

特点描述

- ◆ 使用基质升华仪 iMLayer，任何人都可以简便、高再现性、稳定地涂覆基质。
- ◆ 使用升华法可以均匀地涂覆微基质晶体。
- ◆ 使用升华后喷涂的两步升华法，可实现高灵敏度、高空间分辨率的 MS 成像。

■ 简介

近年来，MS 成像被广泛应用于原研药研究、代谢研究以及其他各种领域。在使用 MALDI 电离法的 MS 成像中，除了在众多的基质种类中选择适合目标化合物检测的基质之外，研究所选择基质的涂覆方法也极其重要。喷涂法可有效地从组织中萃取，但存在成分渗出、基质晶体颗粒大、不均匀的问题。另一方面，升华法可实现基质晶体的微小、均匀化，但无法有效地从组织中萃取。因此，开发了升华法与喷涂法相结合的两步升华法（专利：6153139）和使升华的基质再结晶的升华后再结晶法等。在本文中，我们将介绍基质种类和涂覆方法的差异造成的晶体尺寸和形状差异的观察结果，以及证实两步升华法在 MS 成像中的优势的示例。

■ 基质升华仪 iMLayer

随着 MS 成像的空间分辨率的提升，为确保基质晶体的微小化和涂覆均匀性，基于升华法的基质涂覆技术也得到了发展。在为数众多的基质种类中，常用于 MS 成像的通用性较高的有 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB)、9-Aminoacridine (9-AA)、 α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)。基质升华仪 iMLayer (图 1) 基于这三种基质的沸点和熔点，预先注册了最佳的升华程序。本产品可以在触摸屏上进行简便操作，MS 成像新手也能放心、稳定的完成基质涂覆。另外，本产品配备了自动膜厚控制单元，可实现 0.1 μm 级的基质膜厚控制，确保基质涂覆的再现性，因此，还可以在不同载玻片之间进行 MS 成像数据的定量比较。

■ 基质涂覆方法的选择

选择适合检测目标化合物的基质固然重要，但在 MS 成像中，其涂覆方法更为重要。进行高空间分辨率成像时，不仅需要均匀地涂覆基质，而且需要做到基质晶体的微细化。同时，控制成分的渗出和高效萃取也是重要的因素。



图 1 iMLayer™

基质涂覆经常采用喷涂法、升华法和两步升华法。喷涂法是直接在样本上进行基质溶液喷涂的涂覆方法。另外，升华法是一种在真空条件下加热固体粉末状基质样本使之升华到切片上的方法。而两步升华法是在基质升华后，再进行基质溶液喷涂的方法。我们从晶体大小、涂覆均匀性、成分渗出和萃取效果等四个方面对这三种涂覆方法进行了确认和评估，并分析了哪种涂覆方法最适合检测目标化合物。



图 2 激光显微镜 OLS4100

■ 使用表面观察装置确认基质晶体大小和涂覆均匀性

为了确认基质涂覆晶体的大小和涂覆均匀性，分别使用喷涂法、升华法和两步升华法将 DHB、9-AA、CHCA 等的 3 种基质涂覆到 ITO 载玻片上，分别使用激光显微镜 OLS4100（图 2）和扫描探针显微镜 SPM-9700HT™（图 3）观察了各表面的晶体状态。

使用激光显微镜 OLS4100 观察了用喷涂法涂覆的基质的晶体状态。DHB 显示形成了基本均匀的数十 μm 的针状晶体（图 4A）。9-AA 显示形成了不均匀的数十 μm 的树状晶体（图 4B）。



图 3 扫描探针显微镜 SPM-9700HT™

CHCA 显示形成了不均匀的数 μm 的晶体（图 4C）。如上所述，相对于 MS 成像所需的最小激光焦点直径 $5\ \mu\text{m}$ ，使用喷涂法时的基质晶体较大，涂覆均匀性也会受到影响，因此，不是一种适合于获得高空间分辨率的均匀 MS 成像的涂覆方法。

