(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3639594号
(P3639594)
(45)発行日　平成17年4月20日(2005.4.20)　(24)登録日　平成17年1月21日(2005.1.21)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
G01N 27/64	G01N	27/64	B
G01N 27/62	G01N	27/62	V
H01J 49/04	H01J	49/04	
H01J 49/40	H01J	49/40	

請求項の数 126　(全 53 頁)

(21)出願番号	特願平7-501011
(86)(22)出願日	平成6年5月27日(1994.5.27)
(65)公表番号	特表平9-501489
(43)公表日	平成9年2月10日(1997.2.10)
(86)国際出願番号	PCT/US1994/006064
(87)国際公開番号	WO1994/028418
(87)国際公開日	平成6年12月8日(1994.12.8)
審査請求日	平成11年8月24日(1999.8.24)
(31)優先権主張番号	08/068,896
(32)優先日	平成5年5月28日(1993.5.28)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者
ベイラー　カレッジ　オブ　メディシン
アメリカ合衆国　テキサス　７７０３０，
ヒューストン，スイート　１８６エイ，
ワン　ベイラー　プラザ　（番地なし）
(74)代理人
弁理士　社本　一夫
(74)代理人
弁理士　今井　庄亮
(74)代理人
弁理士　増井　忠弐
(74)代理人
弁理士　小林　泰
(74)代理人
弁理士　富田　博行

最終頁に続く

(54)【発明の名称】分析対象物の脱着およびイオン化のための方法および装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

分析対象物を検出する方法であって、工程：

（ａ）分析対象物に結合する親和性剤により誘導されたサンプル提示表面から分析対象物を捕捉し；

（ｂ）サンプル提示表面上の分析対象物にマトリックスを適用し；そして

（ｃ）捕捉した分析対象物をレーザー脱着／イオン化質量分析計により検出すること

を含む方法。

【請求項２】

親和性剤が金属イオンを含む、請求項１記載の方法。

【請求項３】

親和性剤がタンパク質またはペプチドを含む、請求項１記載の方法。

【請求項４】

親和性剤が核酸を含む、請求項１記載の方法。

【請求項５】

親和性剤が染料を含む、請求項１記載の方法。

【請求項６】

サンプルが生物学上のサンプルである、請求項１記載の方法。

【請求項７】

分析対象物がタンパク質またはペプチドを含む、請求項１乃至６のいずれか１項記載の方

法。
【請求項８】
分析対象物が核酸を含む、請求項１乃至６のいずれか１項記載の方法。
【請求項９】
分析対象物が糖質を含む、請求項１乃至６のいずれか１項記載の方法。
【請求項１０】
金属イオンが銅または鉄から選択される、請求項２記載の方法。
【請求項１１】
タンパク質またはペプチドがイムノグロブリンである、請求項３記載の方法。
【請求項１２】
核酸がDNAである、請求項４記載の方法。
【請求項１３】
（ａ）の後にサンプル提示表面を洗浄することをさらに含む、請求項７記載の方法。
【請求項１４】
（ａ）の後にサンプル提示表面を洗浄することをさらに含む、請求項８記載の方法。
【請求項１５】
（ａ）の後にサンプル提示表面を洗浄することをさらに含む、請求項９記載の方法。
【請求項１６】
親和性剤がサンプル提示表面への共有結合により固定化されている、請求項１乃至６のいずれか１項記載の方法。
【請求項１７】
サンプル提示表面が取り外し可能なように質量分析計に挿入可能なプローブの表面である、請求項１乃至６のいずれか１項記載の方法。
【請求項１８】
プローブが予め決定された配列内に整列された多数の親和性剤を含む、請求項17項記載の方法。
【請求項１９】
マトリックスがシアノヒドロキシ桂皮酸、ニコチン酸、シナピン酸またはジヒドロキシ安息香酸からなる群から選択される、請求項１乃至６のいずれか１項記載の方法。
【請求項２０】
（ａ）分析対象物に結合する親和性剤により誘導されたサンプル提示表面；
（ｂ）親和性剤により捕捉された分析対象物；および
（ｃ）分析対象物に適用されるマトリックス
を含む、取り外し可能なように質量分析計に挿入可能なプローブ。
【請求項２１】
親和性剤が金属イオンを含む、請求項20記載のプローブ。
【請求項２２】
親和性剤がタンパク質またはペプチドを含む、請求項20記載のプローブ。
【請求項２３】
親和性剤が核酸を含む、請求項20記載のプローブ。
【請求項２４】
親和性剤が染料を含む、請求項20記載のプローブ。
【請求項２５】
分析対象物が生物学上のサンプルである、請求項20乃至24のいずれか１項記載のプローブ。
【請求項２６】
分析対象物が核酸を含む、請求項20乃至24のいずれか１項記載のプローブ。
【請求項２７】
分析対象物が糖質を含む、請求項20乃至24のいずれか１項記載のプローブ。
【請求項２８】

金属イオンが銅または鉄から選択される、請求項21記載のプローブ。
【請求項２９】
タンパク質またはペプチドがイムノグロブリンである、請求項22記載のプローブ。
【請求項３０】
核酸がDNAである、請求項23記載のプローブ。
【請求項３１】
親和性剤がサンプル提示表面への共有結合により固定化されている、請求項20乃至24のいずれか１項記載のプローブ。
【請求項３２】
プローブが予め決定された配列内に整列された多数の親和性剤を含む、請求項20乃至24のいずれか１項記載のプローブ。
【請求項３３】
マトリックスがシアノヒドロキシ桂皮酸、ニコチン酸、シナピン酸またはジヒドロキシ安息香酸からなる群から選択される、請求項20乃至24のいずれか１項記載のプローブ。
【請求項３４】
（ａ）（ｉ）分析対象物に結合する親和性剤により誘導されたサンプル提示表面；
（ii）親和性剤により捕捉された分析対象物；および
（iii）分析対象物に適用されるマトリックス
を含む、取り外し可能なように質量分析計に挿入可能なプローブ；
（ｂ）分析対象物を脱着してイオン化するためにサンプル提示表面に対して直接エネルギーを向けるレーザー源；
（ｃ）脱着されてイオン化された分析対象物に対して加速性電位を適用するための手段；および
（ｄ）脱着されてイオン化された分析対象物を検出する検出器
を含む、質量分析計装置。
【請求項３５】
親和性剤が金属イオンを含む、請求項34記載の質量分析計装置。
【請求項３６】
親和性剤がタンパク質またはペプチドを含む、請求項34記載の質量分析計装置。
【請求項３７】
親和性剤が核酸を含む、請求項34記載の質量分析計装置。
【請求項３８】
親和性剤が染料を含む、請求項34記載の質量分析計装置。
【請求項３９】
分析対象物が生物学上のサンプルである、請求項34乃至38のいずれか１項記載の質量分析計装置。
【請求項４０】
分析対象物が核酸を含む、請求項34乃至38のいずれか１項記載の質量分析計装置。
【請求項４１】
分析対象物が糖質を含む、請求項34乃至38のいずれか１項記載の質量分析計装置。
【請求項４２】
金属イオンが銅または鉄から選択される、請求項35記載の質量分析計装置。
【請求項４３】
タンパク質またはペプチドがイムノグロブリンである、請求項36記載の質量分析計装置。
【請求項４４】
核酸がDNAである、請求項37記載の質量分析計装置。
【請求項４５】
親和性剤がサンプル提示表面への共有結合により固定化されている、請求項34乃至38のいずれか１項記載の質量分析計装置。
【請求項４６】

プローブが予め決定された配列内に整列された多数の親和性剤を含む、請求項34乃至38のいずれか１項記載の質量分析計装置。
【請求項４７】
レーザーが窒素レーザーおよびNd－YAGレーザーから選択される、請求項34乃至38のいずれか１項記載の質量分析計装置。
【請求項４８】
マトリックスがシアノヒドロキシシナミック酸、ニコチン酸、シナピン酸またはジヒドロキシ安息香酸からなる群から選択される、請求項34乃至38のいずれか１項記載の質量分析計装置。
【請求項４９】
分析対象物を検出する方法であって、工程：
ａ）プローブのサンプル提示表面に分析対象物を適用するが、但し、該表面は表面に対する化学結合により固定化されたエネルギー吸着分子の層を含み、但し、該エネルギー吸着分子はレーザーからのエネルギーを吸着して、それによりプローブからの分析対象物分子の脱着を可能にさせ；そして
ｂ）レーザー脱着／イオン化質量分析計により分析対象物を検出すること
を含む方法。
【請求項５０】
エネルギー吸着分子が表面に非共有結合している、請求項49記載の方法。
【請求項５１】
エネルギー吸着分子が表面に共有結合している、請求項49記載の方法。
【請求項５２】
エネルギー吸着分子がジメトキシヒドロキシ桂皮酸、桂皮酸アミド、桂皮酸ブロマイド、ジヒドロキシ安息香酸およびシアノヒドロキシ桂皮酸からなる群から選択される、請求項49項記載の方法。
【請求項５３】
表面が金属、合成ポリマーでコートされた表面、ガラス、セラミック、合成ポリマーまたはそれの混合物を含む、請求項49記載の方法。
【請求項５４】
エネルギー吸着分子が予め決定された配列に整列されたスポット中に含まれる、請求項49記載の方法。
【請求項５５】
分子対象物がペプチドまたは核酸を含む、請求項49記載の方法。
【請求項５６】
分子対象物に結合できる親和性剤によりプローブがさらに誘導されている、請求項49記載の方法。
【請求項５７】
親和性剤が金属イオンを含む、請求項56記載の方法。
【請求項５８】
親和性剤がタンパク質またはペプチドを含む、請求項56記載の方法。
【請求項５９】
親和性剤が核酸を含む、請求項56記載の方法。
【請求項６０】
親和性剤が染料を含む、請求項56記載の方法。
【請求項６１】
分析対象物がタンパク質またはペプチドを含む、請求項49乃至60のいずれか１項記載の方法。
【請求項６２】
分析対象物が核酸を含む、請求項49乃至60のいずれか１項記載の方法。
【請求項６３】

分析対象物が糖質を含む、請求項49乃至60のいずれか１項記載の方法。
【請求項６４】
質量分析計に取り外し可能なように挿入可能なプローブであって、但し該プローブはプローブから分析対象物を脱着することができるレーザーエネルギー源に分析対象物を提示するための表面を有し、但し該表面は表面に対する化学結合により固定化されたエネルギー吸着分子の層を含み、但し、該エネルギー吸着分子はレーザーからのエネルギーを吸着して、それによりプローブからの分析対象物分子の脱着を可能にさせる、上記プローブ。
【請求項６５】
エネルギー吸着分子が表面に非共有結合している、請求項64記載のプローブ。
【請求項６６】
エネルギー吸着分子が表面に共有結合している、請求項64記載のプローブ。
【請求項６７】
エネルギー吸着分子がジメトキシヒドロキシ桂皮酸、桂皮酸アミド、桂皮酸ブロマイド、ジヒドロキシ安息香酸およびシアノヒドロキシ桂皮酸からなる群から選択される、請求項64項記載のプローブ。
【請求項６８】
表面が金属、合成ポリマーでコートされた表面、ガラス、セラミック、合成ポリマーまたはそれの混合物を含む、請求項64記載のプローブ。
【請求項６９】
エネルギー吸着分子が予め決定された配列に整列されたスポット中に含まれる、請求項64記載のプローブ。
【請求項７０】
分子対象物に結合できる親和性剤によりプローブがさらに誘導されている、請求項64記載のプローブ。
【請求項７１】
親和性剤が金属イオンを含む、請求項70記載のプローブ。
【請求項７２】
親和性剤がタンパク質またはペプチドを含む、請求項70記載のプローブ。
【請求項７３】
親和性剤が核酸を含む、請求項70記載のプローブ。
【請求項７４】
親和性剤が染料を含む、請求項70記載のプローブ。
【請求項７５】
分析対象物がタンパク質またはペプチドを含む、請求項64乃至74のいずれか１項記載のプローブ。
【請求項７６】
分析対象物が核酸を含む、請求項64乃至74のいずれか１項記載のプローブ。
【請求項７７】
分析対象物が糖質を含む、請求項64乃至74のいずれか１項記載のプローブ。
【請求項７８】
分析対象物を検出するための質量分析計装置であって、
（ａ）質量分析計に取り外し可能なように挿入可能なプローブであって、該プローブはプローブから分析対象物を脱着することができるエネルギーを放射するエネルギー源に分析対象物を提示するための表面を有し、但し、該表面は表面に対する化学結合により固定化されたエネルギー吸着分子の層を含み、但し、該エネルギー吸着分子は高エネルギー源からのエネルギーを吸着して、それによりプローブからの分析対象物分子、およびプローブ表面上の分析対象物の脱着を可能にさせる、上記プローブ；
（ｂ）分析対象物を脱着およびイオン化するためにサンプル提示表面にレーザーエネルギーを向けるレーザー源；
（ｃ）脱着されてイオン化された分析対象物に対して加速性電位を適用するための手段；

および
（ｄ）脱着されてイオン化された分析対象物を検出する検出器
を含む、質量分析計装置。
【請求項７９】
エネルギー吸着分子が表面に非共有結合している、請求項78記載の質量分析計装置。
【請求項８０】
エネルギー吸着分子が表面に共有結合している、請求項78記載の質量分析計装置。
【請求項８１】
エネルギー吸着分子がジメトキシヒドロキシ桂皮酸、桂皮酸アミド、桂皮酸ブロマイド、ジヒドロキシ安息香酸およびシアノヒドロキシ桂皮酸からなる群から選択される、請求項78項記載の質量分析計装置。
【請求項８２】
表面が金属、合成ポリマーでコートされた表面、ガラス、セラミック、合成ポリマーまたはそれの混合物を含む、請求項78記載の質量分析計装置。
【請求項８３】
エネルギー吸着分子が予め決定された配列に整列されたスポット中に含まれる、請求項78記載の質量分析計装置。
【請求項８４】
分析対象物がタンパク質またはペプチドを含む、請求項78乃至83のいずれか１項記載の質量分析計装置。
【請求項８５】
分析対象物が核酸を含む、請求項78至83のいずれか１項記載の質量分析計装置。
【請求項８６】
分析対象物が糖質を含む、請求項78乃至83のいずれか１項記載の質量分析計装置。
【請求項８７】
分析対象物を検出するための方法であって、工程：
（ａ）プローブのサンプル提示表面に結合した光感作性付着分子に分析対象物を結合させるが、その際、光感作性分子は結合部位をとおして分析対象物に結合し、そして分析対象物は光分解性の分割により光感作性付着分子から脱着可能であり；
（ｂ）（１）光源からの光に分析対象物を暴露して、それにより光分解性の分割により光感作性付着分子から分析対象物を分離し；（２）レーザーからのエネルギー源により分析対象物を採取することにより、プローブから分析対象物分子を脱着させ；そして
（ｃ）脱着した分析対象物を質量分析計により検出すること
を含む、方法。
【請求項８８】
光感作性付着分子を共有結合によりサンプル提示表面に結合させる、請求項87記載の方法。
【請求項８９】
結合部位が光感作性である、請求項87記載の方法。
【請求項９０】
光感作性付着分子が分析対象物のガス相への脱着／イオン化を促進させるエネルギー吸着分子としても機能する、請求項87記載の方法。
【請求項９１】
脱着／イオン化支援マトリックス物質をサンプル提示表面に適用することをさらに含む、請求項87記載の方法。
【請求項９２】
光感作性付着分子への結合の後に、化学によるか、および／または、酵素的により分析対象物を修飾することをさらに含む、請求項87記載の方法。
【請求項９３】
結合部位が、アゾ基、アリル基、アミン基、ヒドロキシル基、スルフィドリル基、カルボ

ニル基または活性水素反応基を含む、請求項87記載の方法。
【請求項９４】
分析対象物がタンパク質またはペプチドを含む、請求項87記載の方法。
【請求項９５】
分析対象物が核酸を含む、請求項87記載の方法。
【請求項９６】
核酸がDNAである、請求項95記載の方法。
【請求項９７】
質量分析計に除去可能なように挿入可能なプローブであって、プローブは、分析対象物の検出のために上記プローブから分析対象物を脱着できるエネルギーを放射するエネルギー源に分析対象物を提示するためのサンプル提示表面を有し、但し、プローブはプローブ表面に結合した光感作性付着分子を含み、光感作性付着分子は分析対象物と結合するために利用可能な結合部位を含み、そして分析対象物は光分解性分割により光感作性付着分子から脱着可能な、上記プローブ。
【請求項９８】
光感作性付着分子が共有結合によりサンプル提示表面に結合している、請求項97記載のプローブ。
【請求項９９】
光感作性付着分子が分析対象物のガス相への脱着／イオン化を促進させるエネルギー吸着分子としても機能する、請求項97記載のプローブ。
【請求項１００】
結合部位が光感作性である、請求項97記載のプローブ。
【請求項１０１】
分析対象物が結合部位を通して光感作性付着分子に結合している、請求項97記載のプローブ。
【請求項１０２】
サンプル提示表面に適用された脱着／イオン化支援マトリックス物質をさらに含む、請求項101記載のプローブ。
【請求項１０３】
結合部位が、アゾ基、アリル基、アミン基、ヒドロキシル基、スルフィドリル基、カルボニル基または活性水素反応基を含む、請求項97記載のプローブ。
【請求項１０４】
分析対象物がタンパク質、ペプチドまたは核酸を含む、請求項101記載のプローブ。
【請求項１０５】
分析対象物を検出するための質量分析計装置であって、
（ａ）取り外し可能なように挿入可能なプローブであって、該プローブは分析対象物の検出のためにプローブから分析対象物を脱着できるエネルギーを放射するエネルギー源に分析対象物を提示するための表面を有し、但し、プローブはプローブ表面に結合した光感作性付着分子を含み、そして光感作性付着分子は分析対象物と結合するのに利用可能な結合部位を含み、そして分析対象物は光分解性の分割により光感作性付着分子から脱着可能である、上記プローブ；
（ｂ）光分解性の分割を引き起こすプローブ表面に光を向ける光源；
（ｃ）分析対象物を脱着してイオン化するためのサンプル提示表面にレーザーエネルギーを向けるレーザー源；
（ｄ）脱着されてイオン化された分析対象物に対して加速性電位を適用するための手段；および
（ｅ）脱着されてイオン化された分析対象物を検出する検出器
を含む、質量分析計装置。
【請求項１０６】
光感作性付着分子が共有結合によりサンプル提示表面に結合している、請求項105記載の

質量分析計装置。
【請求項１０７】
結合部位が光感作性である、請求項105記載の質量分析計装置。
【請求項１０８】
分析対象物が結合部位を通して光感作性付着分子に結合している、請求項105記載の質量分析計装置。
【請求項１０９】
サンプル提示表面に適用された脱着／イオン化支援マトリックス物質をさらに含む、請求項108記載の質量分析計装置。
【請求項１１０】
光感作性付着分子が分析対象物のガス相への脱着／イオン化を促進させるエネルギー吸着分子としても機能する、請求項105記載の質量分析計装置。
【請求項１１１】
結合部位が、アゾ基、アリル基、アミン基、ヒドロキシル基、スルフィドリル基、カルボニル基または活性水素反応基を含む、請求項105記載の質量分析計装置。
【請求項１１２】
レーザー源が光源としても機能する、請求項105乃至111のいずれか１項記載の質量分析計装置。
【請求項１１３】
核酸、ポリペプチドおよびポリサッカライドから選択されるバイオポリマー中のモノマーの配列を決定するための方法であって、工程：
（ａ）バイオポリマーを結合する親和性剤により誘導されたサンプル提示表面上でバイオポリマーを捕捉し；
（ｂ）酵素による方法又は化学による方法を用いて捕捉されたバイオポリマーを連続分解に供することにより、バイオポリマーの末端から分割されるモノマーの数が異なるように修飾された質量規定されたバイオポリマーの集団を生成し；
（ｃ）レーザー脱着／イオン化質量分析計によりバイオポリマーの集団を検出し；
（ｄ）集団の検出されたバイオポリマー間の質量の差を決定し；そして
（ｅ）集団の脱着されたバイオポリマー間の質量の差に基づいてモノマーの配列を決定すること
を含む方法。
【請求項１１４】
親和性剤がプローブ表面に共有結合している、請求項113記載の方法。
【請求項１１５】
バイオポリマーの集団がポリマーから化学的にモノマーに分割することにより生成される、請求項113記載の方法。
【請求項１１６】
バイオポリマーの集団がポリマーから酵素によりモノマーに分割することにより生成される、請求項113記載の方法。
【請求項１１７】
バイオポリマーがポリペプチドである、請求項113記載の方法。
【請求項１１８】
バイオポリマーが核酸である、請求項113記載の方法。
【請求項１１９】
バイオポリマーがポリサッカライドである、請求項113記載の方法。
【請求項１２０】
核酸、ポリペプチドおよびポリサッカライドから選択されるバイオポリマー中のモノマーの配列を決定するための方法であって、工程：
（ａ）プローブのサンプル提示表面に結合した光感作性付着分子にバイオポリマーを結合させるが、但し、光感作性付着分子は結合部位を通してバイオポリマーに結合しており、

