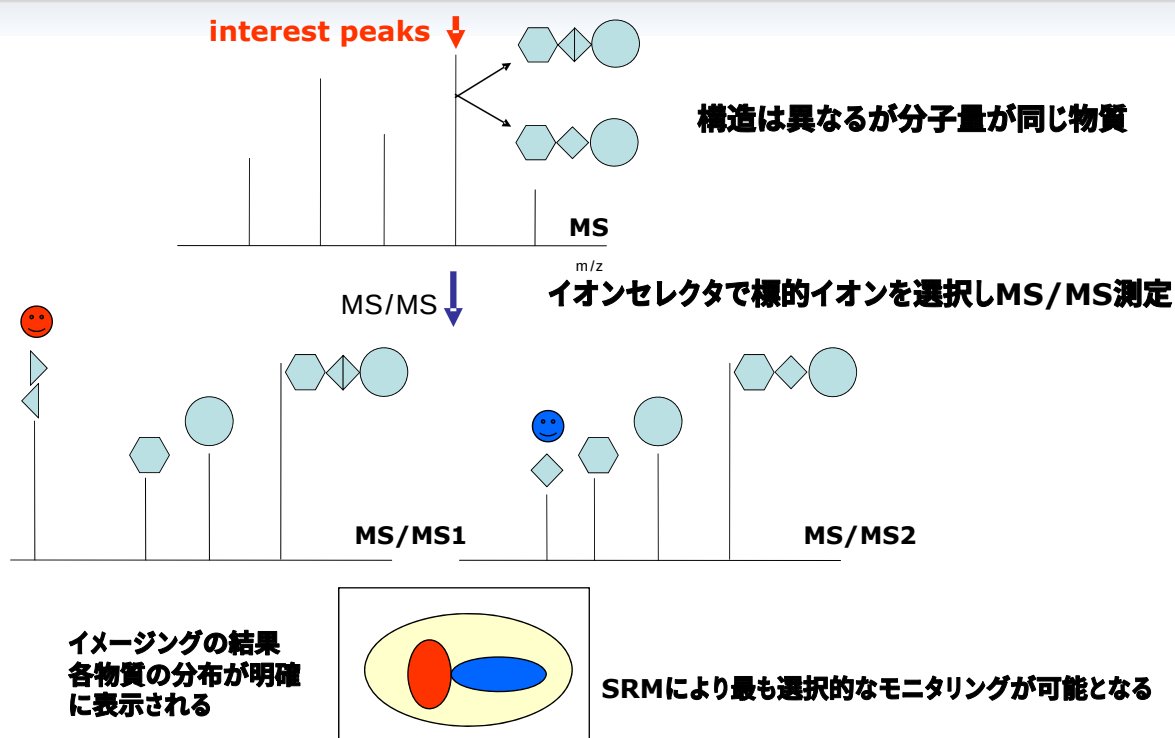
SRM (Selected Reaction Monitoring) によるImagingMS



MALDI-IMS

Research use only

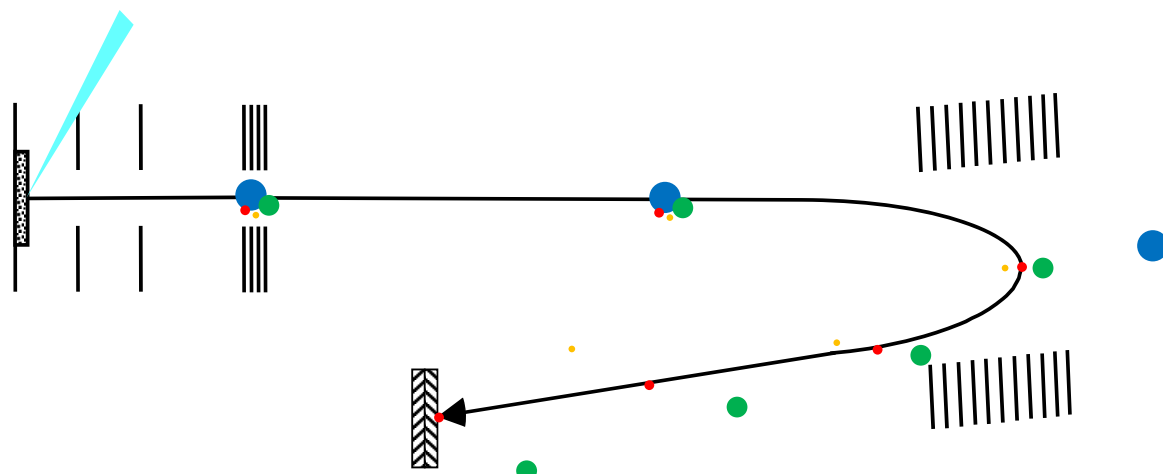
MALDIイメージングの新機能 SRM (Selected Reaction Monitoring)