然后，使用扫描探针显微镜 SPM-9700HT 观察了用升华法涂覆的晶体状态。考虑到 MS 成像的空间分辨率，将观察视野确定为 $5\ \mu\text{m}$ 见方。显示 DHB 均匀涂覆了 $1\ \mu\text{m}$ 左右大小的晶体（图 4D）。9-AA 显示形成了均匀的、在 $5\ \mu\text{m}$ 见方的观察视野中几乎无法确认每个晶体轮廓的微细晶体（推测数十 nm 左右）（图 4E）。CHCA 显示形成了均匀的、 $0.1\ \mu\text{m}$ 左右大小的颗粒状晶体（图 4F）。

最后，使用 SPM-9700HT 观察了用两步升华法涂覆的基质的晶体状态。DHB 显示形成了基本均匀的数 μm 大小的晶体（图 4G）。9-AA 显示形成了均匀的、约 $1\ \mu\text{m}$ 的针状晶体（图 4H）。CHCA 显示形成了均匀的 $1\ \mu\text{m}$ 左右的颗粒状晶体（图 4I）。证实相对于 MS 成像所需的最小激光焦点直径 $5\ \mu\text{m}$ ，可以形成均匀的小晶体。

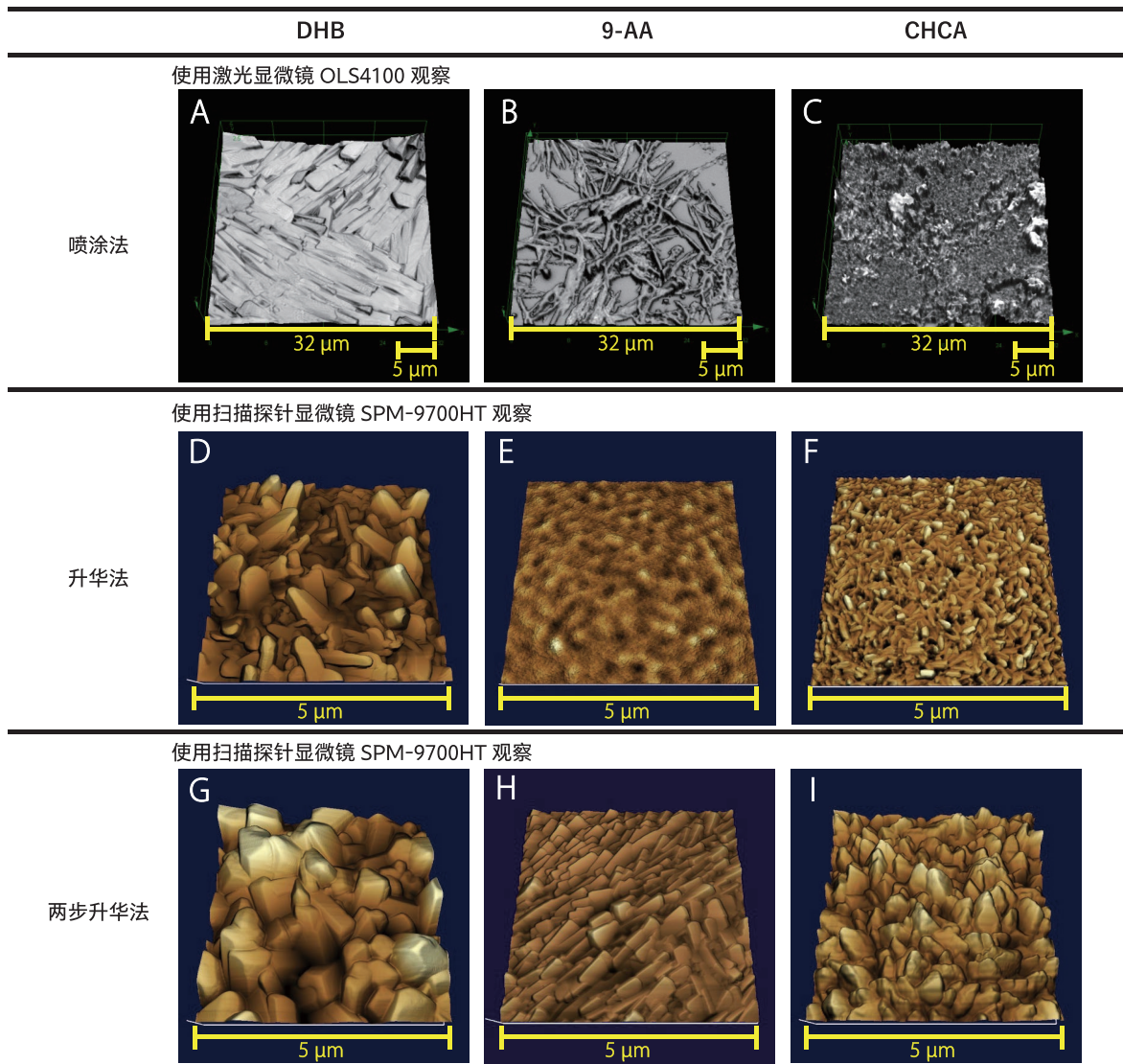