そしてバイオポリマーは光感作性分割により光感作性付着分子から脱着可能であり；
（ｂ）酵素による方法又は化学による方法を用いて捕捉されたバイオポリマーを連続分解に供することにより、バイオポリマーの末端から分割されるモノマーの数が異なるように修飾された質量規定されたバイオポリマーの集団を生成し；
（ｃ）（１）光源からの光に分析対象物を暴露して、それにより光分解性の分割により光感作性付着分子からバイオポリマーを脱着し；（２）レーザーからのエネルギーによりバイオポリマーを採取し；
（ｄ）レーザー脱着／イオン化質量分析計によりバイオポリマーの集団を検出し；
（ｅ）集団の検出されたバイオポリマー間の質量の差を決定し；そして
（ｆ）集団の脱着されたバイオポリマーの間の質量の差に基づいてモノマーの配列を決定すること
を含む方法。
【請求項１２１】
表面が分析対象物を結合できる親和性剤によりさらに誘導されている、請求項120記載の方法。
【請求項１２２】
バイオポリマーの集団がポリマーから化学的にモノマーに分割することにより生成される、請求項120記載の方法。
【請求項１２３】
バイオポリマーの集団がポリマーから酵素によりモノマーに分割することにより生成される、請求項120記載の方法。
【請求項１２４】
バイオポリマーがポリペプチドである、請求項120記載の方法。
【請求項１２５】
バイオポリマーが核酸である、請求項120記載の方法。
【請求項１２６】
バイオポリマーがポリサッカライドである、請求項120記載の方法。
【発明の詳細な説明】
発明の背景
本発明は一般的には、例えば、質量分析測定（MS）あるいはバイオセンサなどの方法による、後の科学的分析のための、分析対象物の脱着およびイオン化のための方法および装置に関するものである。一般的に、質量分析測定による分析は、レーザービームを含む、レーザーなどの高エネルギー源を用いた少量のサンプルの気化およびイオン化を伴っている。物質はレーザービームによって、プローブ先端の表面からガスあるいは気相に気化され、このプロセス中に、個々の分子の一部は陽子を取り込んで、イオン化される。これら正の電荷にイオン化された分子は、次に、短い高圧電界で加速され、高真空度チェンバーに導かれ（ドリフト）、その先で、感度の高い検出装置の表面に衝突する。飛行時間はイオン化された分子の質量の関数であるから、イオン化と衝突との間に経過する時間は、その分子の質量の判定に用いることができ、その分子質量は、次に特定の質量の既知の分子が存在しているかどうかの判定に用いることができる。
レーザー脱着／イオン化、飛行時間質量分析測定（TOF）にプローブ先端に蛋白質あるいは他の大型の生物分子を載置（present）する従来のすべての技術は、金属製プローブ端のむき出しの表面上に置かれる酸性基質の大過剰モルの蛋白質あるいは他の分析対象分子の結晶性固体混合物の調製を必要としている。（サンプルプローブ端は通常金属製であり、ステンレススチール、ニッケルメッキ材、あるいはプラチナでできている。）レーザービームによる分析対象物分子の破壊を防ぐためには、こうした基質に分析対象物を埋め込むことが必要だと考えられていた。レーザービームはプローブ端上の固体混合物に衝突し、そのエネルギーが、埋め込まれた分析対象物分子の一部と共に基質の小部分を気化するのに用いられてしまう。こうした基質がないと、分析対象物分子はレーザーのエネルギーですぐ砕かれてしまい、最初の巨大分子の質量や特性の判定が非常に困難であるか、ある

いは不可能になってしまう。
こうした先行技術に基づく手順にはいくつかの制約があり、蛋白質やその他の巨大生物分子分析対象物への適用を不可能にしている。第１に、非常に未精製のサンプルの場合、基質／分析対象物結晶あるいは固体混合物における過剰な外来性物質が存在しないようにするために、部分的に分別する（あるいは、できるだけそのサンプルを精製）ことが必要になる。大量の成分が存在していると、目標とされる分析対象物のイオン信号（脱着、イオン化、および／あるいは検出）を抑制してしまう可能性がある。こうした精製は時間がかかり、費用がかかり、通常、分析対象物の回収率の低下（または完全な損失）につながり、そして、自動化分析装置での実行は非常に困難である。
第２に、従来の技術に基づく分析のために必要とされる分析対象物物質の量はそれ程大きくないが（通常はピコモル程度）、小児科患者でのテストなど、いくつかの状況においては、分析対象物の流体は極端に少量（マイクロリットル）でしか利用できず、しかも、種々の異なった分析を行う必要がある。したがって、ひとつの分析のための分析対象物／基質結晶性混合物の調製のために必要とされる非常に少量（体積などで）のものでさえ、重要な意味を持つ場合がある。また、プローブ端上で使用するための固体分析対象物／基質混合物の調製で用いられる分析対象物のごく一部（数千分の一またはそれより少ない）だけが脱着あるいは質量分析測定では用いられることになる。したがって、１）もっとずっと少ない量の分析対象物を用いれば済み、２）プローブの先端あるいは表面の予め決められた場所にひとつ、あるいは複数の分析対象物を配置し、３）（たとえば、１回、あるいは複数回の化学的、あるいは酵素反応の前後に）分析対象物の同じアリコットの分析を繰り返し行うことが可能で、そして４）より定量的な方法でテストを行うことができるようにする、従来の手順におけるどのような改良でも、多くの臨床領域で極めて有益であろう。
第３に、プローブの先端上で使用するための分析対象物／基質の固溶体の調製に用いられる、分析対象物である蛋白質あるいは他の巨大分子は、基質にとざされている（埋め込まれている）ため、その後のいかなる化学的検査あるいは処置にも適さない。また、今日まで使われた基質物質はすべて強い酸性であるため、後の試験のために分析物質を修飾する目的で混合物に試みられるはずの多くの化学反応に、有害な影響を及ぼす。したがって、分析対象物分子についての、後の化学的修飾あるいは反応を、基質またはプローブ先端からそれらの分子を除去することなく、あるいは全く「基質」なしに、導くことができるようにする方法におけるどのような改良でも、研究者および臨床医にとって大きな利益となるであろう。
いかなる形式の質量分析測定にせよ、完全なペプチドあるいは小さな蛋白質（わずか約15kDaまで）の分子質量測定に初めて成功したのは、高エネルギー粒子による表面のボンバーディング（プラズマ脱着および高速原子ボンバードメント分析測定）によってであり、この大躍進は1981年および1982年に起こった。1985年および1986年に改良が行われたが、収率（信号の強さ）、感度、精密さ、および質量の精度は比較的低いままであった。分子の質量がより高いタンパク質（約20～25kDa）は、まれな場合を除いて観察されず、これらの方法では平均的な分子量（約70kDa）のタンパク質は全く観察されなかった。したがって、質量分析測定によるほとんどのタンパク質の測定は、実現しないままであった。
1988年Hillenkampとその共同研究者らは、UVレーザー脱着飛行時間質量分析測定を用いて、大過剰のモル数のUV吸収性酸性化学基質（ニコチン酸）の存在下に、比較的高い分子質量のタンパク質をプローブ先端上に置くと、それらのタンパク質を完全な状態で脱着できることを発見した。この新しい技術を、基質補助レーザー脱着／イオン化（MALDI）、飛行時間質量分析測定と呼ぶ。レーザー脱着飛行時間質量分析測定（化学基質なし）が何度か用いられる状態があったが、タンパク質あるいは核酸のような大きな完全な生体高分子は、脱着に際しフラグメント化（破壊）されるため、それらの分子量測定にはまだ成功していないことが注目さる。したがって、化学基質の導入する以前は、完全な巨大分子の質量の明確な変化の検出には、レーザー脱着質量分析測定は基本的には有用ではなかった。
基質結晶のランダムな形成および分析対象物分子の固溶体中にランダムに包含することが

、先行技術であることに注目すべきである。
この先行技術には多くの問題および制約がある。例えば、以前には、分析対象物あるいは基質中に存在する混入物を洗浄除去することは難しいとされてきた。他の問題には、分析対象物－塩イオン付加物の形成、基質中の分析対象物の最適より低い溶解度、固体基質内の分析対象物の未知の局在性および濃度、複数の成分が同時に存在することによるシグナル（分子イオン）抑制「毒作用」、および選択的な分析対象物の脱着／イオン化が含まれる。しかし、KarasおよびHillenkampを含む先の研究者らが質量分析学を用いた分析対象物検出のための種々の技術を報告する前は、これらの先行技術は、少ない体積の均一化されたサンプル中の分析対象物の検出における制約時に、の感度および選択性における固有の技術的制約があった（Hillenkamp,Bordeaux Mass Spectrometry Conference Report,pp.354－62（1988）;Karas and Hillenkamp,Bordeaux Mass Spectrometry Conference Report,pp.416－17（1988）;Karas and Hillenkamp,Analytical Chemistry,60:2299（1988）;Karas,et al.,Biomed.Environ.Mass Spectrum（印刷中））。飛行時間質量分析測定にレーザービームを用いることは、例えば、米国特許第4,694,167号、第4,686,366号、第4,295,046号および第5,045,694号に示されている。これは参考文献として本明細書に組み入れる。
高分子量の生体高分子をフラグメント化することなく揮発させることに成功したことにより、多くの種類の生物学上の巨大分子の質量分析測定による分析が可能になった。さらに重要なことは、恐らく、生物学的な研究において決まって遭遇する問題を解くために、質量分析測定がさらに創造的に用いられる可能性を示したことであろう。最も新しい関心は、高速（分）高感度（サンプルの必要量は、ｐモルより少ない）であり複雑な混合物を分析できるという理由から、基質補助されたレーザー脱着／イオン化（MALDI）、飛行時間（TOF）質量分析測定（MS）の有用性に集められている。
MALDI－TOF　MSは、個々の分析対象物の質量の静的な測定／検証に用いるために引き続き有用であるが、生体高分子の場合には、未知の構造について最も重要な情報を与える相違がある。したがって、構造生物学において慣例的に用いるためには、MALDI－TOF　MS技術の不利な制約は、サンプルの調製および不活性なサンプルプローブ素子の表面上への載置（析出）に関係し、特に、プローブ表面において、新たに調製した結晶性有機酸基質中に分析対象物が埋め込まれること（共凝固）を必要とすることに関係がある。プローブ素子の表面上の、結晶基質の不均一な並びの中に、分析対象物がランダムに分布していると、適量より多くの質量スペクトルを収集する（例えば、各々100ショットの多数のセット）ため、レーザー脱着法に必要とされるよりはるかに多くの分析対象物あるいはサンプルの析出を必要とする。分析対象物の残りの部分は、通常、追加的な分析あるいは後の特徴づけのために回収されることはない。プローブ表面上での脱着には、１ないし10pモル（それより少ないこともある）の分析対象物が必要であるにも拘らず、数個よりも少ない原子がレーザー脱着の間に消費されるにすぎないことが報告されてきた。したがって、10^5個ないし10^6個の用いた分析対象物の中の、ごく一部分が必要なのであって、残りは無駄になる。
固体基質中に分析対象物を埋め込むことに伴う有力なデータの、別の重要な損失は、プローブ表面上に残っている埋め込まれた分析対象物（例えば蛋白質あるいはDNA）について、後の化学的および（または）酵素による修飾を行う可能性の減少あるいは完全な排除である。分析対象物の、他のアリコットあるいは、埋め込まれた分析対象物を基質を含まずに回収する能力（回収率が低く困難）のみが、構造に関するデータを得るために行われる、本発明者らが示差質量分析測定と呼ぶ方法を可能にする。
さらに、恐らく多くの生物学者および臨床医らが、MSに慣れていること、および（または）その有用性に関しては懐疑的であるため、生物学の分野においてはMSの適用が制約されてきた。さらに、MSは、MALDIが適応されたいくつかの例では、特にSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動が十分な代用法であるため、取りつきにくいか、あるいは費用がかかりすぎるとされている（例えば、生物学的な粗溶液の分離）。さらに、MALDIは生物学雑誌および臨床雑誌にはほとんど現れない。

発明の要約
本発明の１つの目的は、複数あるいは選択した分析対象物のガス（蒸気）相への、一連の吸着、脱着、およびイオン化のための、改良された方法、材料の組成、および装置を提供することである。
別の目的は、多くの種類の化学的、物理学的、および生物学的修飾あるいは認識反応を、受け入れることができるかまたは受け入れやすい場所においての、分析対象物が基質溶液あるいは結晶性構造の中に分散されているのではなく、分子認識という事象を通して、エネルギーを吸収する「基質」物質の中、または上、または接着した表面の上に分析対象物が載置されている状況での分析対象物の脱着およびイオン化を含む、親和性による分析対象物の検出のための方法および装置を提供することである。
別の目的は、分析対象物質が、プローブ先端のサンプル載置表面を形成している基体に、化学的に結合しているか、あるいは物理的に接着するような方法および装置を提供することである。
別の目的は、サンプル載置表面を、エネルギー吸収性の分子を用いて修飾して、先行技術において行われる外来性の基質分子の添加なしに、分析対象物分子の好結果をもたらす脱着を可能にするための手段を提供することである。
別の目的は、質量の変わる分析対象物分子の脱着を容易にするために単層および多層の接着したエネルギー吸収分子が用いられているような種々の配置において、結合した（共有結合あるいは非共有結合）エネルギー吸収分子の適切な濃度を提供することである。
別の目的は、エネルギー吸収分子、親和性指向分析対象物捕捉デバイス、光電管などを用いて修飾した表面の、多数の組み合わせを提供することである。
別の目的は、プローブ先端あるいは他のサンプル載置表面を形成している物質が、あらかじめ決められた分析対象物あるいは何種類かの分析対象物と選択的に結合するよう、１つあるいはそれ以上の親和性試薬（種々の、濃度および増幅の程度）で誘導されるような方法および装置を提供することである。
別の目的は、標的である分析対象物あるいは一団の分析対象物に対し、親和性試薬が化学的に結合するかあるいは生物学的に接着するようなシステムを提供することである。
別の目的は、載置している表面上に含まれている分析対象物の未使用の部分が、化学的反応性を残しており、そのため分析対象物の一連の化学的、酵素的、あるいは物理的処理に続いて、修飾された分析対象物の連続的な分析ができるように、分析対象物を脱着およびイオン化するための方法および装置を提供することである。
別の目的は、分析対象物およびその成分の１次、２次、３次、または４次構造を解明する目的のための、標的分析対象物の、組み合わされた化学的あるいは酵素的修飾のための方法および装置を提供することである。
別の目的は、プロトン（H^+）以外の陽イオンが、分析対象物である巨大分子の脱着およびイオン化に用いられる、分析対象物質の脱着およびイオン化のための方法および装置である。
従って、前述の目的を達成するため、本発明によれば、質量分析測定法による、分析対象物サンプルの分析対象物分子の質量の測定のための装置が供せられ、前記装置は、分析計チューブと；前記チューブの内側に真空を適用するための真空手段と；前記チューブ内で、前記分析対象物サンプルから脱着した分析対象物分子に加速電位を与えるための電位手段と；前記分析対象物分子の脱着およびイオン化を促進するために表面に結合している分子と共同して、前記分析対象物サンプルを載置するための、前記分析計チューブに可動的に差し込み可能なサンプル載置手段において、前記表面分子が、エネルギー吸収分子、親和性捕捉デバイス、光感作性付着分子、およびそれらの組み合わせから成る群から選択したサンプル載置手段と；前記の表面に結合した分子と共に、前記サンプル載置手段の上に置かれた分析対象物サンプルにおいて、前記質量分析測定分析に消費されなかった前記分析対象物分子の少なくとも一部が、後の化学的、生物学的、あるいは物理的分析処置を受けやすいまま残っている分析対象物サンプルと；前記分析対象物サンプルから前記分析対象物分子の一部を脱着およびイオン化するために、十分なエネルギーを与えるために、前

記分析対象物サンプルに向けるレーザー光線を発生させるためのレーザー光線手段と；前記分析計チューブに結合し、イオン化された分析対象物の加速された分子を検出するための検出手段とから成る。

さらに、前述の目的を達成するための、本発明によれば、分析対象物分子の質量を測定するための質量分析測定法が供せられ、その方法は以下の段階すなわち、プローブ先端面上のサンプル載置表面を、分析対象物分子と結合するための手段を有する親和性捕捉デバイスで誘導するステップと；前記の誘導したプローブ先端面を、前記分析対象物分子の源にさらし、前記分析対象物分子が結合するようにするステップと；前記分析対象物分子が結合している、誘導されたプローブ先端を、飛行時間質量分析測定器の一方の端に置き、真空および電場を与えて分析測定器内に加速電位を作るステップと；前記先端より前記分析対象物分子のイオンを脱着させるために、分析測定器内の、誘導されたプローブ先端面に結合している分析対象物の少なくとも一部分を、１つあるいはそれ以上のレーザーパルスを用いて、打つステップと；前記質量分析測定器内で、飛行時間によってイオンの質量を検出するステップと；このように検出された質量を表示するステップとから成る。

さらに、前述の目的を達成するため、本発明によれば、レーザー脱着／イオン化、飛行時間質量分析測定法により、分析対象物分子の質量を測定する方法が提供せられ、この方法においては、分析対象物の脱着およびイオン化を容易にするために、前記分析対象物と一緒にエネルギー吸収物質が使われ、その改良点は、エネルギー吸収物質の上あるいは表面上に分析対象物分子を載置することを含み、前記質量分析測定分析において脱着されなかった、分析対象物分子の少なくとも一部は、後の分析を化学的に受け入れられる状態のまま残る。

さらに、前述の目的を達成するため、本発明によれば、分析対象物分子の脱着およびイオン化を容易にするための装置が提供せられ、その装置は、サンプルを載置する表面と、表面に結合した分子とから成り、前記表面結合分子は、エネルギー吸収分子と、親和性捕捉デバイスと、光感作性付着分子と、それらの組み合わせとから成る群から選ばれ、前記表面結合分子は、前記サンプル載置表面と結合し、前記分析対象物分子と結合する手段を有する。

さらに、サンンプル載置表面上の分析対象物分子を捕捉し、後の分析のため前記サンプル載置表面上から前記の捕捉された分析対象物分子を脱着／イオン化するための方法が提供せられ、その方法は、前記サンプル載置表面を、親和性捕捉デバイスあるいは前記分析対象物分子と結合するための手段を有する光感作性付着分子を用いて誘導するステップと；前記の誘導したサンプル載置表面を、前記分析対象物分子を含んでいるサンプルに当てるステップと；前記の誘導したサンプル載置表面上の分析対象物分子を、前記親和性捕捉デバイスあるいは光感作性付着分子により捕捉するステップと；前記親和性捕捉デバイスあるいは光感作性付着分子により、誘導されたサンプル載置表面に結合されると同時に、前記分析対象物分子をエネルギー源あるいは光源にさらして前記分析対象物分子の少なくとも一部を前記表面より脱着させることから成る。

さらに、本発明によれば、分析対象物分子を分析用に載置するための、表面の調製法が提供せられ、その方法は、前記分析対象物を支持するため、前記表面上に基質を供するステップと；その基質を、親和性捕捉デバイスあるいは前記分析対象物と選択的に結合する手段を有する光感作性付着分子で誘導するステップと；前記親和性捕捉デバイスあるいは光感作性付着分子と結合した前記分析対象物を検出する手段とから成る。

さらに、前記の目的を達成するため、本発明によれば、ガス相への完全な分析対象物の脱着を促進するためのプローブが供され、それは、サンプル提示表面と；そのサンプル提示表面に結合したエネルギー吸収分子とから成り、前記サンプルプローブがエネルギー源によって打たれると、前記サンプルプローブは、エネルギー吸収分子の上、上方、あるいは間に位置している完全な分析対象物分子の脱着を促進する。さらに、このプローブにおけるエネルギー吸収分子は、シンナムアミド、シンナミル臭化物、2,5－ジヒドロキシ安息香酸、およびα－シアノ－４－ヒドロキシケイ皮酸からなる群から選択される。