MALDI-IMS

Research use only

FAST-SRM Imaging



MALDI-IMS

Research use only

FAST-SRM設定



プリカーサ、プロダクトイオンを入力

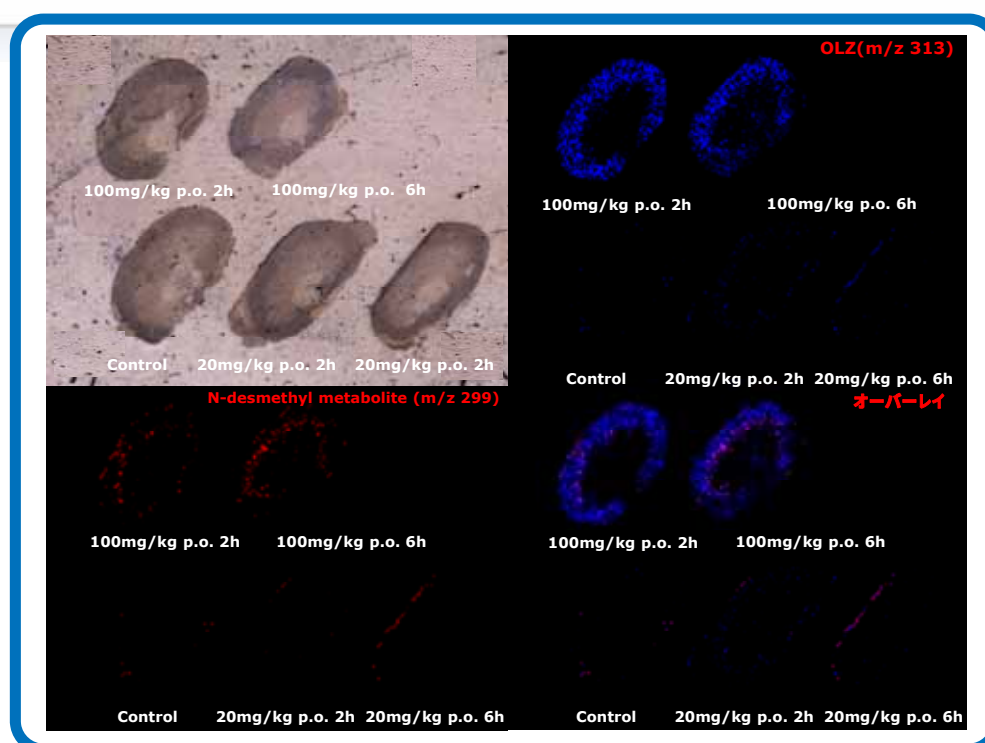
自動的に最適なリフレクタ電圧が算出される

MALDI-IMS

Research use only

オランザピン(OLZ)

MS-IMS

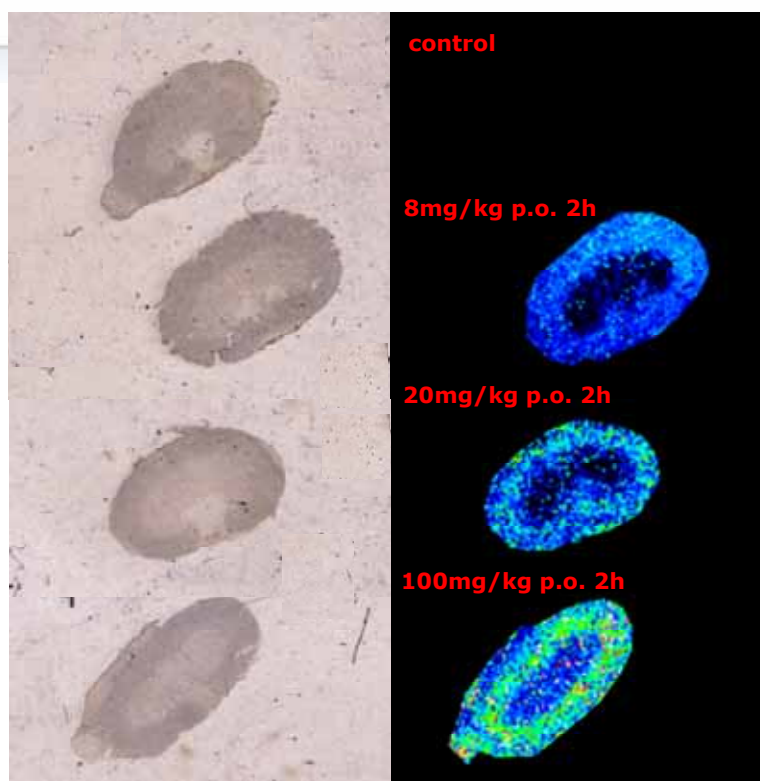


MALDI-IMS

サンプル提供：京都府立医科大学 池川雅哉 先生

Research use only

オランザピン(OLZ) SRM-IMS(m/z 313->256)