图 4 分别使用不同方法涂覆三种基质时的晶体表面观察图像

表 1 成分渗出确认试验中的喷涂法与两步升华法涂覆条件

涂覆方法	步骤
喷涂法	使用 iMLayer AERO 喷涂 20 mg/mL 9-AA (100% 甲醇)
两步升华法	使用 iMLayer 按膜厚 1.0 μm 进行 9-AA 的升华后， 使用 iMLayer AERO 喷涂 10 mg/mL 9-AA (80% 甲醇)

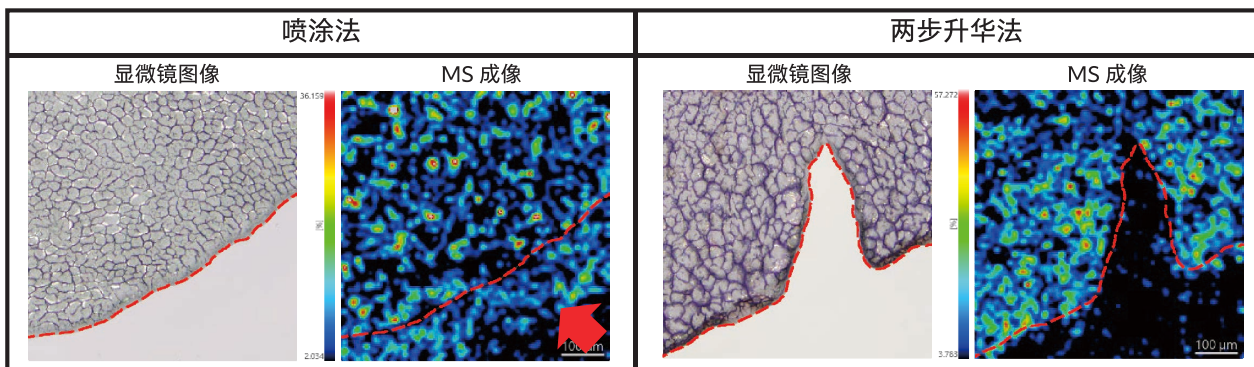


图 5 使用基质涂覆法对小鼠肝脏切片中成分渗出的比较

■ 确认涂覆基质中的成分渗出

采用喷涂法涂覆基质时，一直存在成分渗出的问题。为了确认喷涂法中的成分渗出实际达到何种程度，采用两步升华法可以在多大程度上抑制渗出问题，使用喷涂法和两步升华法在小鼠肝脏切片上涂覆 9-AA，进行了 MS 成像。9-AA 的涂覆条件如表 1 所示。两种方法均在喷涂过程中使用了基质自动喷涂装置 iMLayerAERO (图 6)。质谱分析采用了可以对显微镜观察位置准确分析的 iMScope。