さらに、前記の目的を達成するため、本発明によれば、完全な分析対象物をガス相に脱着

するためのサンプルプローブが提供され、それは、サンプル載置表面と；表面に結合している分子とから成り、その表面に結合している分子は、少なくとも２つの結合部位を有する光感作性付着分子であり、少なくとも１つの部位は、分析対象物と結合することができ、さらに、その分析対象物結合部位は光不安定性である。
さらに、前記の目的を達成するため、本発明によれば、完全な分析対象物のガス相への脱着を促進するための、サンプルプローブが供され、それは、サンプル提示表面と；以下の２つのいずれか、すなわち前記サンプル提示表面に結合している、親和性捕捉デバイス、エネルギー吸収分子、および光感作性付着分子とから成る群より選択した、少なくとも２つの異なる分子であり、分析対象物が前記サンプルプローブと結合すると、そのサンプルプローブが、エネルギー源により打たれる際に分析対象物のガス相への移行を促進するというものと、前記サンプル提示表面に結合している少なくとも２つの異なる親和性捕捉デバイスであり、前記サンプルプローブがエネルギー源により打たれると、そのサンプルプローブが、前記分析対象物分子と結合している親和性捕捉デバイスに依存して異なる速度で、ガス相への分析対象物の移行を促進するというものとのいずれかから成る。
さらに、前記の目的を達成するため、本発明によれば、完全な分析対象物のガス相への脱着を促進するためのサンプルプローブが供され、それは、サンプル提示表面と；表面に結合している分子において、その表面に結合している分子が、エネルギー吸収分子として、さらに親和性捕捉デバイスとしても機能することができる分子か；あるいは、表面に結合している分子において、その表面に結合している分子が、少なくとも２つの異なる結合部位を有しており、少なくとも１つの結合部位がサンプル提示表面に結合しており、さらに、少なくとも１つの部位が分析対象物と結合することができ、分析対象物結合部位が光不安定性である分子のいずれかから成る。
さらに、本発明によれば、分析対象物の質量を測定するための質量分析測定法が供せられ、その方法は以下の段階、すなわち、プローブ先端面上のサンプル提示表面を光感作性付着分子（PAM）により誘導して、前記PAMが少なくとも２つの結合部位を有し、１つの結合部位が、サンプル載置表面と結合し、そして少なくとも１つの結合部位が、分析対象物分子と結合することができるようにするステップと；前記の誘導されたプローブ先端面を、前記分析対象物分子源に当て、そこに分析対象物分子が結合できるようにすることと；前記分析対象物が結合している誘導されたプローブ先端を、飛行時間質量分析計の一方の端に設置し、真空および電場を与えて分析計内に加速電位を作るステップと；分析計内の前記の誘導されたプローブ先端面に結合した分析対象物分子の少なくとも一部を、１つあるいはそれ以上のレーザーパルスでたたいて、前記先端より分析対象物分子のイオンを脱着させるステップと；前記質量分析計内での飛行時間によって、イオンの質量を検出することと；それらの検出された質量を表示することから成る。
さらに、レーザー脱着／イオン化、飛行時間質量分析測定法による分析対象物分子の質量の測定法において、分析対象物分子の脱着およびイオン化を容易にするために、前記分析対象物分子と共に光感作性付着分子（PAM）を用いる測定法が供せられ、その改良点は、PAMの上あるいは表面上に分析対象物を載置して、前記質量分析測定分析において脱着されなかった分析対象物の少なくとも１部を、後の分析法のために化学的な変化を受けやすい状態に残すことを含む。
さらに、本発明により、完全な分析対象物分子のガス相への差動脱着を促進するための、サンプルプローブが提供せられ、それは、サンプル提示表面と；そのサンプル提示表面に結合する２つの異なる光感作性分子とから成り、前記サンプルプローブがエネルギー源によってたたかれると、前記サンプルプローブが、前記分析対象物分子に結合している光感作性付着分子に依存して異なる速度で、分析対象物分子のガス相への移行を促進する。
さらに、本発明により、完全な分析対象物のガス相への脱着を促進する、サンプルプローブが提供せられ、それは、サンプル提示表面と；そのサンプル提示表面に結合している光感作性付着分子とから成り、前記サンプルプローブがエネルギー源によってたたかれると、前記サンプルプローブが、完全な分析対象物分子のガス相への移行を促進する。
さらに、本発明によれば、生体高分子の配列決定のための方法が提供せられ、それは以下

の段階すなわち、エネルギー吸収分子、親和性捕捉デバイス、光感作性付着分子、およびそれらの組み合わせから成る群より選択した、表面の選択分子を有するサンプル提示表面を含んでいるプローブ先端に、生体高分子分析対象物を結合するステップと；質量分析測定分析において生体高分子分析対象物を脱着し、前記生体高分子の少なくとも１部が、プローブ先端から脱着されないようにすることと、プローブ先端にまだ結合している生体高分子分析対象物を修飾している、脱着の結果を分析することと；生体高分子が配列決定されるまで、脱着、分析、および修飾の段階を繰り返すことから成る。

以下の明細書を読み、その１部を成し本発明の現在の好ましい実施例の実例を開示のために示している、添付図面を参照することにより、他の目的ならびにさらなる目的、特色、および利益が明らかになり、本発明が理解しやすくなるであろう。

【図面の簡単な説明】

本発明の前述の目的ならびにそれ以外の目的と有用性は、以下の明細書および添付図面から明らかになるてあろう。図1A（上図）は、中和したエネルギー吸収分子（シナピニン酸、pH6.2）の存在下に脱着した、３つのペプチド（ヒトの、ヒスチジンに富む糖タンパク質の金属結合ドメイン（GHHPH）$_2$G（1206Da），（GHHPH）$_5$G（2904Da）およびヒトエストロゲン受容体２量化ドメイン（D473－L525）（6168.4Da））の質量スペクトルを示す。図1B（下図）は、中性のエネルギー吸収分子の存在下における、これらのペプチドのその場所における連続的な金属（Cu）結合を示す。

図2A（上図）は、中和したエネエルギー吸収分子（シナピニン酸、pH6.5）の存在下に脱着した、ヒトカゼインリンペプチド（5P,2488Da）の、質量スペクトルを示す。図2B（上から２番目の図）は、リンペプチドからリン酸基を除くための、その場所における連続的な５分間のアルカリ性フォスファターゼによる消化を示す。図2C（上から３番目の図）は、先行技術に述べたように、酸性のエネルギー吸収分子（2,5ジヒドロキシ安息香酸、pH2）の存在下に、さらにその場所におけるフォスファターゼ分解を行った後の、リンペプチドの質量スペクトルを示す。

図３は、中和したエネルギー吸収分子（シナピン酸、pH6.2）の存在下に、カルボキシペプチダーゼＰによりその場所で消化する前（下図）および後（上図）の（GHHPH）$_5$Gペプチド（2904Da）の混成質量スペクトルを示す。

図４は、固体ガラス、ポリプロピレンで被覆したステンレス鋼、ポリスチレンで被覆したステンレス鋼、およびナイロンプローブエレメントから脱着したペプチド混合物の、混成基質補助レーザー脱着質量スペクトルを示す。

SEAC

図5Aは、IDA－Cu（II）表面によって吸着されないペプチド溶液中の、精子刺激因子（933Da）およびニューロテンシン（1655Da）（およびそれらの複数のNa付加物）の、質量スペクトルを示す。図5Bは、IDA－Cu（II）表面に選択的に吸着されたNa－付加物ピークを加えた、アンジオテンシンＩ（1296.5Da）の、質量スペクトルを示す。図5Cおよび図6Cは、IDA－Cu（II）上に吸着され、水で洗浄した後の、同じアンジオテンシンＩの質量スペクトルを示す。図6Dは、親和力で吸着したアンジオテンシンＩによる、その場所での連続的な銅の結合（１個および２個のCu）を示す。図6Eは、親和吸着したアンジオテンシンＩの、その場所での連続的なトリプシン消化を示す。

図７は、IDA－Cu（II）表面に親和性吸着した、ミオグロビン（４ないし8fモル）の質量スペクトルを示す。

図８（上図）は、粗混合物から、TED－Fe（III）表面に親和性吸着した、複数のリン酸化した形の合成カゼインペプチド（1934Da）の質量スペクトルを示す。その場所の連続したアルカリ性フォスファターゼによる消化の後、もとのリン酸化されていない形だけが残った（下図）。

図9Aは、幼児用処方における全タンパク質の、質量スペクトルを示す。図9Bは、TED－Fe（III）表面に親和性吸着した、幼児用処方におけるリンペプチドの質量スペクトルを示す。図9Cは、幼児用処方を与えた後に採取した、胎児の胃吸引物中の、全タンパク質の質量スペクトルを示す。図9Dは、TED－Fe（III）表面に親和性吸着した、胃吸引物中のリン

ペプチドの、質量スペクトルを示す。
図10Aは、Ｎ－グリカナーゼによる消化の前後の、IDA－Cu（II）表面に吸着された、ヒトおよびウシの、ヒスチジンに富む糖タンパク質の混成質量スペクトルを示す。質量の変化は、各糖タンパク質からの炭水化物の除去を意味する。図10Bは、グリコシル化した２種類のタンパク質（上図、ヒトタンパク質；下から２番目の図、ウシタンパク質の）からの、トリプシンで消化したペプチドの混成質量スペクトルおよび、トリプシンで消化した２種のペプチド（上から２番目の図、ヒトタンパク質；下図、ウシタンパク質、1,2の数字は、結合したCuの数を表す）の、その場所におけるCu（II）との結合を示す。図10Cは、かかるCu（II）結合ペプチド（下図）が、ジエチルピロカルボン酸エステルにより特異的に修飾されて4N－カルベトキシ－ヒスチジル付加物（上図、１～４）を形成する、少なくとも４つのHis残基を有することを示す。図10Dは、ウシのヒスチジンに富む糖タンパク質における、主要なCu－結合ペプチドの、Ｃ－末端の部分的な配列を示す。
図11（下図）は、ヒツジ抗ウサギIgG常磁性表面に親和性吸着した、ウサギ抗ヒトラクトフェリン免疫グロブリンのみ（対照）の質量スペクトルを示す。上図は、ヒツジ抗ウサギIgG常磁性表面に親和性吸着した、ヒトラクトフェリンとウサギ抗ヒトラクトフェリン免疫グロブリンとの複合体の質量スペクトルを示す。
図12は、胎児尿から抗ヒトラクトフェリン免疫グロブリンナイロン表面に親和性吸着した、ヒトラクトフェリンの質量スペクトルを示す。
図13は、1nモル/mlのラクトフェリンを含んでいる、全胎児尿の同等の質量スペクトルを示す。
図14（下図）は、精製したウシのヒスチジンに富む糖タンパク質の質量スペクトルを示す。上図は、ウシ初乳から、ウシのヒスチジンに富むタンパク質に対する免疫グロブリン表面に親和性吸着した、ウシのヒスチジンに富む糖タンパク質およびフラグメントの質量スペクトルを示す。
図15は、異種の抗濾胞刺激ホルモン抗体によって認識される、濾胞刺激ホルモンのペプチドの、混成質量スペクトルを示す。
図16は、直径0.5mmのプローブエレメント上に置かれた、１本鎖DNAアガロースの単一のビーズの上に親和性を吸着された、ヒトラクトフェリンの質量スペクトルを示す。
図17は、胎児尿から１本鎖DNA表面に親和性吸着した、ヒトラクトフェリンの質量スペクトルを示す。
図18Aは、ヒト十二指腸吸引物中の全タンパク質（下図）と、この吸引物から大豆トリプシンインヒビター表面に親和性吸着したトリプシン（上図）との、混成質量スペクトルを示す。図18Bは、この吸引物1ulから大豆トリプシンインヒビターナイロン表面に親和性吸着したトリプシンの質量スペクトルを示す。
図19Aは、ヒト尿からストレプタビジン（Streptavidin）表面に親和性吸着した、ビオチニル化したインシュリンの質量スペクトルを示す。図19Bは、ヒト血漿からストレプタビジン表面に親和性吸着した、ビオチニル化したインシュリンの質量スペクトルを示す。
図20（上図）は、ヒト血清中の全タンパク質の質量スペクトルを示す。図20（下図）は、ヒト血清からシバクロン－ブルー（Cibacron－blue）表面に親和性吸着した血清アルブミンの質量スペクトルを示す。
SEND
図21は、表面結合桂皮酸アミドの分子構造を示し、Ｒは架橋剤を加えた表面を表す。
図22（上図）は、表面結合性皮酸アミドから脱着したペプチド混合物の質量スペクトルを示す。図20B（下図）は、遊離の桂皮酸アミドを用いた同じペプチド混合物の質量スペクトルを示す。
図23は、表面結合桂皮酸ブロマイドの分子構造を示し、Ｒは架橋剤を加えた表面を示す。
図24（上図）は、表面結合桂皮酸ブロマイドから脱着した、ペプチド混合物の質量スペクトルを示す。図22B（下図）は、遊離の桂皮酸ブロマイドを用いた同じペプチド混合物の質量スペクトルを示す。
図25は、表面結合MAP－ヒドロキシ安息香酸の分子構造を示し、Ｒは架橋剤を加えた表面

を表す。
図26（上図）は、表面結合MAPのみから脱着したペプチド混合物の質量スペクトルを示す。図26（下図）は、表面結合MAP－ジヒドロキシ安息香酸から脱着したペプチド混合物の質量スペクトルを示す。
図27Aは、表面結合α－シアノ－４－ヒドロキシ桂皮酸から脱着したミオグロビンの質量スペクトル（1,200～50,000m/z領域）を示す。図25Bは、低い質量領域（０～1200m/z）における、同質量スペクトルを示す。
図28は、グルタールアルデヒドによる活性化によって、ポリアクリルアミドあるいはナイロンまたはアクリル表面に結合した、エネルギー吸収分子の分子構造を示す。
図29は、ジビニルスルホンによる活性化によって、ポリアクリルアミドあるいはナイロンまたはアクリル表面に結合した、エネルギー吸収分子の分子構造を示す。
図30は、ジシクロヘキシルカルボジイミドによる活性化によってポリアクリルアミドあるいはナイロンまたはアクリル表面に結合した、エネルギー吸収分子の分子構造を示す。
図31は、ジシクロヘキシルカルボジイミドによる活性化によって、複数の抗原ペプチドをつけたポリアクリルアミドあるいはナイロンまたはアクリル表面に結合した、エネルギー吸収分子の分子構造を示す。
図32は、イミノジアセテート（IDA）－Cu（II）表面に結合したチオサリチル酸の分子構造を示す。
図33は、チオサリチル酸－IDA－Cu（II）表面から脱着した、ヒトエストロゲン受容体の２量化ドメイの質量スペクトルを示す。
図34は、DEAE表面に結合したα－シアノ－４－ヒドロキシ桂皮酸の分子構造を示す。
図35は、シナピン酸－DEAE表面から脱着した、ヒトエストロゲン受容体の２量化ドメインの質量スペクトルを示す。
図36は、ポリスチレン表面に結合したα－シアノ－４－ヒドロキシ桂皮酸の分子構造を示す。
SEPAR
図37は、光分解結合により表面に固定化した、ヒスチジンに富む糖タンパク質の金属結合ドメインの、Ｃ－末端の配列分析を示す。
発明の詳細な説明
ここに開示されている発明に対しては、発明の精神を逸脱しないで、種々の置換や修正が可能であることは、当業者には明らかであろう。
プローブ素子に特定の分析対象物の捕捉および収容に積極的に関与することができるようにする表面を有する新しいMSプローブ素子組成物の開発は、最近、親和性質量分析測定（AMS）と呼ばれる領域で、いくつかの可能性を明らかにしてきている、要約的に言うと、いくつかのタイプの新しいMSプローブ素子が親和性捕捉用強化表面（Surfaces Enhanced for Affinity Capture:SEAC）を用いて設計されている（Hutchens and Yip,Rapid Commun Mass Spectrom,7:576－580（1993））。現在までのところ、SEACプローブ素子は蛋白質の表面構造および生物固有分子認識について知られていることを活用して、種々のタイプの生体高分子、特に蛋白質の検索に用いられて、成功を収めている。
構造生物学における進歩は、充分な程度の感度での生体高分子配列情報を入手することができないことから、引き続き一定限度にとどまっている。本発明の方法および装置を用いることによって、AMSがこのような制約を打破する可能性を提供することを実証した。MSプローブ素子表面（つまり、SEAC）上の不動態化親和性捕捉装置は、そのプローブ表面に対する分析対象物の位置および親和性（特異性）を判定するので、その後で行われる分析的AMSプロセスがいくつかの理由から一層効率的になる。第一に、プローブ素子上での分析対象物の位置を予め決めることができる。したがって、その後の脱着プローブは入射レーザービームによるプローブ表面マトリックスフィールドのランダムサーチにはもはや依存しなくてすむ。第２に、分析対象物検出の感度（および動的範囲）が、複雑な構造物の場合にしばしば観察される分子イオン化抑制効果のために増大される。第３に、最初のレーザーによって誘発される脱着プロセスによって実際に消費されない分析対象物を後で行

われる分析のために引き続き利用することができる。分析対象物の脱着を速やかに行うために外来性基質（matrix）を用いた場合、ほとんどの場合で、引き続き使用する分析対象物をロスすることなく、それを取り除くことができる。残った分析対象物は、その場所で（つまり、プローブ素子上で）、化学的および／または酵素的に直接修飾することができる。質量の違いを判定するためにMSで再度分析した場合、特殊な構造上の詳細が明らかになる。非常に少量の分析対象物（1000兆分の１モル以下）しか消費しないで、構造に関する情報を引き出すために、分析／修飾のプロセス全体を何回も繰り返すことができる。今日までに行われたAMSに基づく蛋白質構造分析としては、Ｎ－およびＣ－両方の端末配列分析、および加リン酸化、脱リン酸化、グリコシル化、システイン残基反応、部位固有化学修飾（ヒスチジン残基など）、および配位子結合など、いくつかのタイプの配列固有の翻訳後修飾の確認などを含んでいる。

生体高分子配列を判定したり、個々の生体高分子の構造の解明のためには、機能的分子上会合の構造的決定因子を理解する能力が必要になる。高次（たとえば、四元）構造物の構造的決定因子を調べる可能性も、AMSが提供する。本発明を用いることによって、従来の生化学分析手順では簡単には行なかったような共有結合によらない分子認識イベントを、プローブ素子表面の直接、あるいは間接的につながれた巨大分子分析対象物との分子的会合の評価によって直接調べることができる。

ここで用いられている『分析対象物』（analyte）とは原子および／または分子を意味し、その錯体および断片イオンを含み、生物巨大分子の場合、蛋白質、ペプチド、DNA,RNA、炭水化物、ステロイド、および脂質などを含む。生命プロセスの構造あるいはその調節に関与している点で調査の対象となる重要な生化学分子のほとんどは、非常に大型である（通常、H_2Oの数千倍）。

ここで用いられている『分子イオン』とは、通常、１つあるいはそれ以上の陽子（H^+）を付加したり、あるいは失うことによる、荷電あるいはイオン化された状態の分子を意味している。

ここで用いられている『分子断片化』あるいは『断片イオン』は、例えば、レーザー誘発脱着（特に付加された基質（matrix）が存在しない条件で）中に発生する分析対象物分子の破壊された断片を意味している。

ここで用いられている『固体相』とは、例えば、プローブ素子表面上で固体状態にあることを意味している。

ここで用いられている『ガス』あるいは『蒸気相』とは、気体状態（真空中質量分析測定の場合）の分子を意味している。

ここで用いられている『分析対象物脱着／イオン化』という用語は分析対象物の固体相からイオンなどの気相への変移を意味している。なお、レーザー脱着による大型の、完全な分子イオンの脱着／イオン化が成功したのは比較的最近のことで（1988年）、適切な基質（ニコチン酸）が偶然発見されたことは突破口になった。

ここで用いられている『気相分子イオン』とは、気相状態にあるイオンのことを意味している。なお、蛋白質など分子量が大きなイオン（標準的な重量＝陽子１個の60,000～70,000倍）は通常気化しない（つまり、それらは通常気相あるいは蒸気相の状態には入らない）。しかしながら、本発明による手順においては、蛋白質などの分子量が大きなイオンでも気相あるいは蒸気相に入ることができる。

MALDIに関連して用いられている『基質』（matrix）とはいくつかの、小型で、光吸収性のある化学物質（例えばニコチン酸、あるいはシナピン酸）を意味しており、プローブ素子上で乾燥した場合に、結晶性の、基質に埋め込まれた分析対象物分子が（レーザー照射によって）良好に脱着され、固体相（結晶）から気相あるいは蒸気相にイオン化され、完全な分子イオンとして加速されるような方法で分析対象物と共に溶液内に混合される。MALDIプロセスをうまく行わせるためには、分析対象物を新たに作成された化学的基質と混合させ（例えば、基質：分析対象物の10,000:1の割合で）、質量分析測定分析を行う直前に、不活性なプローブ素子の表面において空気で乾燥させる。飽和に近い濃度で存在している基質がモル数で何倍も多いので、分析対象物の結晶形成および捕捉が簡単に行われる