MALDI-IMS

Research use only

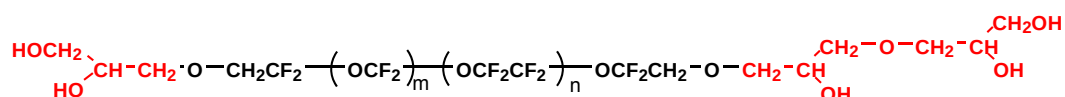
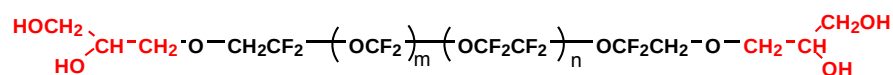
ハードディスク表面潤滑剤の直接質量分析



MALDI-IMS

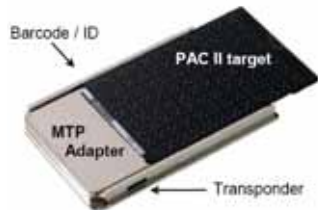
Research use only

末端基の異なる2種類の混合物



準備:ターゲットプレートへのマウント

使い捨てターゲット用アダプタ

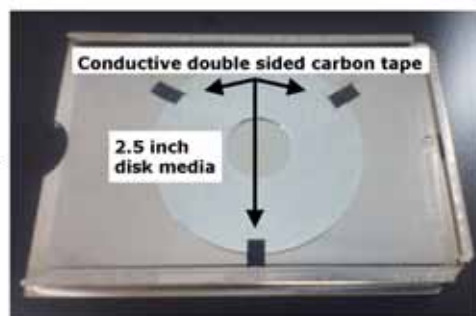
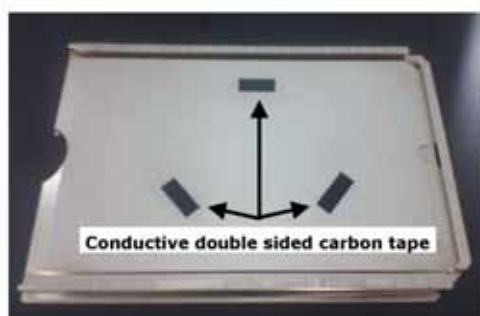