采用喷涂法时，肝脏切片的外侧发生 200 μm 左右的渗出 (图 5 左侧红色箭头部分)，采用两步升华法时，渗出控制在 5~20 μm 左右 (图 5 右侧)。



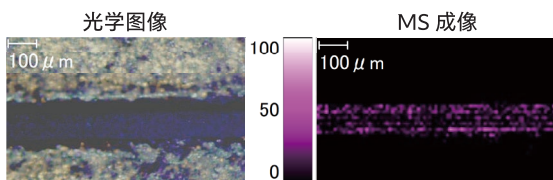
图 6 基质自动喷涂装置 iMLayer™ AERO

■ 确认涂覆基质中的萃取效果

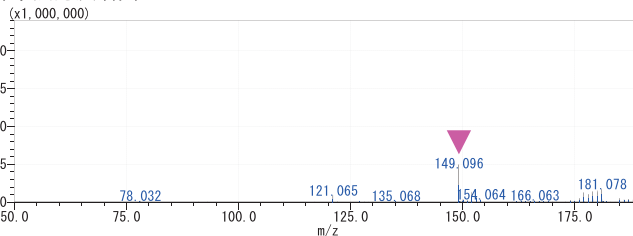
在毛发的 MS 成像中，需要高空间分辨率和高灵敏度。有些药物需要较高的萃取效果，而采用两步升华法时，可以在维持高空间分辨率的同时，提高萃取效果。下面介绍采用升华法和两步升华法进行毛发成像，证实两步升华法具有高萃取效果的情况。

使用升华法和两步升华法对在药物溶液中浸泡了 24 小时的毛发横截面进行 MS 成像，并比较其灵敏度。证实与升华法相比，采用两步升华法时，峰强度提高了约 4 倍 (图 7b,d)。判断这是组织中的成分萃取效果提升造成的。毛发内部药物分布的详细分析示例请参见应用报告 No.B75。