。
ここで使われている『エネルギー吸収分子（EAM）』とは、（SENDの場合のように）プローブ素子の表面に置かれた場合、後で完全な分子イオンとして加速されるようにするために、固体相（つまり、表面）から気相あるいは蒸気相への脱着をより容易に行わせるようにするいくつかの、小さな、光吸収性化学物質を意味している。SENDという用語との関連では、EAMという用語を用いるのが好ましい。なお、SENDプロセスによる分析対象物の脱着は、面依存プロセスと定義される（つまり、分析対象物が結合EAMによって構成された表面上に配置される）。対照的に、MALDIは、現在のところ、表面全体を気相に『投げ込む』ような火山の爆発タイプのプロセスによって、分析対象物の脱着を速やかに行わせるものと考えられている。さらに、一部のEAMは、MALDIプロセスで述べられたように分析対象物分子を埋め込むために遊離化学物質として用いられた場合、作用を発揮しない（つまり、それらは分子脱着を促進しないでの、それらは適した基質分子とは言えない）。
ここで用いられている『プローブ素子』あるいは『サンプル提示装置』とは、以下の様な物理的性質を有する素子を意味している：つまり、不活性で（例えば、ステンレス鋼などの場合のように）、しかも積極的な役割を果すもの（例えばEAMを含む様に強化された表面を有するプローブ素子および／または分子捕捉装置）。
ここで用いられている『MALDI』とは、基質支援レーザー脱着／イオン化のことを意味している。
ここで用いられている『TOF』とは飛行時間（Time－of－Flight）のことである。
ここで用いられている『MS』とは質量分析測定（Mass Spectrometry）のことである。
ここで用いられている『MALDI－TOF　MS』とは基質支援レーザー脱着／イオン化、飛行時間質量分析測定のことを意味している。
ここで用いられている『ESI』とは、電子スプレイイオン化の略語である。
ここで用いられている『化学結合』とは、単に、ひとつの化学物質（例えば、基質）を他の物質（例えば、不活性なプローブ素子表面）上に置いた場合に見られる様な、明確には定義されないような一般的な性格の化学的相互作用から、合理的で、熟慮された、そして分かっている、公知のタイプの化学的相互作用の操作を区別する意味で用いられている。定義されているタイプの化学結合としては、静電あるいはイオン性（＋／－）結合（例えば、蛋白質表面での正に荷電された基と負に荷電された基）、共有結合（電子の共有によって生じる非常に強力で、『永続的な』結合）、同位共有結合（例えば，蛋白質内の電子供与体基と銅または鉄などの遷移金属間の）、そして疎水性相互作用（例えば、２つの非荷電基間の）などがある。
ここで用いられている『電子供与体基』とは、生化学分子内の原子（例えば、N,S,O）が電子を『供与』したり、あるいは弱電基（例えば、銅イオンや他の遷移金属イオン）と電子を共有したりするような場合を意味する。
本発明はレーザー脱着／イオン化用強化表面（SELDI）を有する一般的なカテゴリーのプローブ素子（サンプル提示手段）を用い、このSELDIは以下の３つのサブ・カテゴリーがある。プローブ素子表面（サンプル提示手段）がその表面の直接（そのまま）付加された分析対象物の脱着／イオン化を容易に行わせるために、『基質』（matrix）の代わりにエネルギー吸収分子（EAM）を含むように設計されているニート脱着用強化表面（SEND）。
このカテゴリー１（SEND）は単独で、あるいは、プローブ素子表面（サンプル提示手段）が、種々のメカニズム（ほとんどは共有結合）によって、分析対象物のそのプローブ表面への特異的、あるいは非特異的な付着、あるいは吸着（いわゆる格納、または連結）を容易に行わせるための、化学的に定義された、そして／または生物学的に定義された親和性捕捉装置を含む様に設計されている親和性捕捉用強化表面（SEAC）（カテゴリー２）との組み合わせで用いられる。カテゴリー２（SEAC）は付加された基質と共に用いられるか、あるいは、付加された基質なしでカテゴリー１（SEND）との組み合わせで用いられる。したがって、SENDとSEACの組み合わせは、実際的には、別のカテゴリーとなる。
カテゴリー３は光の影響により付着及び放出用SEPAR強化表面を用いるもので、この場合、プローブ素子表面（サンプル提示手段）は１つ、あるいは複数のタイプの、共有結合を

利用した収容デバイスとして化学的に定義された架橋分子を含むように設計／修飾されている。これらの光感作付着分子（PAM）は２価あるいはそれ以上の電荷を有しており、つまり、一方では先ずサンプル提示手段のプローブ素子表面にPAMを永続的に付着させるように反応し、一方で、PAMの別の反応面が、分析対象物がPAM－誘導プローブ表面に接触した場合にその分析対象物を反応できるような状態にある。こうした表面（サンプル提示手段）は、共有結合に基づくものではあるが光の照射を受けた場合に可逆的な反応を示す（つまり、光感作性のある）非常に強力な（つまり、安定した、共有結合による）分析対象物の付着および吸着（つまり、収容あるいは連結）プロセスを可能にしてくれる。こうした表面は構造的回析を目的とする、その場所での（つまり、プローブ端上で直接）化学的および／または酵素的に修正されるための分析対象物のレーザーを利用した脱着のためのプラットフォームを提供してくれる。実際に照射を受ける（全体のうちの極小部分のみ）プローブ表面上の分析対象物だけが脱着される。連結された分析対象物の残りは共有結合で結合されたままとなっており、表面からの何らかの予定外の結合解除によるロスなしで修正される。SEPARカテゴリー（カテゴリー３）は、光への露出によって可逆的な反応を示す分析対象物付着プロセスによって特徴づけられている。しかしながら、分析対象物とプローブ表面の付着結合の光に依存した可逆反応が進んでも、分析対象物が気相状態にいつでも変化するとは限らない。言い換えると、プローブ表面への分析対象物の光感作性付着に関与する分子が、SENDに関連して述べられたようなエネルギー吸収分子（EAM）と同じであるとは限らない。しかしながら、ここに重要な例外がある。本発明はSENDおよびSEPARに関して２重の機能性を発揮するハイブリッドEAM/PAM化学物質を含んでいる。つまり、現在SENDのために用いられている一部のEAM分子は、SENDとSEPARプロセスの両方の媒介因子として作用するように修正することができる。同様に、SEACとSEPARの両方に関して２重の機能性を示す１部のハイブリッド親和性捕捉/PAM化学物質も提供される。本発明は１部の親和性捕捉デバイス、特に、生物学的に明確に定義され、SEACとSEPARプロセスの両方の媒介因子として修正されるものを利用する。

本発明は、そうした目的のために、分析対象物の付着（連結あるいは固着）と、その後での連結された分析対象物の光に依存した脱着をすみやかに行わせる表面会合（あるいは表面結合）分子を利用したサンプル提示手段（すなわち、プローブ素子表面）を提供するものであり、ここで、上記表面分子は、分析対象物分子のサンプル提示手段への（共有結合を利用した付着メカニズムなどによる）結合（収容、連結、あるいは架橋）に関与する光に対して反応性を示す（光感作性）分子で構成されるグループから選択されることを特徴とする。さらに、その内部で、光（例えば、ひとつ、あるいは複数のレーザーからの）の入射パルスを用いて、後で行われる分析対象物のプローブの静止した（固体）表面からの気相（蒸気相）への脱着に支障を来たさないような方法で、プローブ表面に結合している分析対象物の光感作性結合を破壊することができるように、分析対象物がひとつ、あるいは複数の光感作性結合によってサンプル提示手段の表面に結合されることを特徴とする、サンプル提示手段（上に述べたような適切なプローブ素子物質のうちのひとつ、あるいは複数のもので構成されている）が提供される。

SEPARサンプル提示手段（つまり、プローブ素子表面）と分析対象物（例えば、蛋白質）との間の光感作性分子付着点のタイプと数を決定する化学的な特異性には、分析対象物内のひとつ、あるいは複数の残基、あるいは化学構造（例えば、蛋白質やペプチド類の場合のHis,Lys,Arg,Tyr,PheおよびCys残基）が関係している可能性がある。言い換えると、蛋白質やペプチド類の場合、SEPARサンプル提示手段は、複数の異なったタイプの付着点で分析対象物を固定するためのいくつかの違ったタイプの光感作性付着分子で修正されたプローブ表面を含むことができる。

分析対象物とプローブ素子表面との間の光感作性付着を破壊するのに必要な光の波長、あるいは光の強度は静止状態から気相あるいは蒸気状態への分析対象物の脱着を速やかに行わせるために必要な光の波長や光の強度を同じ場合もあれば、異なる場合もあるであろう。プローブ素子表面（例えば、サンプル提示手段）への分析対象物、特にペプチド、蛋白質、リボ核酸（RNA）、デオキシボ核酸（DNA）および炭水化物（CHO）などの生体高分子

の付着には、プローブ表面と分析対象物巨大分子間の複数の付着点が関与している可能性がある。生体高分子が複数の付着点を介して付着されると、その生体高分子の骨格の異なった点を、化学的および／または酵素的手段によって切断、あるいは断片化され、その結果生じる断片の多くは分離された別個の分析対象物となり、それぞれ、ひとつ、あるいは複数の光感作性結合によってプローブ表面に付着（連結）されたままであり、飛行時間質量分析装置によって同時に行われる質量分析と同時並行的に気相状態に脱着させる。
このプロセスにより、生体高分子（蛋白質、ペプチド、RNA,DNA、炭水化物）配列決定が可能になる。
ここで用いられている『親和性』とは２つの分子間の物理的および／または化学的吸引を意味している。一般的には、生化学的活性（つまり、情報伝達）の構造や調節を示す目的で用いられる。通常、ひとつの生化学分子の他の生化学分子に対する親和性は非常に特異的である。ここでは、問題の分子分析対象物が捕捉される原理を示す目的で用いられている。SEACの場合、問題の分析対象物に対して特異的な親和性を示す化学物質あるいは生化学分子はプローブ素子の表面に連結（結合）され、望ましい分析対象物を積極的に『探し』出して、選択的にそれと結合する。
ここで用いられている『分子認識』とは、相互に対する自然な親和性による２つの分子間の相互作用を意味している。
ここで用いられている『分子捕捉』とは、特異的な親和性関係が存在している他の生化学分子を吸引、結合（捕捉）するために連結された生化学分子を用いることを意味する。
ここで用いられている『受動的吸着』とは、単に分析対象物を（例えば、基質と共に）置くことを意味している。
ここで用いられている『能動的収容』とは、SEACの場合のように、活性のあるプローブ素子表面で分析対象物分子を慎重に捕捉することを意味する。
ここで用いられている『静止状態』とは固体相と同じ意味である。ここでは、プローブ素子表面自体、あるいは不活性プローブ素子表面との組み合わせで用いられる『外部』微粒状SENDまたはSEACデバイスを意味している。
ここで用いられる『活性表面領域』とは、望ましい反応または事象（例えば、EAM付着または親和性捕捉）に関与すると考えられる、あるいは関与することが分かっている表面の領域のことを意味している。この活性表面領域は全表面積と比較すれば相当小さな割合である（これは、立体障害などの物理的な効果によって、総面積の一部が使えない、あるいは役に立たないからである）。
ここで用いられている『配位子』とは、大型の分子（魚）に結合比較的小さな分子（餌）を意味している。ここでは、配位子はリンカーアーム（釣り糸）を介してプローブ素子表面に付着（化学的に結合する）。こうしたプロセスにより、生化学分子の捕捉活動を表面（静止あるいは固体相状態）上で局所化することが可能になる。
ここで用いられている『親和性剤』とは、分析対象物捕捉デバイス、つまり、分析対象物を認識し、それに結合する能力を保持しつつ、（共有結合、化学的吸着などによって）提示表面上に保持される能力を持つタイプの分子（人造、非天然、天然、あるいは生物によるものとを含む）および／または化合物を意味している。
ここで用いられる『脱着』とは、分析対象物のプローブ表面からの脱離、および／または分析対象物の気相への移行を意味している。
ここで用いられている『イオン化』とは、分析対象物上にひとつ、あるいはそれ以上の電子単位に等しいプラスまたはマイナスの電荷をつくりだしたり、あるいは保持したりすることを意味している。
ここで用いられている『内転』とは、分析対象物を会合した付加物質の出現を意味しており、通常、過剰な基質（あるいは基質分解生成物）と分析対象物との直接の反応によって起きる。
ここで用いられている『吸着』とは、上記エネルギー吸収物資、親和性剤（分析対象物捕捉デバイス）、および／または分析対象物のプローブ（提示表面）への化学的な結合（共有結合および／または非共有結合）を意味する。

本発明の１つの実施例は、質量分析測定によって分析対象物サンプルの分析対象物分子の質量を測定する装置であって、該装置は分析計チューブ、該分析対象物サンプルから脱着された分析対象物分子への加速電位を付加するための、上記チューブ内に配置された電位（付加）手段、該分析対象物の脱着およびイオン化を速やかに行わせるために、表面会合分子と会合した状態で該分析対象物サンプルを提示するための、該分析計チューブに取り外し可能に挿入されるサンプル提示手段で、該表面分子がエネルギー吸収分子、親和性捕捉デバイス、光感作性付着分子、およびそれらの組み合わせで構成されるグループから選択されることを特徴とするサンプル提示手段と、該表面会合分子と会合した状態で該サンプル提示手段上に配置され、それによって、該質量分析測定分析で消費されなかった該分析対象物分子の少なくとも一部が後で行なわれる化学的、生物学的、あるいは物理的分析手順に用いることができる分析対象物サンプルと、該分析対象物サンプルからの該分析対象物分子を脱着、イオン化するのに十分なエネルギーを付与するために該分析対象物サンプルに向けられたレーザービームをつくりだすレーザービーム手段と、そして、加速化されたイオン化分子による衝撃を検出するための検出手段によって構成されている。

本発明の他の実施例は、分析対象物分子の質量を測定するための質量分析測定の方法であって、この方法は、分析対象物分子と結合するための手段を有する親和性捕捉デバイスでプローブ端面上のサンプル提示表面を誘導するステップと；該誘導されたプローブ端面を該分析対象物分子の供給源に露出して該分析対象物分子をそこに結合させるステップと；そこに結合した該分析対象物分子によって誘導されたプローブ端を飛行時間質量分析計の一端において真空にし、電場を発生してその分析計内部に加速電位を形成するステップと、上記分析計内部の該誘導されたプローブ端面に結合した分析対象物分子の少なくとも１部を１つ、あるいは複数のレーザーパルスで衝撃を与えて、該先端から該分析対象物分子のイオンを脱着させるためのステップと；該質量分析計内部でのその飛行時間によってそれらイオンの質量を検出するステップと；それら検出された質量を表示するステップとで構成されている。好ましい実施例においては、この方法はさらに脱着／イオン化支援基質物質を親和性捕捉デバイスと組み合わせて該プローブ端に適用するステップを含んでいる。より好ましい実施例においては、この方法はさらに、該プローブ端を該質量分光計から取り出すステップと、脱着されなかった該分析対象物分子の該部分の組成を変えるために、脱着されなかった該分析対象物分子の該部分に化学的、または生物学的手順を行うステップと、該変性された分析対象物分子と共に該プローブ端を再挿入するステップと；そして、該変性された分析対象物分子の分子量を判定するために、後で質量分析測定を行うステップとを含んでいる。

さらに別の実施例では、該親和性捕捉デバイスは該プローブ端の該面に化学的に結合されたり、該プローブ端の該面に物理的に接着されたり、あるいは該分析対象物分子に生物学的に接着するのに適合化されたりする。さらに別の実施例では、該分析対象物分子は生体高分子であり、該親和性剤は分化されていない生体サンプルから該生体高分子を選択的に分離するように調製されている。また、好ましい実施例においては、該基質物質が弱酸性から強酸性のpH範囲にある。さらに好ましい実施例においては、該基質物質は6.0以上のpH値を有している。さらにまた別の実施例では、該プローブ端の面が電気絶縁性の物質で構成されている。

本発明の別の実施例は、その内部でエネルギー吸収物質がその分析対象物分子の脱着およびイオン化を速やかに行わせるために該分析対象物分子と組み合わせて用いられるレーザー脱着／イオン化、飛行時間質量分析計で分析対象物分子の質量を測定する方法であり、その改良点は、上記エネルギー吸収物質の表面上あるいはその上方に上記分析対象物分子を提示し、該質量分析測定分析で脱着されなかった分析対象物分子の少なくとも１部が後で行われる分析手順で化学的に利用できる点にある。

本発明のさらに別の実施例は、分析対象物分子の脱着およびイオン化を速やかに行うための装置で、該装置は、サンプル提示表面と、表面会合分子で構成されており、その表面会合分子はエネルギー吸収物質、親和性捕捉デバイス、光感作性付着分子、およびそれらの組み合わせで構成されるグループから選択され、該表面会合分子は該サンプル提示表面と

会合しており該分析対象物分子と結合するための手段を有している。
好ましい実施例においては、該サンプル提示手段は、飛行時間質量分析測定分析計に使用されるプローブ先端の表面で構成されている。さらに、この好ましい実施例では、該サンプル提示表面に化学的に結合したり、該サンプル提示表面に物理的に接着されたり、該分析対象物分子と化学的に結合したり、あるいは、該分析対象物分子と生物学的に接着したりする親和性捕捉デバイス、あるいは光感作性付着分子が用いられる。さらに、この好ましい実施例で用いられる分析対象物分子は生体高分子であり、該親和性捕捉デバイスあるいは光感作性付着分子は分化されていない生物学的サンプルから該生体高分子を選択的に分離するように適応される。
さらに、この装置は、基質物質を該親和性捕捉デバイスあるいは光感作性付着分子と会合させた状態で該サンプル提示表面上に置くようにしてもよい。より好ましい実施例では、この基質物質は弱酸性から強酸性のpH範囲にある。最も好ましい実施例においては、この基質物質のpH6.0以上である。加えて、好ましい実施例では、電気絶縁性物質で形成されたサンプル提示表面が用いられる。
本発明のさらに別の実施例では、サンプル提示表面上に分析対象物分子を捕捉し、後で分析を行うために該捕捉した分析対象物分子を該サンプル提示表面から脱着あるいはイオン化するための、該サンプル提示表面を親和性捕捉デバイスあるいは該分析対象物分子と結合するための手段を有する光感作性付着分子で誘導させるステップと、該親和性捕捉デバイスあるいは光感作性付着分子で該誘導されたサンプル提示表面上に該分析対象物分子を捕捉するステップと、該分析対象物分子を、該親和性捕捉手段あるいは光感作性付着分子によって該誘導されたサンプル提示表面に結合したままの状態で、エネルギーあるいは光源に露出させて、該表面から少なくとも該分析対象物の１部を脱着させるステップで構成されている。
本発明のさらに別の実施例は分析のための分析対象物分子を提示するための表面を作成する方法であって、この方法は該分析対象物を支持するための基板（substrate）を提供するステップと、親和性捕捉デバイスあるいは該分析対象物と選択的に結合するための手段を有する光感作性付着分子によって該基板を誘導させるステップと、そして、該親和性捕捉デバイスあるいは光感作性付着分子を結合した分析対象物分子を検出するための手段とで構成されている。好ましい実施例においては、該表面に検出用の物質を付加するステップが提供される。さらに好ましい実施例においては、こうした検出用物質は蛍光種、放射性種、あるいは発光性種である。
別の好ましい実施例においては、該親和性捕捉デバイスあるいは光感作性付着分子と会合した状態で脱着／イオン化支援物質を該サンプル提示表面に沈着させるステップが含まれている。さらに好ましい実施例においては、エネルギー源はレーザーで構成されている。
別の好ましい実施例においては、親和性捕捉デバイスが用いられ、該エネルギー源はイオン源である。さらに、好ましい実施例では、該エネルギー源に露出後も該分析対象物分子が該サンプル提示表面に結合したままである。より好ましい実施例においては、少なくとも該誘導されたサンプル提示表面上に結合したままの分析対象物分子の少なくとも１部を化学的、生物学的、あるいは物理的な反応によって修飾された分析対象物分子に転換するステップが含まれており、ここで、該分析対象物分子は該親和性捕捉デバイスあるいは光感作性付着分子によって該誘導されたサンプル提示表面に結合したままであり、そして、さらに該修飾された分析対象物分子をエネルギー源に露出して少なくとも該修飾された分析対象物分子を該表面から脱着するステップが含まれている。
本発明の１つの実施例においては、完全な分析対象物を気相に脱着するサンプルプローブが、サンプル提示表面と、そして、該サンプル提示表面と会合したエネルギー吸収分子を含んでおり、該サンプルプローブは、該サンプルプローブがエネルギー源によって衝撃を与えられた時にエネルギー吸収分子上、あるいはその上方、あるいはその間に沈着された完全な分析対象物分子の脱着を速やかに行わせることを特徴としている。より好ましい実施例では、エネルギー吸収分子が、桂皮酸アミド、桂皮酸ブロマイド、2,5－ジヒドロキシ安息香酸、およびα－シアノ－４－ヒドロキシ桂皮酸で構成されるグループから選択さ