SEM用カーボンテープ

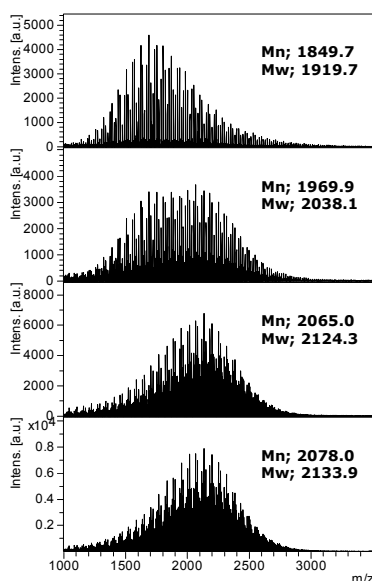


に

で貼付



塗布前溶液からの通常測定



sample 1

PFPE A:B
mix ratio
100 : 0

sample 2

PFPE A:B
mix ratio
98 : 2

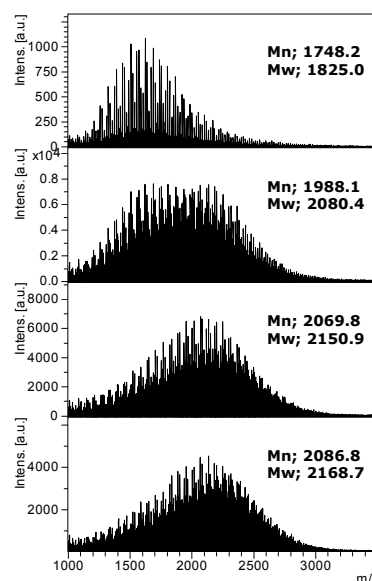
sample 3

PFPE A:B
mix ratio
79 : 21

sample 4

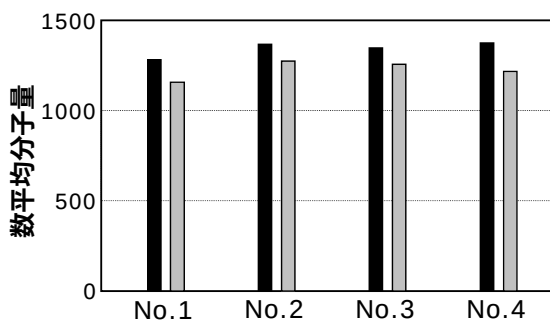
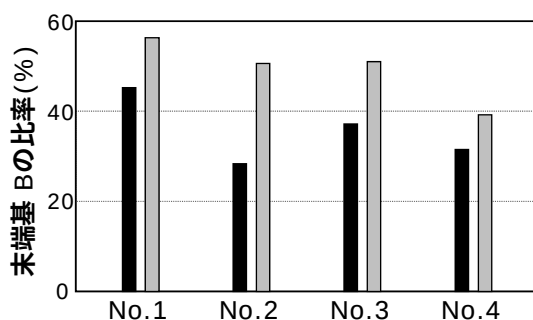
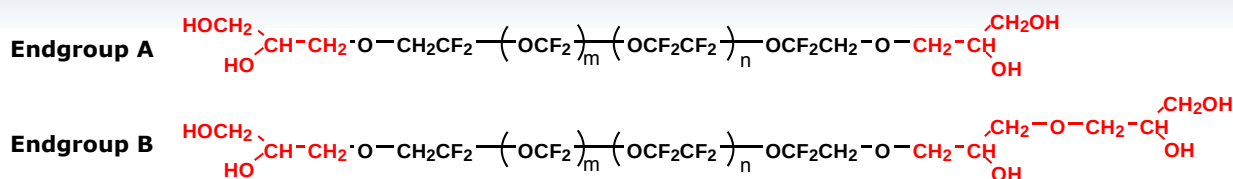
PFPE A:B
mix ratio
0 : 100

ハードディスクからの直接測定



実際の工業部品上の単分子膜からでも通常測定と同様の測定が可能

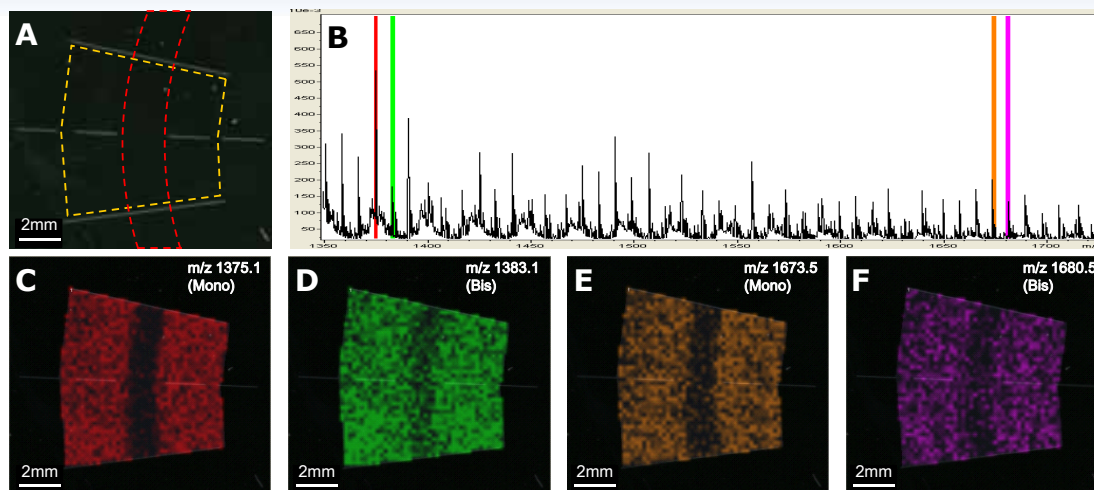
実験1：ハードディスクメディア大量生産時の変化



■ 原料溶液
□ ディスクサンプル直接測定

No.1 大量生産開始時
No.2 大量生産終了時
No.3 No.2原料溶液成分調整後大量生産 (2回目) 開始時
No.4 No.3を用いた大量生産 (2回目) 後

実験2:劣化試験後評価 (Imaging MS)



A; ハードディスク表面写真; 赤枠・・・劣化試験領域/黄枠・・・測定範囲
B; 平均スペクトル (約1500スペクトル分)
C; m/z 1375.1を可視化, D; m/z 1383.1を可視化
E; m/z 1673.5を可視化, F; m/z 1680.5を可視化



www.bruker.com