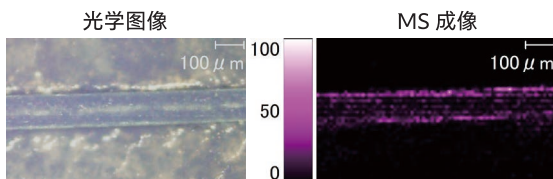
a. 升华法的 MS 成像



b. 升华法的质谱图



c. 两步法的 MS 成像



d. 两步法的质谱图

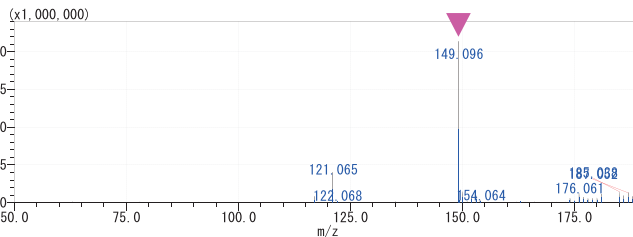


图 7 毛发切片药物分布的高空间分辨率 (10 μm) MS 成像中不同基质涂覆法下的灵敏度比较

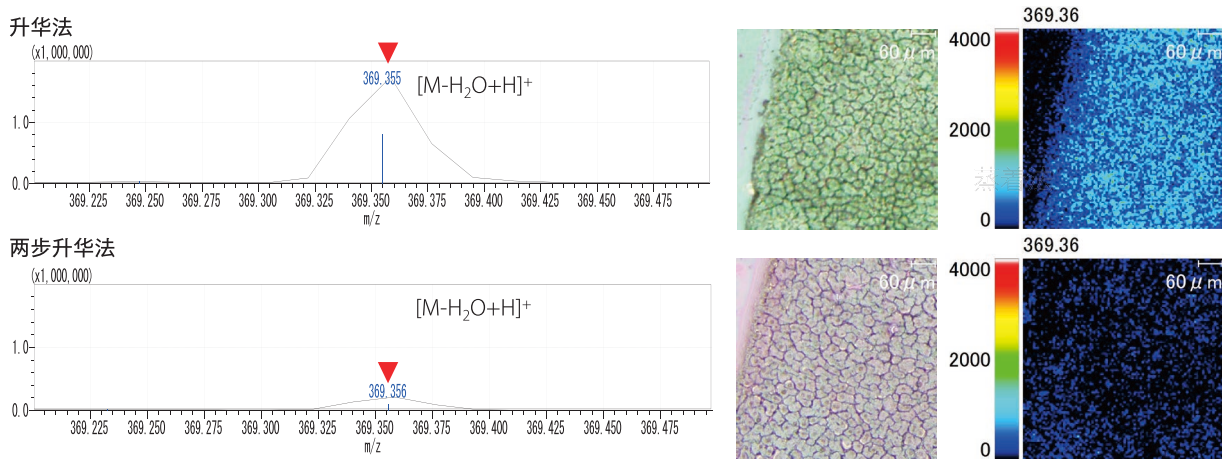


图 8 采用升华法和两步升华法时的小鼠肝脏切片中胆固醇的 MS 成像

另一方面，胆固醇是采用喷涂法和两步升华法时无法检测，只在采用升华法时可以检测到的化合物。这并不意味着喷涂法和两步升华法的灵敏度比升华法高。图 8 是采用升华法和两步升华法涂覆基质 CHCA 时，在小鼠肝脏切片上的胆固醇 MS 成像结果。通过喷雾供应溶剂时，灵敏度下降了十分之一。如上所述，对于某些化合物，升华法的灵敏度可能会高于两步升华法，因此，需要摸索最佳条件。

结论

上述一系列实验结果的汇总如表 2 所示。

使用激光显微镜和扫描探针显微镜观察涂覆基质后的晶体大小（表 2 的①）、涂覆均匀性（表 2 的②）后发现，采用喷涂法时，晶体大，而且缺乏均匀性，而采用升华法和两步升华法时，可以均匀地涂覆微细的晶体。

在成分渗出方面（表 2 的③），对喷涂法和两步升华法比较后发现，只采用喷涂法时，成分渗出组织之外 200 μm 左右，而在采用先升华基质再喷涂的两步升华法时，可以最大限度减少成分的渗出。

关于萃取效果（表 2 的④），在对升华法和两步升华法进行比较后发现，通过第二步的喷涂，可以获得从毛发中萃取药物的效果，检测灵敏度提高 4 倍左右。如上所述，需要高效萃取时，采用喷涂法的溶剂萃取是有效的，因此，两步升华法是最佳的涂覆方法。

另一方面，对于胆固醇、磷脂和含有叔胺的低分子化合物等不需要高效萃取的化合物成像（仅通过升华法就可以确保足够的灵敏度时），采用优先高空间分辨率和控制成分渗出的升华法进行基质涂覆是最佳的。

如上所述，升华法和两步升华法哪个更合适取决于具体情况。因此，对于没有 MS 成像先例的化合物，应在尝试分析一次后做出判断。在这种情况下，首先采用升华法涂覆基质，对部分样本进行分析。如果可以检测出来，则直接进行 MS 成像，如果检测困难，则追加采用喷涂法，对升华法和两步升华法均进行高效的研究（图 9）。无论采用何种方法，采用升华法涂覆基质对 MS 成像来说是不可或缺的步骤。

表 2 不同基质涂覆方法带来的好处和坏处

	喷涂法	升华法	两步升华法
①晶体大小	大 (△)	极小 (◎)	小 (○)
②涂覆均匀性	低 (△)	高 (◎)	一般 (○)
③成分渗出	多 (△)	无 (◎)	少 (○)
④萃取效果	高 (◎)	低 (△)	高 (○)
不需要高效萃取步骤的化合物的成像	最佳		
需要高效萃取步骤的化合物的成像	最佳		

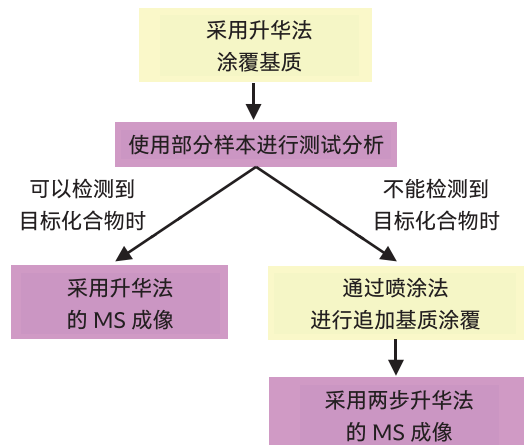


图 9 MS 成像中的基质涂覆方法的研究步骤示例

岛津应用云



iMLayer、iMScope 和 SPM-9700HT 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家 / 地区的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话：800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2021 年 09 月