れる。さらに別の好ましい実施例においては、ガラス、セラミックス、テフロン被覆磁性物質、有機高分子物および天然の生体高分子で構成されるグループから選択される。
別の好ましい実施例においては、元のままの分析対象物の気相への脱着を促進するサンプルプローブが含まれており、このサンプルプローブはサンプル提示表面と、該サンプル提示表面と会合した親和性捕捉デバイスで構成されており、該サンプルプローブがエネルギー源によって衝撃を与えられた時に、該サンプルプローブが元のままの分析対象物分子を気相に速やかに転移させることを特徴としている。好ましい実施例においては、親和性捕捉デバイスは、金属イオン、蛋白質、ペプチド類、免疫グロブリン、核酸、炭水化物、レクチン、染料、還元剤、およびそれらの組み合わせで構成されるグループから選択される。別の好ましい実施例においては、サンプル提示表面はガラス、セラミックス、テフロンで被覆した磁性物質、有機高分子物、および天然の生体高分子で構成されるグループから選択される。
別の実施例は完全な分析対象物を気相に脱着させるサンプルプローブを含んでおり、このサンプルプローブはサンプル提示表面、および、表面会合分子で構成されており、該表面会合分子は少なくとも２つの結合部位を有する光感作性付着分子であり、少なくとも、その１つの部位はサンプル提示表面と結合しており、少なくとも１つの部位は分析対象物を結合させるために用いることができ、さらに、分析対象物結合部位は光感作性である。
別の実施例では、完全な分析対象物の気相への脱着を促進するためのサンプルプローブが設けられており、このサンプルプローブはサンプル提示表面と、親和性捕捉デバイス、エネルギー吸収分子および該サンプル提示表面と会合した光感作性付着分子で構成されるグループから選択される少なくとも２つの異なった分子の混合物か、あるいは該サンプル提示表面と会合した光感作性付着分子のいずれかで構成されており、分析対象物が該サンプルプローブと会合される場合に、該サンプルプローブがエネルギー源によって刺激を与えられた場合に該サンプルプローブが分析対象物の気相への転移を促進することを特徴としており、さらにこのサンプルプローブは該分析対象物分子と会合した親和性捕捉デバイスによって、異なった速度で分析対象物分子の気相への転移を促進する。
好ましい実施例においては、分析対象物は、エネルギー源により刺激の後に上記混合物から選択的に脱着される。別の好ましい実施例においては、その配列が複数の異なった分析対象物を選択的に吸収する。
より好ましい実施例においては、本発明による装置は分析対象物の定量に用いられ、この定量においては、親和性捕捉デバイスの位置と量が吸収された分析対象物の量を判定する。別の好ましい実施例においては、結合は選択的であっても、あるいは非選択的であってもよい。
別の実施例で、完全な分析対象物の気相への脱着を促進するサンプルプローブは、サンプル提示表面と、そして、エネルギー吸収分子と親和性捕捉デバイスの両方の機能を果たすことができる表面会合分子か、あるいは、少なくとも２つの結合分の１を有する光感作性付着分子であって、少なくとも１つの部位がサンプル提示表面と結合しており、そして少なくとも１つの部位が分析対象物を結合させるために利用でき、そしてその分析対象物結合部位が光感作性であることを特徴としている。
本発明の異なった実施例は、質量分析測定における分析対象物分子の質量を測定する方法を含んでおり、この方法は、光感作性付着分子（PAM）によってプローブ端面上のサンプル提示表面を誘導するステップで構成されており、該PAMは少なくとも２つの結合部位を有しており、１つの結合部位はサンプル提示表面と結合し、少なくとも１つの結合部位は分析対象物分子との結合のために利用することができ、さらに、この方法は該誘導されたプローブ端面を該分析対象物分子の供給源の露出させて該分析対象物分子をそこに結合させるステップと、そこに結合した分析対象物分子によってその誘導されたプローブ端を飛行時間質量分析計の一端に入れて、真空にし、そして電場を発生してその分析計内部に加速電位を発生するステップと、１つ、あるいは複数のレーザーパルスで分析計内部の該誘導されたプローブ端面に結合した分析対象物分子の少なくとも１部に刺激を与えて該分析対象物分子のイオンを該プローブ端から脱着するステップと、該質量分析計内部でのそれ

ぞれの飛行時によってそのイオンの質量を検出するステップと、そして、その検出された質量を表示するステップとで構成される。好ましい実施例においては、PAMと会合させた該プローブ端面に脱着／イオン化支援基質物質を適用するステップも含まれる。より好ましい実施例においては、さらに、該プローブ端を該質量分析計から取り出し、脱着されなかった該分析対象物分子の該部分に化学的、生物学的、あるいは物理的な手順を適用して、脱着されなかった該分析対象物分子の該部分の組成を変えるステップと、該編成された分析対象物分子を載せた該プローブ端を再度挿入するステップと、後で質量分析測定分析を行って該編成された分析対象物分子の分子量を判定するステップとが含まれる。好ましい実施例はまた、該プローブ端の該面に化学的に結合したPAMも含んでおり、PAMは該分析対象物分子と化学的に結合しており、PAMと分析対象物分子との間の該結合は光に依存して破壊され、分析対象物分子が放出され、あるいは、該分析対象物分子は生体高分子であり、該PAMは分化されていない生物学的サンプルから該生体高分子を選択的に分離するのに適応されている。別の好ましい実施例では、該基質物質は弱酸性から強酸性のpH値を有している。さらに好ましい実施例では、該基質物質は6.0以上のpH値を有している。好ましい実施例はまた、電気的絶縁物質で形成された該プローブ端の面を含んでいる。

さらに別の実施例ではレーザー脱着／イオン化、飛行時間質量分析測定による分析対象物分子の質量を測定する方法が提示され、この方法において、光感作性付着分子（PAM）がその分析対象物分子の脱着およびイオン化を促進するために該分析対象物分子と組み合わせて用いられており、その改良点は、分析対象物分子をPAMの表面上、あるいはその上方に提示するステップで構成され、該質量分析測定・分析で脱着されなかった分析対象物分子の少なくとも１部は、後で行われる分析手順のために化学的に利用することができる。

本発明の別の実施例は完全な分析対象物の気相への差別的脱着を促進するためのサンプルプローブであり、サンプル提示表面と、そして少なくとも２つの、該サンプル提示表面と会合した光感作性付着分子で構成されており、該サンプルプローブはエネルギー源により刺激を与えられ、該サンプルプローブは該分析対象物分子と会合した光感作性付着分子に依存した異なった速度で分析対象物分子の気相への転移を促進する。好ましい実施例においては、この光感作性付着分子は所定の配列に並べられている。より好ましい実施例においては、これらの配列は複数の異なった分析対象物を選択的に吸収する。

本発明のさらに好ましい実施例においては、完全な分析対象物の気相への転移を促進するサンプルプローブが含まれており、このサンプルプローブはサンプル提示表面と、該サンプル提示表面に会合した光感作性付着分子とで構成されており、サンプルプローブにエネルギー源からの刺激が与えられると、該サンプルプローブは完全な分析対象物分子の気相への転移を促進する。好ましい実施例においては、分析対象物の定量が行なわれ、光感作性付着分子の位置と量とにより、吸着された分析対象物の量の判定が行なわれる。

別の実施例は生体高分子シーケンス決定の方法を示し、この方法は生体高分子分析対象物を、エネルギー吸収分子、親和性捕捉デバイス、光感作性付着分子、およびそれらの組み合わせで構成されるグループから選択される表面選択分子を有するサンプル提示表面を含むプローブ端に結合させるステップと、質量分析測定分析で生体高分子分析対象物を脱着させるステップとを含んでおり、このステップでは該生体高分子の少なくとも一部がプローブ端から脱着されず、さらにこの方法は、まだプローブ端に結合している生体高分子分析対象物を脱着修飾した結果を分析するステップと、そして、生体高分子が得られるまで、その脱着、分析および修飾ステップとを繰り返すステップを含んでいる。好ましい実施例は、蛋白質、RNA,DNAおよび炭水化物で構成されるグループから選択される生体高分子を提示する。

以下の具体例は本発明の具体的な実施例とその材料、方法を示すものであり、本発明を説明するものであって、発明の範囲を限定する意図はない。

本発明の実施例はレーザービームなどの飛行時間質量分析計を用いて、プローブ端の表面から分析対象物を気化させる。このプロセスにおいて、一部の分子はイオン化される。正荷電された分子は短い高電圧場で加速されて、電場のない飛行チューブに入る。この飛行チューブの端部に配置された感度の高い検出装置が、各分子がそれに衝突する度に信号を

出す。当業者なら、他のモードの検出やイオン化を用いることができることが分かるであろう。

実施例１

水溶性、中性化形態のエネルギー吸収分子

基質支援レーザー脱着飛行時間質量分析測定で用いられる先行技術に基づく基質物質は強酸性である。本発見の１つは、完全に水性の溶剤に解かされた中性化エネルギー吸収分子と混合されると、分析対象物が脱着されるということである。pH6.0以上に適切に中性化することによって、この基質物質はプローブ端表面上に配置された分析対象物分子上で実行される後の化学的、あるいは酵素的反応を基本的には受けられるようにする。分析対象物分子の小部分だけが各脱着／質量分析測定で用いられるので、プローブ端上のサンプルはその場所で後で行われる化学的または酵素的修飾のために用いることができる。修飾後、このサンプルは質量分析計測定によって分析される。同じプローブ端上で分析を行うことによって、分子とその構造を含むその特性についてより正確に判定することができる。質量分析測定はＱ－切換ネオジミウムイットリウムアルミニウムガーネット（Md－YAG）パルス化レーザー（355nm,5nsパスル）を用いる修飾VestecモデルVT2000、あるいはMASモデルSELDl Researchリニアー飛行時間質量分析計で行われる。パルス化レーザー照射によって脱着されたイオンは30keVのエネルギーに加速されて、２メートルの電場のない領域（10^{-8}torrに維持されている）内で遊走させられる。20ステージ個別ダイノード電子倍増管を用いて検出されるイオン信号は、200MS/sトランシェントレコーダー（LeCroy TR8828D,8ビットｙ－軸解像度）あるいは高速信号平均化処理を行うことができるTektronixデジタイザ記録される前に高速予備増幅器を用いて10倍に増幅される。最適イオン信号を達成するために、オッシロスコープ（Tektronix）でそのプロセスをモニタリングしながら、レーザー照射はリアルタイムで調節される。データ削減（ピーク中心軸跡および時間の質量／電荷への変換）はパソコンによるソフトウエアによって行われる。335nmでパルス化レーザーを発生する窒素レーザーを用いるAVG TOFSpec質量分析計、あるいは335nmでパルス化レーザーを発生する窒素レーザーを用いるニリアLDI1700質量分析計を用いることもできる。

I.特異分析

1. シナピン酸（Aldrich Chemical Co.,Inc.,Milwaukee,WI）を20mg/ml（pH3.88）水に懸濁して、トリエチルアミン（Pierce,Rockford,IL）を用いてpH6.2～6.5に中性化する。ヒトヒスチジンを多量に含む糖蛋白質金属結合領域（GHHPH）$_2$G（1206Da），（GHHPH）$_5$G（2904Da）およびヒトエストロゲン受容体２量体化領域（D473－L525）（6168.4Da）を、プローブ端上で２μｌのシナピン酸（20mg/ml水,pH6.2）に混合して、レーザー脱着飛行時間質量分析測定によって分析した。５つのスペクトル（１スペクトルあたり平均100レーザーショット）を得た後、プローブを検索して,2μｌの20mM Cu（SO）$_4$を加え、質量分析測定でサンプルを再分析した。図1A（上側の図）は、中性化エネルギー吸収分子の存在下で脱着された３つのペプチド類の質量スペクトルを示している。図1B（下側の図）は、中性エネルギー吸収分子の存在下でのペプチド類の、その場所での金属結合を示している。（GHHPH）$_2$Gペプチドは少なくとも４つのCu（II）を結合させることができ、（GHHPH）$_5$Gペプチドは、少なくとも５つのCu（II）を結合させることができ、２量体化領域は本実験条件の下で少なくとも１つのCu（II）を結合させることができる。pH6.5に中性化されたα－シアノ－４－ヒドロキシ桂皮酸（20mg/ml水）によっても同様の結果が得られる。

2. ヒトβカゼインホスホペプチド（R1－K18＋5P）（2488Da）の１μｌのアリコットをpH6.5に中性化された桂皮酸（20mg/ml水）の１μｌと混合され、レーザー脱着飛行時間質量分析測定によって分析する。５つのスペクトル（１スペクトルあたり平均100レーザーショット）を得た後、プローブを除去し、中性化されたシナピン酸と混合された残っているホスホペプチドを、0.5μｌのアルカリ性ホスホターゼ（Sigma）によってプローブ端上で直接消化し、23℃の温度下で５分間培養した。５つのスペクトル（１スペクトルあたり平均100レーザーショット）を得た後、プローブを取り出し、さらに0.5μｌのアルカリ性

ホスホターゼの別のアリコットを追加して残りのホスホペプチド類のさらに消化させ、23℃の温度で５分間培養した。このサンプルをレーザー脱着質量分析測定で再分析する。図2A（１番上の図）は中性化されたエネルギー吸収分子の存在下で脱着されたホスホペプチドの質量スペクトルを示している。図2B（上から２番目の図）はホスホペプチドからホスフェート基を取り除くためのその場所でのアルカリ性ホスホターゼの５分間の消化を示している。0P,1Pおよび3Pピークは、上記ホスホペプチドからそれぞれ５つ、４つ、そして２つのホスフェート基を取り除いた後の生成物を示している。図2C（上から３番目の図）は、その場所でさらにアルカリ性ホスホターゼでさらに消化を行うと、ホスホペプチドからすべてのホスフェートが完全に除去されることを示している。対照的に、図2D（１番下の図）は、予備的な中性化（例えば、pH3.88で桂皮酸、あるいはpH2.07でジヒドロキシ安息香酸）を行わずにエネルギー吸収分子の存在下でアルカリ性ホスホターゼ（0.5μｌ）の消化が行われた対象の実験では、23℃、10分間では非常に限定的な消化しか行われなかった。

3. （GHHPH）$_5$Gペプチド（2904Da）の１μｌアリコットをpH6.2に中性化されたシナピン酸（20mg/ml水）、２μｌと混合し、レーザー脱着飛行時間質量分析測定によって分析された。５つのスペクトル（１スペクトルあたり平均100レーザーショット）を得た後、中性化されたシナピン酸と混合された残りのペプチド類を１μｌのカルボキシペプチダーゼＰ（Boehringer Mannheim Corp.Indianapolis,IN）でプローブ端上で直接消化し、23℃の温度下で30分間培養した。このサンプルを質量分析測定で分析した。図３は中性化されたエネルギー吸収分子の存在下でカルボキシペプチダーゼＰによるその場所での消化の前（下側の図）および後（上側の図）の複合質量スペクトルを示している。質量の減少は、ペプチドのＣ端末からのGly残基の除去を示している。

これら３つの実施例は水溶液内での中性化エネルギー吸収分子が、大幅なモル過剰で付加された場合でさえ、分析対象物の構造と機能を保持する上でより生化学的に互換性が高い（biocompatible）であることを示している。その存在は、残っている分析対象物上での化学的、あるいは酵素的反応に対して何も干渉しない。

実施例２

非金属プローブ素子（サンプル提示表面）

本発明のプロセスで用いられているプローブ素子（プローブ端、あるいはサンプル提示表面）は、先行技術の手順に関連して述べたように必ずしも金属、あるいは金属被覆したものでなくてもよい。サンプル提示表面は、多孔性あるいは非多孔性物質を含む種々の物質で構成され、多孔性物質はスポンジ状、ポリマー性、高表面積を有しており、分析対象物の吸着および提示に最適である。

ポリプロピレン、あるいはポリスチレン、あるいはポリエチレン、あるいはポリカーボネートを火炎中で溶かして、2mm直径ステンレススチールプローブ素子上に薄膜上に沈着させて、それを完全に覆うようにする。固体ガラス棒あるいは固体ナイロンフィラメント（最大1.5mm径）あるいはポリアクリスアミドを1cm細片に分割し、ステンレススチールプローブサポート内に挿入される。磁性撹拌棒（1.5×8mm、テフロン被覆したもの）をステンレススチールプローブ端サポート内に挿入する。（GHHPH）$_2$Gおよびヒト／エストロゲン受容体２量体領域を含んだペプチド混合物１μｌのアリコットを、２μｌのジヒドロキシ安息香酸（30%メタノール、0.1%トリフルオロ酢酸に溶かしたもの）とこうしたプローブ素子のそれぞれの上で混合して、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析した。図４は、絶縁性、生化学的に互換性のある表面から脱着されることを示している。

これらの表面は化学結合（共有結合あるいは非共有結合）によって誘導されると、親和性吸着剤（親和性捕捉デバイス）、エネルギー吸収分子（結合『基質』分子）あるいは光感作性付着分子を結合させることができる。サンプル提示表面の形状はいろいろで（例えば、サイズ、構造、柔軟性、厚みなど）、実験（アッセイ）のニーズ（所定のサイズのスペースを通じての生きている生物への挿入）に合わせることができる。

実施例３

親和性指向レーザー脱着（表面強化親和性捕捉、SEAC）

この実施例では、（１）１つ、あるいは複数の分析対象物の捕捉（吸着）、（２）これら捕捉された分析対象物の作成（例えば、塩などの汚染物質を除去するための、水や他の緩衝あるいは非緩衝溶液による洗浄、および極性有機溶媒、洗剤－溶剤、希釈酸、希釈塩基あるいは尿素などによる正常サイクルの反復）、そして（３）より重要なことであるが、これら捕捉され、調製された分析対象物を後で行う分析対象物脱着のためにプローブ表面に直接移行させるために設計された既存、および新しい固体相親和性剤の使用について述べる。親和性捕捉デバイスは電気絶縁性素材（多孔性および非多孔性）、柔軟なあるいは固くない素材、光学的に透明な物質（例えば、種々の密度、厚み、色およびいろいろな反射率を有するガラスなど）、および、より反応性の低い素材（例えば、アガロース、デキストラン、セルロース、スターチ、ペプチド、および蛋白質や核酸の断片など）の上で不動態化される。質量分析のためのサンプルの選択的脱着／提示のための好ましいプローブ端、あるいはサンプル面は（１）特定の生体高分子あるいは他の非生物学的親和剤の共有結合による付着に適した合成ポリマー（例えば、架橋デキストランあるいはアガロース、ナイロン、ポリエチレン、ポリスチレン）で被覆したステンレススチール、（２）ガラス、セラミックス、および／または（３）プラスチック（合成ポリマー）などである。これらプローブ表面への親和剤の選択的不動態化に関与する化学構造には、知られているような種類の、共有結合による、または共有結合によらない不動態化のための酸素依存、炭素依存、硫黄依存、および／または窒素依存手段を含んでいる。

I.親和性捕捉デバイスとしての表面不動態化金属イオン

1.　多孔性アガロース・ビーズ（Chelating Sepharose Fast Flow,Pharmacia Biotech Inc.,Piscataway,NJ、配位子密度22～30μモル/mlゲル）あるいは固体シリカゲルビーズ（Chelating TSK－SW,Toyo Soda,日本、配位子密度15～20μモル/mlゲル）のいずれかに対し共有結合で結合したイミノジアセテート（IDA）基によって、Cu（II）をキレート化する。ニューロテンシン（1655Da）、スペルム活性化ペプチド（933Da）、およびアンギオテンシンＩ（1296.5Da）を含んだ合成ペプチドの混合物を、pH7.0のTSK－SW IDA－Cu（II）（20mMリン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム）50μｌを用いて、23℃の温度下で10分間、混合した。このゲルを遠心分離によって残っているペプチド溶液から分離し、次に、200μｌリン酸ナトリウム、塩化ナトリウム緩衝液、pH7.0で３度洗浄して、非特異的に結合したペプチド類を取り除く。最後に、このゲルを50μｌの水に懸濁させる。２μｌのゲル懸濁液と非吸収ペプチド溶液のアリコットをステンレススチールプローブ端上で１μｌのシナピン酸（メタノールに溶解したもの）と混合させて、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。プローブ端のいろいろの場所で５つのスペクトルを得た後（１スペクトルあたり平均100レーザーショット）、メタノールでシナピン酸を取り除く。２μｌの20mM $CuSO_4$のアリコットを付加し、その後、１μｌのシナピン酸と混合して、レーザー脱着飛行時間質量分析測定によって再分析する。プローブ端のいろいろの場所で別の５つのスペクトルを得た後（１スペクトルあたり平均100レーザーショット）、メタノールで除去する。IDA－Cu（II）ゲルビーズに吸着された残りのペプチドを、pH8.0の0.1M重炭酸ナトリウム内で、トリプシン（シグマ）１μｌで、モイスト・チェンバー内で23℃の温度下で10分間消化させる。このゲル・ビーズを水で洗浄して酵素と塩を除去した後、１μｌのシナピン酸を加えて、そのサンプルをレーザー脱着飛行時間質量分析測定で再分析する。図5Aは、IDA－Cu（II）によって吸収されなかった残りのペプチド溶液内のスペルム活性化因子（933Da）およびニューロテンシン（1655Da）の分子イオン（および多重Na－アダクト）を示している。アンギオテンシンＩ（1296.5Da）に対応する有意のピークは存在しない。図5Bの質量スペクトルはIDA－Cu（II）ゲルにかなり選択的に吸収されたアンギオテンシンＩ＋Na－アダクトピークを示している。IDA－Cu（II）ゲルをさらに500μｌの水で２度洗浄した場合に得られる質量スペクトルは、ペアレントアンギオテンシンだけを示し、他のアダクトピーク（図５および６図Ｃ）は示されなかった。図6Dは、アンギオテンシンペプチドによるその場所での銅結合を示している。図6Eは、その配列のシングルArg2位置でのアンギオテンシンのその場所でのトリプシン消化を示す。

この実施例は、ａ）表面が不動態化された金属イオン上に親和性吸着された分析対象物レ

ーザー脱着が良好に行われること、ｂ）一度結合すると、分析対象物の非常に明確な質量スペクトルを得ることができるようにサンプル内の含むすべての汚染化合物を除去するために、種々の溶剤で洗浄することができ、ｃ）この親和性捕捉デバイスが明確に定義された分析対象物だけを選択すること（本例では、IDA－Cu（II）によってペプチド混合物からアンギオテンシンが選択的に吸収される。このペプチドは自由なＮ－端末と２つのヒスチジンアミノ酸残基をその配列に有しており、両方の性質とも強力なCu（II）－結合にとって必要であるのに対して、スペルム活性化因子とニューロテンシンの両方ともＮ－端末は塞がれており、その配列内にヒスチジンアミノ酸残基を有していない）、ｄ）吸着された分析対象物上で、その場所での化学的、あるいは酵素による配列修飾を通じて構造および機能回析を行うことができ、しかも反応、洗浄の各ステップでサンプルのロスが非常に少ないこと、そしてｅ）表面が結合した基質（例えば、アンギオテンシンＩ）を有するプローブ素子を用いて、その場所で（例えば、人体の胃腸内部で）特殊な酵素活性（例えば、トリプシン）をモニターすることができる、ことを示している。

2.　ウマ心臓のミオグロビン（325pモル、16,952Da）の溶液を、pH7.0（20mMリン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム）でTSK－SW IDA－Cu（II）の50μｌと23℃の温度下で10分間混合する。このゲルを遠心分離で溶液から分離し、500μｌの緩衝液で２回、さらに、500μｌの水で２回洗浄する。これらすべての溶液中に残っているミオグロビンを分光光度計で測定することにより、ゲルに吸収された量を計算することができる。このゲルを50μｌの水に懸濁させて、その後、水で希釈する。希釈されたゲル50μｌのアリコットを（30％メタノール、0.1％トリフルオロ酢酸）と混合し、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。図７はミオグロビンの検出可能な信号（平均50レーザーショットを与えた後の信号／ノイズ比＝６）が得られ、プローブ端上に沈着したミオグロビンの量が４～8fモルと計算されることを示している。

この実施例は、表面上に親和性吸着された分析対象物が一層簡単に転移され、容器や転移装置の表面への非特異的な吸着によるロスがないことを示している。吸着された分析対象物を、レーザー脱着／イオン化、飛行時間質量分析測定によって効率的に検出するために必要な明確に定義された表面密度あるいは局所的濃度で、低（アット乃至フェムトモル）量でサンプル提示表面の予め決められた領域（レーザースポットサイズより小さい）上で配列決定される。

3.　ヒトβカゼインペプチド（E2－K18）をApplied Biosystem社のモデル430Aペプチドシンセサイザー上で、NMP－HOBtプロトコルを用いて合成する。ホスホリル化されるべきSer残基を側鎖保護基のないペプチド鎖に結合させる。保護されないSerを、先ず、di－ｔ－ブチル－N,N,－ジイソプロピル－ホスホルアミダイトを用いてホスホル化する。次に、このリン酸エステルをｔ－ブチルペロキサイドで酸化し、水洗し、レシンから分割する。95％トリフルオロ酢酸ですべての側鎖保護基を除去する。未精製ホスホペプチドをメチルｔ－ブチルエーテルで抽出して、乾燥する。この合成ホスホペプチドの未精製調製物を50mM MES、pH6.5の0.15M塩化ナトリウムに溶解し、多孔性セファロース（Yip,T－TおよびHutchens,T.W.,Proteins Expression and Purification 2:355－362（1991）に従って合成されたもの）上で不動態化されたトリス（カルボキシメチル）－エチレンジアミン（TED）－Fe（III）50μｌ、配位子密度65μモル/ml、と23℃の温度下で15分間混合する。このゲルを同じ緩衝液で３回洗浄し、その後、500μｌの水で１回洗浄した。ゲル１μｌのアリコットをプローブ端上で１μｌのシナピン酸（30％メタノール、0.1％トリフルオロ酢酸）と混合して、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。プローブ端のいろいろなスポトで５つのスペクト（１スペクトルあたり平均100レーザーショット）を得た後、メタノールでシナピン酸を取り除き、TED－Fe（III）上に吸着された残りのホスホペプチドを50mM HEPES pH7.0内で、モイストチェンバー内で23℃の温度下で10分間、１μｌのアルカリ性ホスファターゼ（硫化アルミニウム懸濁液、Sigma）を用いて、プローブ端上で直接消化する。このゲルを水で洗浄して酵素および塩を除去する。シナピン酸を加えて、サンプルをレーザー脱着質量分析測定で分析する。図８（１番上の図）はいろいろなホスホリレート化形態を有するカセインペプチド（1934Da）の分布を示す。その場所でのア

ルカリ性ホスファターゼ消化を行った後、最初の非ホスホリレート化された形態だけが残っている（下側の図）。
この実施例は、予め清浄化せずに、未精製の混合物内でのホスホペプチド合成のクイックモニターとしてのSEACの応用の可能性を示している。その場所でのアルカリホスファターゼ消化によって、ホスホペプチドの確認を簡単に確認することができる。
4. プレタームインファント調製液（preterm infant formula）（SIMILAC,Meade Johnson）100μｌのアリコットとこの調製液を与えた後、90分間呼吸させたプレタームインファントの消化内容物を、0.1M MES,0.15M塩化ナトリウム内で50μｌのTED－Fe（III）セファロース50μｌと混合する。このゲルを500μｌの同じ緩衝液で３回洗浄し、その後、500μｌの水で１回洗浄する。１μｌのゲル懸濁液、プレタームインファント調製液、あるいは胃吸引物（gastric aspirate）をプローブ端上で２μｌのシナピン酸（50%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸に溶解したもの）と混合して、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。図９は、胃吸引物全体の質量スペクトル（上から２番目の図）がインファント調製液（１番下の図）とまったくよく似ており、1,000～15,000Da領域の分子量を持っていることを示している。しかしながら、これら２つのサンプルからTED－Fe（III）によって選択的に吸着された分析対象物の質量スペクトルはまったく違ったものであり、調製液（下から２番目の図）より胃吸引物（１番上の図）の方により多く低分子量ホスホペプチド（TED－Fe（III）により結合したもの）が存在しているが、これは調製液内に存在するホスフォプロテインが胃吸引物を消化するからである。この実例は、SEACが生物学的なサンプル内部の特定の分析対象物の分析に特に有用であることを示している。複合サンプル内に他の汚染物質が存在している場合、ホスフォペプチド類を検出するのはより困難であるが、これはそれらが正イオンモード内でイオン化される程度が低いからである。しかしながら、ホスフォペプチドが選択的に吸着され、サンプル中の他のすべての成分が取り除かれると、そうした信号抑制は観察されない。
5. ヒトおよび仔ウシのヒスチジンを多量に含んだ糖蛋白質200μｌのアリコットをpH7.0でIDA－Cu（II）セファロース（Pharmacia）（20mMリン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム）50μｌと23℃の温度下で10分間混合した。このゲルを500μｌの緩衝液で２回洗浄し、さらに500μｌの水で１回洗浄する。ゲル１μｌのアリコットを２μｌのシナピン酸（30%メタノール、0.1%トリフルオロ酢酸に溶解したもの）と混合し、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。プローブ端上のいろいろな場所で５つのスペクトルを得た後（１スペクトルあたり平均100レーザーショット）、メタノール酸で洗浄して、シナピン酸を取り除く。IDA－Cu（II）ゲル上に吸着された残りの糖蛋白質を20mMリン酸ナトリウム、0.5M塩酸ナトリウム、3M尿素内で,pH7.0、37℃の温度下で、モイスト・チェンバー内で１夜消化する。水で洗浄して酵素と塩を取り除いた後、２μｌのシナピン酸を加えて、サンプルを質量分析測定で分析する。５つのスペクトル（１スペクトルあたり平均100レーザーショット）を得た後、シナピン酸をメタノールで取り除いた。0.1M重炭酸ナトリウム内に２μｌのトリプシンを溶解したアリコットを加えて、モイストチェンバー内で37℃の温度下、30分間培養した。水洗して酵素と塩を取り除いた後、シナピン酸を加えて、質量分析測定でサンプルを分析した。プローブ端のいろいろな場所で５つのスペクトル（１スペクトルあたり平均100レーザーショット）を得た後、メタノールでシナピン酸を除去する。20mM $CuSO_4$2μｌのアリコットを加える。その後、２μｌのシナピン酸を加え、その後、質量分析測定で分析した。プローブ端のいろいろな場所で５つのスペクトル（１スペクトルあたり平均100レーザーショット）を得た後、メタノールでシナピン酸を取り除く。5mM HEPES,pH6.5に溶解した２μｌのジエシルピロカルボネート（Sigma）のアリコットを加え、23℃の温度下、30分間培養した。水洗して化学物質と緩衝塩類を除去した後、２μｌのシナピン酸を加えて、サンプルを質量分析測定で分析する。ジエチルピロカルボネートでヒスチジン残基を修飾する代わりに、金属結合ペプチドの部分配列を得るためには、表面上に吸着されたトリプティックダイジェスト（tryptic digest）に1ulのカルボキシペプチターゼＹ（Boehringer Mannheim）を加えて、モイストチェンバー内で室温で５分間培養する。水で酵素と塩を洗い流した後、1ulのシナピン酸を加えて、質量分析測

定で分析する。図10AはＮ－グリカナーゼ消化の前と後のIDA－Cu（II）セファロース上に吸着されたヒトおよび仔ウシのヒスチジンを多量に含む糖蛋白質の複合質量スペクトルを示している。質量変移はそれぞれの糖蛋白質から炭水化物が除去されることを示している。図10Bは２つの種の脱グリコシレート化された蛋白質からのトリプシンで消化されたペプチド類の複合質量スペクトル（上の図はヒト蛋白質、下から図は仔ウシ蛋白質）と、これら２つの種のトリプシン消化ペプチドのその場所でのCu（II）結合（上から２番目の図はヒト蛋白質、１番下の図は仔ウシ蛋白質:1,2の数字は結合した銅の数を示す）を示している。図10Cは、そうした１つのCu（II）結合ペプチド（１番下の図）が少なくとも４つのHis残基を有しており、それらがジエチルピロカルボネートで修飾された、4N－カルベトキシ－ヒスチジルアダクト（１～４、１番上の図）を形成していることを示している。図10Dは仔ウシのヒスチジンを多量に含む糖蛋白質内の主要Cu結合ペプチドの部分的Ｃ－端末配列を示している。この列は、異なった種からの金属結合領域の構造と機能を解明するためにSEACの使用が有効であることを示している。

II.親和性捕捉デバイスなどの表面不動態化抗体

1.　ポリクローナルウサギ抗－ヒトラクトフェリン抗体はBethyl Laboratories（Montgomery,TX）によって精製されたヒトラクトフェリンによってつくりだされるものである。この抗体は、チオフィリック吸着および不動態化ラクトフェリンカラムによって親和性純化さる。磁性ビーズに共有結合で付着されたヒツジ抗ウサギIgGを、Norway,Oslo,Dynal ASから入手した（均一2.8μｍ超磁性体ポリスチレンビーズ、1mgビーズあたり配位子密度10μｇヒツジIgG）。ヒトラクトフェリン（1nモル、^{59}Feでラベル、81,100Da）を20mMリン酸ナトリム、0.15M塩化ナトリウム、pH7.0で、37℃の温度下、30分間、ウサギ抗－ヒトラクトフェリンで培養する。その後、ダイナビーズ（６－７×10^{8}ビーズ/ml）に載せた40μｌのヒツジ抗ウサギIgGを加えて、37℃の温度で30分間培養する。このビーズを500μｌのリン酸ナトリウム緩衝液で３回洗浄し、さらに500μｌの水で２回洗浄する。この複合体に結合したヒトラクトフェリンの最終的な量は4pモルと判定されるビーズのほぼ10分の１がテフロンで被覆した磁性プローブ端に転移され、２μｌのシナピン酸（30％メタノール、0.1％トリフルオロ酢酸に溶解したもの）と混合され、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析される。図11は抗原－１次抗体－２次抗体複合体（上側の図）内にラクトフェリン（81,143Da）が存在していることを示しており、一方、この１次抗体－２次抗体コントロール（下側の図）はウサギ抗体信号（単独荷電で149,000Da、２重荷電で74,500Da）のみを示している。

この実施例はａ）表面不動態化抗体上に親和性吸着された分析対象物でレーザー脱着が良好に脱着されること（１次抗体－分析対象物複合体の混合物内で分析対象物信号が不明瞭にしか確認されない場合は、本方法においては、分析対象物を確認するために、表面を不動態化した２次抗体、蛋白質Ａ、蛋白質Ｇ、ストレプタビジンなどの、１次抗体のいずれかの捕捉デバイスが用いられる）;b）分析対象物の１つがその捕捉の主要対象物との会合を通じて検出される特異性蛋白質識別現象を通じての蛋白質発見の原理；そしてｃ）効率的な捕捉デバイスとしての磁性表面の使用を示している。

2.　親和性純化されたウサギ抗－ヒトラクトフェリンをグルタルアルデヒドを介して活性化されたナイロンプローブ素子（2mm径）の先端に共有結合を利用して結合させる。これを350fモルのヒト・ラクトフェリンを含む1mlのプレタームインファントウリン（胎仔の尿）,pH7.0に浸して、４～８℃の温度下で15時間撹拌する。ナイロンプローブ端を取り出して、1mlの20mMリン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム、3Mの尿素,pH7.0で３回洗浄し、さらに1mlの水で２回洗浄する。シナピン酸２μｌのアリコット（30％メタノール、0.1％トリフルオロ酢酸）を加えて、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。図12はヒトラクトフェリン分子イオン（信号・ノイズ比＝2.5、平均25レーザーショット）を質量スペクトルで示したものである。図13は1nモル/mlのラクトフェリンを含んでいるプレタームインファントウリン全体の等価質量スペクトルを示すもので、尿サンプル内に他の成分が存在している場合に引き起こされる信号抑制が非常に大きいので、図12に関して述べたように350fモル/mlのラクトフェリンに数千倍の比率で付加しても、検出されない程

である。
この実施例は、柔軟なプローブ素子の平たい表面（２次元構成）上でのSEACデバイスの使用を示している。このSEACデバイスは血液、涙、尿、唾液、胃腸液、脊椎液、羊水、骨髄液、バクテリア、ウイルス、培養中の細胞、生体標本組織、植物の組織あるいは液体、昆虫の組織や液体などの未分化の生物学的なサンプルから目的の分析対象物を分離するのに用いることができる。この特異性のある親和性吸着ステップは複雑なサンプル内での他の成分による汚染から分析対象物を隔離することを可能にし、特に、分析対象物の濃度が非常に低い場合（フェムトモル/ml）に信号抑制効果を克服する。
3. SEACを用いた技術による検出感度のさらなる改善を分析対象物に結合した標識物質の増幅によって達成される。これを行う１つの方法は、酵素触媒とストレプタビジン－ビオチンシステムとの組み合わせによって行うことができる。実施例3.II.2.で述べたナイロンプローブ素子上で微量のラクトフェリンを捕捉した後、ビオチニル化した抗ラクトフェリン抗体、あるいはビオチニル化した単一鎖DNAを用いて、ラクトフェリンに特異的に結合させる。次にストレプタビジンを加えて、ビオチニル化した標識物質に特異的に結合させる。最後にビオチニル化したアルカリ性ホスファターゼを加えて、ストレプタビジンに特異的に結合させる。こうしたビオチニル化したアルカリ性ホスファターゼのいくつかが１つのストレプタビジンに結合することができるので、１次レベルでの増幅が行われる。第２のレベルの増幅は酵素触媒によってもたらされ、この場合酵素は１分あたり10^2から10^3分$^{-1}$のターンオーバー数を達成することができる。アルカリ性ホスファターゼ酵素活性のアッセイは、ATP,NADPH、あるいはホスフォペプチドなどの低分子量ホスフォリル化基質を用いることによって、簡単に行うことができる。低分子量分析対象物の重量変移を検出する効率は、80kDa糖蛋白質の場合よりずっと高い。
4. 現段階での検出における最大の改善は、プロメラーゼ鎖反応原理に基づく増幅によって達成される。実施例3.II.2.で述べたようにナイロンプローブ素子上に微量のラクトフェリンを捕捉した後、ビオチニル化した抗ラクトフェリン抗体あるいはビオチニル化した単一鎖DNAを用いてラクトフェリンに特異的に結合させる。次に、ストレプタビジンを付加してビオチニル化した標識物質に特異的に結合させる。最後に一片のビオチニル化した線状DNAを付加して、ステプタビジンに特異的に結合させる。この結合DNA標識物質が30サイクルポリメラーゼ鎖反応手順で増幅される。各サイクルは94℃での１分間の変性ステップと、１分間の、72℃での１次拡張反応とによって構成されている。この手順は10^6程度の範囲の増幅倍率をもたらす。この増幅されたDNAを、３－OHピコリン酸を基質として用いて、レーザー脱着質量分析測定で直接検出する。
5. ポリクローナルウサギ抗－仔ウシヒスチジン含有抗体を、Bethyl Laboratories（Montgomery,TX）による精製仔ウシヒスチジン含有糖蛋白質に対して作成する。この抗体をチオフェン吸着および不動態化された仔ウシヒスチジン含有糖蛋白質カラムで親和性純化する。この精製された抗体をメーカーの指示に従ってAffiGel 10（BioRad Laboratories,Hercules,CA、配位子密度15μモル/mlゲル）上で不動態化する。仔ウシの初乳200μｌのアリコットを20mMリン酸ナトリウム、pH7.0、200μｌで希釈して、50μｌの不動態化抗体に入れ、23℃の温度で30分間撹拌する。このゲルを500μｌの20mMリン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム、3Mの尿素、pH7.0で３回洗浄し、次に500μｌの水で二回洗浄する。洗浄されたゲル１μｌのアリコットを２μｌのシナピン酸（30%メタノール、0.1%トリフルオロ酢酸に溶解したもの）とプローブ端上で混合して、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。図14は、精製された仔ウシのヒスチジンを多量に含む糖蛋白質の質量スペクトル（下側の図）と、仔ウシ初乳から得た蛋白質の親和性（下側の図）を示している。この結果は、完全な、ヒスチジンを多量に含む糖蛋白質と、仔ウシ初乳内の主要な原始的断片の存在を示している。
この実施例は、少量の生物液内での新しい蛋白質の検出および特徴付けにおける手軽で単純な手法としてSEACを用いた場合の有効性を示している。この結果はポリアクリルアミドゲル電気泳動の非常に手間のかかる免疫ブロッティングで得られるた初期の知見を裏づけるものである。

6. SEAC手法を用いることによって、抗体の完全なマッピングを簡単に行うことができる。抗ヒト・卵胞刺激ホルモンの３つの供給源（Chemicon International,Temecula,Caからのベータ FSHに対して特異性を発揮するポリクローナル、Serotec,Indianapolis,INからのベータ３エピトープに特異性を示すモノクローナル、Biodesign,Kennebunk,MEからのモノクローナル）をメーターの指示に従ってAffiGel 10上で不動態化した。これらの不動態化した抗体のすべてについて、卵巣刺激ホルモンの２つの異なった製剤（Chemicon社からの半精製製剤、およびAccurate Chemical and Scientific Corp.からの粗精製製剤）で培養することによって、卵巣刺激ホルモンと特異的に結合するかどうかをテストし、その後、シナピン酸の存在下で質量分析測定によって分析する。次に、ヒトFSH（Chemicon）の半精製製剤をトリプシンで消化して、個別のアリコット（7ul）をホスフェート緩衝食塩水中で、これらの不動態化された抗体（10ul 1:1ゲル懸濁液）と、４℃の温度下で、２時間反応させる。

リン酸緩衝食塩水および水で洗浄した後、吸着された蛋白質を、シナピン酸の存在下でレーザー脱着質量分析測定で分析する。図15は異なった抗体によって認識された卵巣刺激ホルモンのペプチドの複合質量スペクトルを示す。これら２つのモノクローナル抗体は異なったエピトープを明瞭に識別するのに対して、ポリクローナルは両方のモノクローナルによって識別されたものに共通のエピトープだけを識別する。

III.親和性捕捉デバイスとしての表面不動態化核酸

1. ４％アガロースビーズ上で不動態化された単一鎖DNAをGIBCCBRL（Gaithersburg,MD配位子密度0.5～1.0mg DNA/mlゲル）から入手する。^{125}I－ヒトラクトフェリン（49nモルに相当）のアリコットを100μｌの不動態化単一鎖DNAと20mM HEPES,pH7.0内で、室温下、10分間混合する。このゲルを500μｌのHEPES緩衝液で五回洗浄し、その後等量の水に懸濁させる。ビーズ１個あたりに結合するラクトフェリンの量は、放射活性の判定、および単位体積あたりのビーズの数を数えることによって62fモルと推定される。0.5mm直径のプローブ端上にいろいろの数のビーズ（１～12）を置いて、0.2μｌのシナピン酸（30％メタノール、0.1％トリフルオロ酢酸に溶解したもの）と混合し、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。図16は、単一鎖DNAアガロースのひとつのビーズに親和性吸着されたラクトフェリンの質量スペクトルを示している。これは、そのひとつのビーズから得られた全部で５つのスペクトル（１スペクトルあたり平均100レーザーショット）の代表的なスペクトルである。

この実施例は、表面を不動態化された核酸などの生体高分子に親和性吸着された分析対象物上で、レーザー脱着が良好に行われることを示している。ヒトラクトフェリンとDNAとの間の相互作用の特異性は、すでに文献で紹介され、微量のラクトフェリンをプレタームインファントウリン（preterm infant urine）から捕捉する目的で広く用いられている。このケースでは、ラクトフェリン親和性捕捉デバイスを伝達する効率と、レーザー脱着の感度をうまく組み合わせることによって、質量分析測定の検出感度が大幅に向上することを示している。

2. 30pモルの^{59}Fe－ヒトラクトフェリンを含んでいる出産前胎仔の尿の1mlのアリコットを0.1M HEPES、pH7.4中で、20μｌの単一鎖DANアガロースと23℃の温度下、15分間混合した。このゲルを500μｌのHEPES緩衝液で２回洗浄し、その後、500μｌの水で２回洗浄する。このゲルを等量の水に懸濁させ、この懸濁液１μｌ（放射活性で判定して吸着ラクトフェリンは350fモル以上含んでいない）を１μｌのシナピン酸（30％メタノール,0.1％トリフルオロ酢酸に溶解したもの）とプローブ端上で混合して、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。図17は、親和性捕捉デバイスとしての表面不動態化DNAで尿から抽出したラクトフェリンの質量スペクトルを示している。

この例は、DNA捕捉デバイスでの、生物液内の微量の高分子量分析対象物の検出における効率と感度を示している。

IV.親和性捕捉デバイスとしての表面不動態化したいろいろの生体高分子

1. 大豆トリプシン抑制因子（Sigma）をAffiGel 10（BioRad）上でメーカーの指示にしたがって不動態化させる。100μｌのヒト十二指腸吸引物アリコットを50μｌのpH7.0の表

面不動態化大豆トリプシン抑制因子（20mMリン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム）50μｌと23℃の温度下で15分間混合する。次にこのゲルを500μｌのリン酸緩衝液で３回洗浄し、さらに500μｌの水で２回洗浄する。ゲル懸濁液あるいは最初の十二指腸吸引物１μｌのアリコットを２μｌのシナピン酸（50％アセトニトリル、0.1％トリフルオロ酢酸に溶解したもの）と混合し、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。図18Aは総十二指腸吸引物の複合質量スペクトル（下側の図）と表面不動態化大豆トリプシン抑制因子に吸着された蛋白質の質量スペクトル（下側）とを示している。親和性捕捉されたサンプルの主要なピークはトリプシンを示している。同様の結果はａ）グルタルアルデヒドを介して大豆トリプシン抑制因子に結合されたナイロンプローブ素子の先端か、ｂ）グルタルアルデヒドかジビニルスルフォンを介して大豆トリプシン抑制因子に結合したポリアクリルアミドによって被覆されたアクリルプローブの先端に置かれたわずか１μｌの十二指腸液でも得ることができる（図18B）。

これらの結果は、ａ）生物液内での特定の分析対象物の検出および特徴付けにおける非不明瞭性と,b）その場所での、診断の目的で柔軟性のある（例えばナイロン）プローブ素子をエンドスコープを通じて直線人体に挿入することができること、を示している。

2．ダイナビーズ（均一で、2.8μｍ、超磁性、ポリスチレンビーズ）をDynal,AS,Oslo,Norwayから入手する。150μｌのヒト血漿あるいは18pモルのビオチニル化インシュリン（Sigma）を含む尿のアリコットをpH7.0のストレプタビジンダイナビーズの20μｌ懸濁液（20mMリン酸ナトリウム,0.5M塩化ナトリウム）と、23℃の温度下で10分間混合した。このビーズを3M尿を含む500μｌの緩衝液で３回洗浄した後、500μｌの水で１回洗浄する。ビーズ懸濁液0.5μｌのアリコットを２μｌのシナピン酸（30％メタノール、0.1％トリフルオロ酢酸と混合し、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。図19Aは尿から親和性吸着されたビオチニル化インシュリンの質量スペクトルを示している。複数のピークはひとつから３つのビオチン基で惹起されたインシュリンを示している。図19Bは血漿から親和性吸着されたビオチニル化されたインシリンの質量スペクトルを示している。

この実施例は、ビオチン－ストレプタビジン結合を介して親和性吸着された分析対象物上でレーザー脱着が行われることを示している。ビオチンとアビジン（$Ka=10^{15}M^{-1}$との強固な結合から、このシステムは、その場所で化学あるいは酵素による修飾が行われるプローブ表面上での蛋白質および核酸に対する理想的なSEACデバイスとして機能する。

3．ヒト／エストロゲン受容体DNA－結合領域（84残基）をバクテリア内で表現する。プラスミド表現ベクターpT^{7} ERDBD（J.Schwabe,MRC Laboratory of Molecular Biology,Cambridge,UK）を大腸菌BL21（DE3）plyS細胞（Novagene）に移行させる。DNA結合領域の表現は1mMイソプロピルチオガラクトシド（GIBCOBRL）で誘発され、３時間の誘発後、バクテリアを収穫した。誘発されたバクテリア全体を基質支援レーザー脱着／イオン化質量分析測定で分析して、DNA－結合領域が合成される主要なペプチドであることを確認した。ペプチドをバクテリア性リゼートから逆相HPLCで純化し、AffiGel 10（BioRad）上で不動態化する。エストロゲン反応要素を含む30－bpDNA配列をGenosys（Houston,TX）で合成する。表面親和性吸着したapo－,Zn－およびCu－結合形態のDNA－結合領域と配列特異性核酸（エストロゲン反応要素）との相互作用に関して、３－ヒドロキシピコリン酸を基質として用いることによって調査する。

この実施例は、蛋白質表面の機能性領域がSEACにおいて捕捉デバイスとして利用できることを示している。各蛋白質表面領域の構造と機能上の金属結合の影響を調べることができる。

4．表面（例えば、Con A－セファロース、小麦胚レクチン－セファロース、Pharmacia）上で不動態化されたレクチンの異なったアリコットを用いてヒトのグリコペプチドおよび仔ウシのヒスチジンを多量に含んだ糖蛋白質トリプティックダイジェストを結合させた。緩衝液と水で洗浄して未結合のペプチド類を取り除いた後、FUCcase I,MA Nase I,HEXase I,NANase IIIおよびPKGase（Glyko,Inc,Novato,CA）を用いてその場所で配列酵素消化を行った。このサンプルをレーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析して、これら２つの蛋白質内の糖蛋白質の炭水化物組成について調べる。この実施例は、糖蛋白質を連結するた

めのSEACの利用、そしてその場所で配列決定できる炭水化物成分を示している。

V.親和性捕捉デバイスとしての表面不動態化染料

シバクロンブルー3GA－agarose（タイプ3000、４％ビーズ化アガロース、配位子密度２～５μモル/mlゲル）をSigmaから入手する。ヒト血漿の200μｌのアリコットを50μｌの表面不動態化シバクロンブルー、pH7.0（20mMリン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム）と、23℃の温度下、10分間混合した。このゲルを500μｌの緩衝液で３回洗浄し、500μｌの水で２回洗浄する。１μｌのゲル懸濁液のアリコットを２μｌのシナピン酸（50%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸に溶解したもの）と混合し、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。図20は表面不動態化シバクロンブルーによる血清サンプルからのヒト血漿アルブミン（２重電荷イオン［M＋2H］$^{2+}$,32,000m/z、単一電荷イオン［M＋H］$^{+}$,64,000m/z、２量体イオン、２［M＋H］$^{+}$,128,000m/z）の選択的脱着を示している。テストされた他の不動態化染料としては、リアクティブレッド120－アガロース、リアクティブブルーアガロース、リアクティブグリーンアガロース、リアクティブイェロウ・アガロース（すべてSigma社製）などで、それぞれヒト血漿からの異なった血漿を選択する。

実施例４

表面強化ニート脱着（SEND）

この実施例は分析対象物の脱着およびイオン化の方法を示し、この方法においては分析対象物は基質結晶構造中に分散しているのではなく、エネルギー吸収分子の付着表面内部、あるいはその上、あるいはその上方の、いろいろな化学的、物理的、および生物学的修飾や認識反応への反応を示す位置に存在する。表面は適切な密度の（共有結合により、あるいはそれによらないで）、エネルギー吸収の単層あるいは複数の層を用いていろいろな質量の分析対象物分子の脱着を速やかに行わせるように、いろいろな形状で結合しているエネルギー吸収分子により誘導される。

以下の実施例（グループＩ～IV）は、SENDとSEACとの組み合わせを示しており、これらの実施例においては、脱着（結合された）エネルギー吸収分子は分析対象物分子の捕捉を促進するための親和性吸着剤としての役割も果たしている。

I.表面への共有結合によって結合したエネルギー吸収分子

1.　桂皮酸アミド（Aldrich）（先行技術ではレーザー波長355nmで基質としての役割は果たさない）をプロパノール:0.5M炭酸ナトリウム（3:1）に溶解して、ジビニルスルホン（Fluka,Ronkonkoma,NY）活性化セファローズ（Pharmacia）と23℃の温度下で２時間混合した。過剰のエネルギー吸収分子はイソプロパノールで洗浄除去する。この分子構造を図21に示す。結合、あるいは遊離分子２μｌのアリコットをプローブ端上に置いて、0.1%トリフルオロ酢酸に溶かしたヒトエストロゲン受容体２量体化領域１μｌをその上に加え、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析した。これらの結果はペプチドイオン信号が結合エネルギー吸収分子表面（図20、上側）上でのみ検出されること、そして遊離分子は有効でないこと（図20、下側）を示している。

2.　桂皮酸ブロマイド（Aldrich）（先行技術ではレーザー波長355nmで基質として機能しない）をイソプロパノール:0.5M炭酸ナトリウムに溶かして（3:1）、ジビニルスルホン（Fluka）活性化セファロースと23℃の温度下、15時間混合した。過剰なエネルギー吸収分子をイソプロパノールで洗浄除去する。その分子構造を図23に示す。結合、あるいは遊離分子２μｌのアリコットをプローブ端上に置いて、0.1%トリフルオロ酢酸に溶かしたペプチド混合物１μｌをその上に加え、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。その結果は、ペプチドイオン信号は結合したエネルギー吸収分子の表面でだけ検出され（図24、１番上）、遊離分子は有効ではない（図24、下側）を示している。

3.　ジヒドロキシ安息香酸をジシクロヘキシルカルボジイミドで活性化させ、Fmoc－MAP8側鎖樹脂（Applied Biosystem,Forster,City,CA）と23℃の温度下で15時間混合する。過剰なエネルギー吸収分子はメタノールで洗浄除去する。この分子構造を図25に示す。結合エネルギー吸収分子を含む、および含まないMAP8側鎖樹脂１μｌのアリコットをプローブ端上に置いて、0.1%トリフルオロ酢酸に溶かしたペプチド混合物１μｌを上に加え、レ

ーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。その結果は、ペプチドイオン信号が結合エネルギー吸収分子を持った表面上でのみ検出されること（図26、１番下）、エネルギー吸収分子を含まないコントロール表面は有効ではないことを示す（図24、１番上）。

4. α－シアノ－４－ヒドロキシ桂皮酸をメタノールに溶かし、AffiGel 10あるいはAffiGel 15（BioRad）と種々のpH値で、23℃の温度下、２～24時間混合した。過剰なエネルギー吸収分子をメタノールで洗浄除去する。結合した分子２μｌのアリコットをプローブ端上に置いて、１μｌのペプチド混合物、あるいはミオグロビン、あるいはトリプシン、あるいは炭酸アンヒドラーゼを上に加え、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。この結果は、ミオグロビンイオン信号が結合エネルギー吸収分子を有する表面でのみ検出され（図27A）、汚染性低質量イオン信号はほとんど観察されない（図27B）を示している。

5. 40％ポリアクリルアミド溶液を調製して、望ましい形のプローブ端内に入れる。このゲルをサイズで観察できる程の縮小が認められなくなるまで、空気で乾燥させる。この先端を９％グルタルアルデヒド／緩衝液（v/v）溶液に浸し、穏やかに振りながら37℃の温度で２時間培養する。培養後、緩衝液を用いて過剰なグルタルアルデヒドを洗い流す。活性化された先端を飽和緩衝エネルギー吸収分子溶液に加えて、（約）37℃の温度下で、（約）24時間、穏やかな振動を加えながら培養する。有機溶剤を用いて、それを必要とする状況でエネルギー吸収分子を可溶化する。この先端を緩衝液で洗浄し、９％エタノールアミン／水（v/v）溶液に入れて、25℃の温度で、緩やかな振動を加えながら30分間培養する。次に、先端を緩衝液で洗浄してシアノボロハイドライドナトリウム／緩衝液5mg/mL溶液に加え、25℃の温度下で30分間培養する。最後に、先端を緩衝液で十分に洗浄し、使用時まで保存する。同じ反応を、２分間の超音波処理で6N HClによる加水分解で作成したナイロン端上で行い、その後、水と緩衝液で十分に洗浄する。同じ反応を20％NaOH内に７日間浸し、毎日30～60分間超音波処理を行って活性化させたアクリル端上で行い、その後洗浄した。この実験で推定される表面の一般的な分子構造を図28に示す。

6. 40％ポリアクリルアミド溶液を調製し、望ましい形のプローブ端に入れる。このゲルを、観察されるようなサイズの縮小が認められなくなるまで、空気で乾燥させる。pH値が8.8の0.5M炭酸ナトリウムを洗浄用緩衝液として作成する。上に作成したプローブ端をジビニルスルホン（Fluka）の溶液および緩衝液を10:1で混合した溶液に入れ、24時間培養する。このプローブ端を緩衝液で洗浄して、pH8のエネルギー吸収分子緩衝液内に入れ、２時間培養する。同じ反応を超音波処理を加えながら6N HClでの加水分解で作成したナイロン端上で実行し、その後で水と緩衝液で十分に洗浄する。同じ反応を20％NaOH内に７日間浸して、毎日30～60分間超音波処理を加えて活性化させたアクリル端上で行い、その後、洗浄した。この実験で推定される表面の一般的な分子構造を図29に示す。

7. 40％ポリアクリルアミド溶液を調製して、望ましい形のプローブ端に入れる。このゲルを、観察できるようなサイズの縮小が認められなくなるまで空気で乾燥させる。ジクロロメタン/NMP（2:1）内に100mg/mLで溶解したエネルギー吸収分子と、1Mジクロロヘキシルカルボジイミド/NMP溶液を、それぞれ1:2（EAM:DCC）の比率で混合する。EAM/DCC溶液を次に25℃の温度で１時間、撹拌しながら培養する。培養後、白い沈殿物が観察される。この白い沈殿物をか焼させたガラスフィルターでろ過する。このフィルターの透過フローはDCC活性化EAMである。次に、この先端をDCC活性化EAM溶液に入れて、25℃の温度で（約）２時間培養する。この先端を最終的に、アセトン、ジクロロメタン、メタノール、NMP、およびヘキサンなどの種々の溶剤で洗浄する。同じ反応を超音波処理を加えながら6N HClで２分間加水分解することによって調製されたナイロン端上で実行し、その後、水と緩衝液で洗浄する。同じ反応を20％NaOHに７日間浸し、毎日30～60分間超音波処理を加えて作成したアクリル端上で行い、その後洗浄する。この表面の一般的な分子構造を図30に示す。

8. 40％ポリアクリルアミド溶液を調製して、望ましい形のプローブ端に入れる。このゲルを観察できる程のサイズの縮小が認められなくなるまで、空気で乾燥される。ジクロロメタン/NMP（2:1）に溶かしたＮ－α－Fmoc－Ｌ－Lysineの100mg/mLと1M DCC/NMP溶液を1

:2（リシン:DCC）の比率で混合する。このリシン/DCC溶液を25℃の温度下で、撹拌しながら１時間培養する。培養後、白い沈殿物が観察され、か焼したガラスファイバーでろ過する。透過フローはDCC活性化リシンである。このプローブ端をDCC活性化リシン溶液に入れて、25℃の温度下、２時間（程度）培養する。このプローブ端を次に5mLピペリジン入れて、25℃の温度で、おだやかな振動を加えながら45分間培養する。DCC活性化リシンをこのプローブ端を用いて、望ましいリシン側鎖ができるまで、連続して反応させる。ジクロロメタン/NMP（それぞれ2:1）内に100mg/mLで溶かしたEAM溶液と1M DCC/NMP溶液を1:2の比率（EAM:DCC）で混合する。このEAM/DCC溶液を25℃の温度下で、緩やかな振動を加えながら１時間培養する。培養後、白い沈殿物が観察され、か焼したガラスファイバーでろ過する。透過フローはDCC活性化EAMである。このEAMはDCCと反応する酸機能基を有する。このプローブ端をDCC活性化EAM溶液に入れて、25℃の温度で２時間（程度）、緩やかな振動を加えながら培養する。最後に、このプローブ端を、使用前に過剰なジクロロメタン、NMP、およびメタノールで洗浄する。同じ反応を超音波処理を加えながら6N HClで２分間加水分解することによって調製されたタイロン端で実行し、その後、水と緩衝液で洗浄する。同じ反応を20％NaOH内に７日間浸し、１日30～60分間超音波処理を加えて活性化したアクリル端上でも行い、その後、洗浄する。この実験で推定される表面の一般的な化学構造を図31に示す。

II.表面への配位共有結合結合によって結合されたエネルギー吸収分子

1. チオサリチル酸（Aldrich）を水、または50％メタノール水溶液、あるいはメタノールに溶解する。これらの溶液はそのまま用いるか、あるいはそれら溶液のpHを炭酸水素ナトリウムあるいは水酸化アンモニウムまたはトリエチルアミンで6.5に調整してから用いる。Cu（II）イオンをイミノジアセテート（IDA）（Chelating Sepharose Fast Flow,Pharmacia）あるいはトリス（カルボキシメチル）エチレネイドアミン（TED）（YipおよびHutches,1991によって述べられているように合成）のいずれかでキレート化する。このエネルギー吸収分子の溶液をIDA－Cu（II）ゲルと４℃から23℃の温度下で５分間～15時間の範囲で混合する。過剰のエネルギー吸収分子は水か、50％メタノール水溶液か、あるいはメタノールで洗浄除去する。この実験で推定される表面の分子構造を図32に示す。結合エネルギー吸収分子１μｌのアリコットをプローブ端上に置いて、１μｌのペプチド混合物、あるいはエストロゲン受容体２量体化領域、またミオグロビンを0.1％トリフルオロ酢酸に溶かしたものを上に加え、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。図33はこの表面から脱着されるエストロゲン受容体２量体化領域の代表的な質量スペクトルを示す。

2. EAM表面の上に置かれたサンプルで、配列決定のためのその場所での反応を簡単に行うことができる。プローブ表面上のIDA－Cu（II）に配位共有結合しているチオサリチル酸をセクション2.1に示すような方法で調製する。$(GHHPH)_3G$ペプチド１μｌのアリコットをこの表面上に置いて、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。いくつかのスペクトル（１スペクトルあたり平均50レーザーショット）を得た後、サンプルを取り出す。カルボキシペプチダーゼＹ（Boehringer Mannheim）２μｌのアリコットを表面の直接加えて、モイストチェンバー内で５分～１時間、37℃の温度下で培養される。0.1％トリフルオロ酢酸１μｌによってその場所での酵素消化を終わらせ、サンプルを質量分析測定で再分析する。

3. 配列決定のその場所での反応の別の実施例はトリプシン消化を行い、その後でＣ－端末配列決定を行う方法である。プローブ表面上でIDA－Cu（II）に配位共有結合したチオサリチル酸をセクション2.1.に述べた方法で調製する。エストロゲン受容体２量体化領域（6168.4Da）１μｌのアリコットをこの表面上に置いて、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。いくつかのスペクトル（１スペクトルあたり平均20レーザーショット）を得た後、サンプルを取り出す。0.1M重炭酸ナトリウムに溶かしたトリプシン（Sigma）２μｌのアルコットを表面に付加して、37℃の温度で15分間培養する。0.1％トリフルオロ酢酸１μｌを加えてその場所での消化を終わらせ、質量分析測定で再分析する。いくつかのスペクトル（１スペクトルあたり平均20レーザーショット）を得た後、サンプルを取

り出す。カルボキシペプチダーゼＹ（Boehringer Mannheim）２μｌのアリコットを直接表面に加えて、モイストチェンバー内で37℃の温度で１時間培養する。0.1%トリフルオロ酢酸を加えてその場所での酵素消化を終わらせ、その後、サンプルを質量分光測定で再分析する。

III.表面にイオン結合で結合したエネルギー吸収

シナピン酸、またはα－シアノ－４－ヒドロキシシナピン酸を水に懸濁させ、pHを希釈した水酸化ナトリウムで6.6に調節する。テンタクルDEAD Fractogal（EM Separations,Gibbstown,NJ）を20mM HEPES,pH6.0で洗浄して、吸引乾燥させる。エネルギー吸収分子溶液をこのDEAEゲルと23℃の温度下で15時間混合させる。このゲルを、過剰なエネルギー吸収分子が取り除かれるまで水で洗浄する。この実験から推定される表面の分子構造を図34に示す。結合されたエネルギー吸収分子0.5μｌのアリコットをプローブ端上に置いて、0.1%トリフルオロ酢酸に溶かした１μｌのエストロゲン受容体２量体化領域あるいはミオグロビンを上に加えて、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。図35AおよびＢはその質量スペクトルを示す。

IV.表面への疎水性／ファンデルワールス結合によって結合されたエネルギー吸収

1.　α－シアノ－４－ヒドロキシ桂皮酸を50%メタノール水溶液およびジメチルスルホキシドに溶解する。これをアミノメチル化されたポリスチレンと23℃の温度で15時間混合する。過剰なエネルギー吸収分子を50%メタノール水溶液で洗浄除去する。この実験で推定される分子構造を図36に示す。結合したエネルギー吸収分子１μｌのアリコットをプローブ端上に置いて、１μｌのペプチドを上に加え、レーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。

実施例５

光感作性付着および放出のために強化された表面（SEPAR）

DNA,RNAおよび蛋白質などの生体高分子の構造と特性を決定する個別構成ブロック（モノマー）の線形的な集団が知られているが、これらは、レーザー脱着／イオン化、飛行時間（TOF）質量分析測定（MS）による部分的に消化された（例えば、化学的あるいは酵素による）生体高分子の個別的な質量判定を伴う方法で（全体にせよ、その一部にせよ）配列決定される。

生体高分子を先ず１つ、あるいは複数の共有結合による光感作性（つまり、光に対して感受性のある）結合を介してSELDIプローブ素子に結合したとする。次に、その生体高分子の端末のいろいろな数の個別ユニット（モノマー）を酵素あるいは化学反応により分割する（つまり、取り出す）。プローブ素子表面に残る分析対象物は質量が生体高分子のグループ（ポピュレーション）で構成されており、その端末モノマーユニットはそれぞれ一部が失われている。修飾された生体高分子の、小さな、しかし十分な生体高分子がレーザー光によってプローブ素子から結合解除（連結解除）される、つまり、260nmと365nmの間の波長の紫外線で光感作性結合が分割される。結合解除された生体高分子は飛行時間質量分析測定によって脱着／イオン化される。

I.生体高分子のSELDI表面への結合

３つの成分が関連している。１）アミンまたはカルボキシル基のいずれか、あるいはその両方に反応するように活性化された表面;2）光感作性化合物、一般的に一般式がR_1－Ｎ＝Ｎ－R_2のアゾ化合物、例えば、５－（４－アミノフェニルアゾ）サリチル酸（Aldrich）、アゾジカルボンアミド（Aldrich）、あるいはその他の活性水素反応性化学物質などの光感作性などを作り出すメカニズムの使用;3）蛋白質、核酸、炭水化物などの生体高分子。

光感作性化合物を先ず最初に活性化された表面に付着する必要がある。例えば、アゾジカルボンアミドとアミンに対して反応性を示す表面に付着させたり、アミンまたはカルボキシルに対して反応性を示す表面に対してアミノフェニルアゾサリチル酸を付着させるというようにである。次に、従来用いられている多くの化学物質、例えば、アミンに反応性を示す化学物質－臭化シアノゲン、Ｎ－ヒドロキシ桂皮酸イミドエステル、FMP活性体、EDC－媒介、ジビニルスルホン；ヒドロキシル基に反応性を示す化学物質－エポキシ活性体、

ジビニルスルホン；スルフィドリル基に対して反応性を示すヨードアセチル活性体、マレイミド、ジビニルスルホン、エポキシ活性体；カルボニル基に反応性を示す化学物質－ヒドラジド、還元性アミン化；活性水素に反応性を示す化学物質－同時に光感作性結合もつくりだすジアゾニウム、などの１つを用いて、光感作性化合物あるいは生体高分子を活性化させる。最後に、この生体高分子を１つ、あるいは複数の結合を介して光感作性化合物に付着させる。過剰な化学物質は、イオン化力が強くpHの低い、水性あるいは有機溶媒を用いて、何回か操作を繰り返して、洗浄除去する。

II.構造上の統合性を検証するための質量分析測定による分析

260nm～365nmのUVレーザーは光分解結合を切断することができる。脱共役生体高分子を、MALDI TOFにより脱着／イオン化する（当業者には、SEND,SEACおよびSEPARも使用できることが周知である）。

III.生体高分子のその場所における配列決定

このことは、酵素的あるいは化学的方法による、周知の連続的な分解のいずれかの方法によって行われ、例えば、タンパク質のＮ－末端はアミノペプチダーゼにより、タンパク質のＣ－末端はカルボキシペプチダーゼにより、タンパク質のＮ－末端はエドマン分解により、核酸はエキソヌクレアーゼにより、またはサンガー法により、炭水化物はノイラミニダーゼ、マンナーゼ、フカーゼ、ガラクトシダーゼ、グルコシダーゼ、Ｏ－グリカナーゼ、またはＮ－グリカナーゼにより配列決定される。過剰の試薬ならびに反応生成物を洗浄除去した後、複数の光分解結合によって表面上は繋ぎ止められている、失われた末端モノマーの数が異なる一団の、質量の定義された生体高分子から成る分析対象物を、MALDI TOF MSにより分析する（当業者には、SEND,SEACおよびSEPARも使用できることは周知である）。

酵素的手法あるいは化学的手法を用いた複数の内部配列の決定には、例えば、エンドヌクレアーゼあるいは臭化シアンを用いた蛋白質の分解と、それに続くＮ－および（または）Ｃ－末端の連続的な分解、エンドヌクレアーゼを用いた核酸の分解とそれに続くエキソヌクレアーゼあるいは化学的手法よる連続的な分解、エンドグリコシダーゼＨあるいはエンドグリコシダーゼＦを用いた多糖類鎖の分解とそれに続く特異的な酵素を用いた分解がある。過剰の試薬ならびに反応生成物を洗浄除去した後、表面上に残っている、失われた末端モノマーの数が異なる複数の集団の、質量の定義された生体高分子から成る分析対象物を、MALDI TOF MS（当業者に周知）により分析する。

IV.配列決定の特異例

この原理の実物による説明を、26残基のペプチドの配列決定により提供する。

GHHPHGHHPHGHHPHGHHPHGHHPHGHHPHG

このペプチド（CHHPH）$_5$Gは、ヒスチジンに富む糖蛋白質（HRG）として知られている80kDaの蛋白質の、完全な配列の中の金属結合ドメインである。

カップリング剤として表面にアリルアミン基をもつガラスビーズ（sigma）を、冷却した0.3M HClで洗浄し、懸濁する。50mg/mLの$NaNO_2$水溶液のアリコットを、ビーズに対して1:5（v/v）の比で（$NaNO_2$:HCl）加え、穏やかに振とうしながら４℃で15分間インキュベートする。インキュベーションの後、0.3M HClおよび50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH8.0）で洗浄する。配列決定されるべきペプチドを、リン酸ナトリウム（pH8.0）中のビーズに加え、穏やかに振とうしながら４℃で24時間インキュベートする。ペプチドを結合したビーズを、リン酸ナトリウム緩衝液で洗浄し、高濃度の塩（例えば1.0M）、希酸、および有機溶媒（例えば、メタノール）を含むリン酸ナトリウム緩衝液を用いて、MALDI－TOF質量分析測定（当業者には、SEND,SEAC、およびSEPARもまた使用できることが周知である）か、または220nmの吸光度により、ペプチドの徴候が上清に全く検出されなくなるまで洗浄する。ビーズのアリコット１μｌをプローブ先端上に置き、１μＬ、のシナピン酸（50%メタノール/0.1%トルフルオロ酢酸に溶かした）をビーズに混合し、このサンプルをレーザー脱着飛行時間質量分析測定により分析した。幾つかのスペクトル（各々平均50個のレーザーショット）を得た後、表面上に残っているペプチドをメタノールで洗浄してシナピン酸を除き、カルボキシペプチダーゼ（Boehringer Mannheim）を用いて、モイストチャ

ンバー内で23℃で消化する。次に、消化されたペプチドをリン酸緩衝塩類溶液（PBS）（pH8.0）で洗浄する。シナピン酸の１μＬのアリコットを表面に加え、レーザー脱着飛行時間質量分析測定により再び分析した。GHHPHGの配列の、Ｃ－末端分析の結果を図35に示す。このペプチドの、新生配列が観察される。この配列は、２つのピークの間の質量の差から推断される。

第２の実施例は、光分解結合によって表面上に共有結合された、複数のペプチドの同時の配列決定である。ヒトのエストロゲン受容体の２量ドメイン（6168.4Da）を複数の光分解結合により表面上に繋ぎ止める。このペプチドは、その配列中に３つのメチオニン残基を持っており、臭化シアンにより特異的に分解され、2170.58Da（DI－M18）,3118.77Da（A19－M45）および535.62Da（S46－M50）および397.62Da（E51－L53）の質量のペプチドを生じる。これらのペプチドはすべて、光分解結合により表面上に結合されている。次に、これらの各ペプチドを、完全に他から識別される新生配列を生じさせるため、カルボキシペプチダーゼＹによりその場所で消化する。

蛋白質の構造決定のためのもう１つのアプローチは、複数の光分解結合によって表面上に結合された蛋白質の、トリプシン消化によって生じる複数のペプチドの、Ｎ－末端の同時の配列決定である。インシュリンＢ鎖を、複数の光分解結合により表面上に繋ぎ止める。このペプチドは、その配列の中に２つのリジン／アルギニン残基を持っており、それはトリプシンによって特異的に切断されて、2585.9Da（F1－R22）と859.0Da（G23－K29）の質量のペプチドを生じ、これらはいずれもいる。次いで、これらの各々にその場所で、アミノペプチダーゼ消化あるいはエドマン分解の複数のサイクルのいずれかを施し、他から識別される新生配列を生じさせる。

核酸のカップリングおよび配列決定も同様の方法で行われる。カップリング剤として、表面にアリルアミン基を持つガラスビーズ（Sigma）を0.3M HClで洗浄し、懸濁する。このビーズに、50mg/mLの$NaNO_2$水溶液を、1:5（v/v）の比で（$NaNO_2$:HCl）加え、４℃で15分間穏やかに振とうしながらインキュベートする。インキュベーションの後、冷却した0.3M HClおよび50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH8.0）でビーズを洗浄する。配列決定されるべきDNA（例えば、エストロゲン受容体認識要素、30塩基対のオリゴヌクレオチド）を、リン酸ナトリウム緩衝液（pH8.0）中にてビーズに加え、４℃で24時間穏やかに振とうしながらインキュベートする。DNAを結合したビーズをリン酸ナトリウム緩衝液で洗浄し、高濃度の塩（例えば、1.0M），希酸、および有機溶媒（例えば、メタノール）を加えたリン酸ナトリウム緩衝液を用いて、MALDI－TOF質量分析測定（当業者には、SEND,SEACおよびSEPARもまた使用できることが周知である）あるいは260nmの吸光度によって、上清にDNAの徴候が全く検出されなくなるまで洗浄する。次に、１μＬのビーズのアリコットをプローブ先端上に置き、このビーズに１μＬのアリコットの、３－ヒドロキシピコリン酸（50％メタノール/0.1％トリフルオロ酢酸に溶かした）を混合し、このサンプルをレーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。幾つかの質量スペクトル（各々平均50個のレーザーショット）を得た後、表面に結合している残ったDNAを、メタノールを用いて洗浄して３－ヒドロキシピコリン酸を除き、モイストチャンバー内で、エキソヌクレアーゼ（Boehringer Mannheim）を用い、23℃で消化する。次に、表面上の消化したDNAをリン酸緩衝塩類溶液（PBS）pH8.0で洗浄して、過剰の試薬および反応生成物を除く。３－ヒドロキシピコリン酸の１μＬのアリコットを表面に加え、レーザー脱着飛行時間質量分析測定により再び分析した。DNAの新生の配列を生じる。その配列は、２つのピークの間の質量の差により推断される。

炭水化物鎖は、過ヨウ素酸塩により酸化され、活性化されて、表面上の光分解性化合物に特異的に結合する。この繋ぎ止められた炭水化物について、ノイラミニダーゼ、マンナーゼ、フカーゼ、ガラクトシダーゼ、グルコシダーゼ、Ｏ－、またはＮ－グリカナーゼのような特異的な酵素を用いた配列決定を行い、レーザー脱着飛行時間分析計測定により決定した。５－（４－アミノフェニルアゾ）サリチル酸（Aldric）を、細孔状ガラスビーズ上のアリルアミンのような、カルボキシル反応性表面に結合させる。ヒトおよびウシのヒスチジンに富む糖タンパク質の炭水化物小部分を低濃度の（0.2M）ナトリウム過ヨウ酸塩水

溶液を用い、23℃で90分間酸化する。過剰の試薬を水で洗浄除去する。この蛋白質を、リン酸緩衝液、pH8.0中で、細孔状ガラスビーズ上に結合した５－（４－アミノフェニルアゾ）サリチル酸に加える。次に、シアノボロハイドライドナトリウム（0.6mg/100μｌ）を加え、23℃で18時間撹拌する。水、1M NaClで広範囲に洗浄し、さらに水で再び洗浄して過剰な試薬および未反応のタンパク質を除去する。このビーズの１μＬのアリコットをプローブ先端に置き、１μｌのシナピン酸（50%メタノール/0.1%トルフルオロ酢酸に溶かした）をビーズに加え、このサンプルをレーザー脱着飛行時間質量分析測定により分析する。表面上に結合している残りの蛋白質をメタノールで洗浄してシナピン酸を除去し、リン酸緩衝液（pH8.0）中で、２μｌのトリプシンと共に37℃で30分間インキュベートする。糖ペプチドの結合した表面を、リン酸緩衝塩類溶液および水を用いて完全に洗浄し、過剰の試薬および未結合のペプチドを除去する。このビーズに、シナピン酸の１μＬのアリコットを混合し、このサンプルをレーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。幾つかの質量スペクトル（各々平均50個のレーザショット）を得た後、プローブ表面に残っている糖ペプチド質をメタノールで洗浄してシナピニン酸を除去し、Ｎ－アセチルノイラミニダーゼ（NANase III,Glyko,50mMリン酸ナトリウム、pH6.0、37℃１時間）、マンノシダーゼ（MANase I,Glyko,50mMリン酸ナトリウム、pH6.0、37℃18時間）、フコシダーゼ（FUCase I,Glyko,50mMリン酸ナトリウム、pH5.0、37℃18時間）、Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼ（HEXasc I,Glyko,50mMリン酸ナトリウム、pH5.0、37℃４時間）、Ｏ－グリコシダーゼ（Glyko,50mMリン酸ナトリウム、pH5.0、37℃18時間）、Ｎ－グリカナーゼ（PNGaseF,Glyko,100mMリン酸、pH8.6、37℃18時間）を用い、連続的に、あるいは組み合わせて消化する。最後に、表面上でフラグメント化された糖ペプチドをリン酸緩衝塩類溶液および水で洗浄し、試薬および反応生成物を除去する。この表面に、シナピン酸の１μＬのアリコットを加え、再びレーザー脱着飛行時間質量分析測定で分析する。糖ペプチドの新生配列が得られる。この配列は、２つのピークの間の質量の差から推断される。

この明細書に述べたすべての特許ならびに刊行物は、本発明に関する当業者のレベルを示すものである。すべての特許ならびに刊行物は、この文中においては、個々の刊行物が各々特異的かつ別個に引用文献に取り入れられていたのと同じ程度に引用文献に取り入れられている。

当業者には本発明が、その目的を達成し、述べられた目的物ならびに利益、および固有の目的物ならびに利益を得るために、うまく適合していることが容易に認められるであろう。ここに述べたオリゴヌクレオチド、化合物、方法、手順および技術は、必然的に好ましい実施例を代表するものであって、見本となることを意図しており、発明の範囲を限定するものではない。当業者らには変更ならびに他の使用法が生じるであろうが、それらは本発明の精神に含まれるものであり、添付した請求項の範囲により定義されるものである。

【図４】

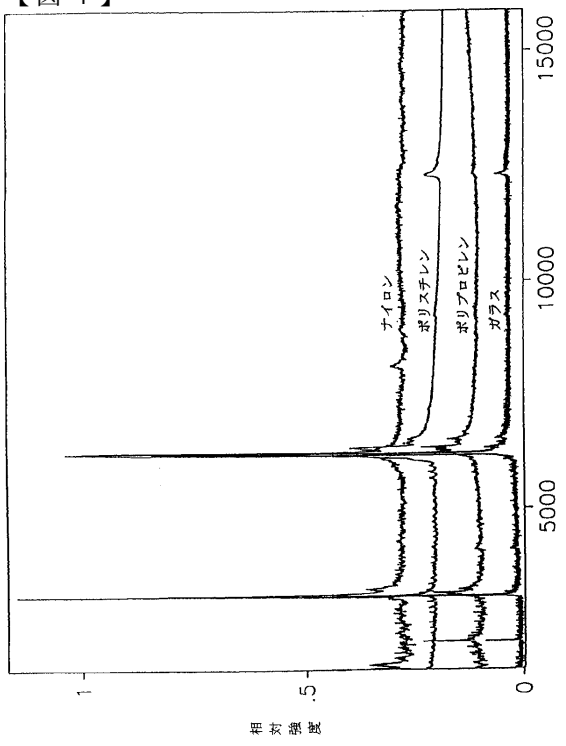

FIGURE 4

【図１】

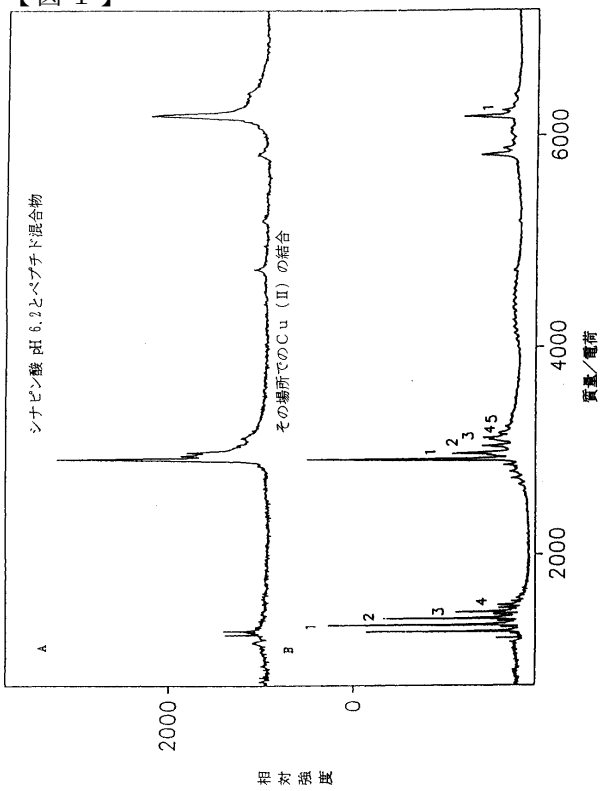

FIGURE 1

【図２】

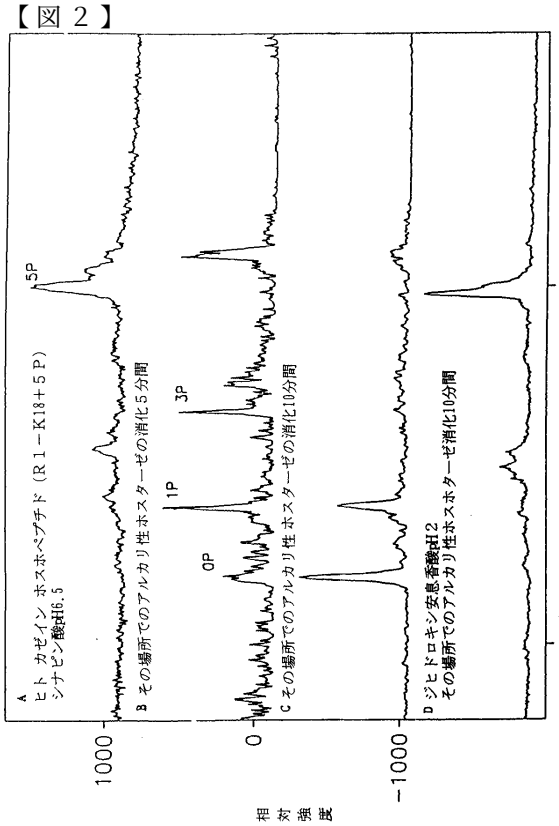

FIGURE 2

【図３】

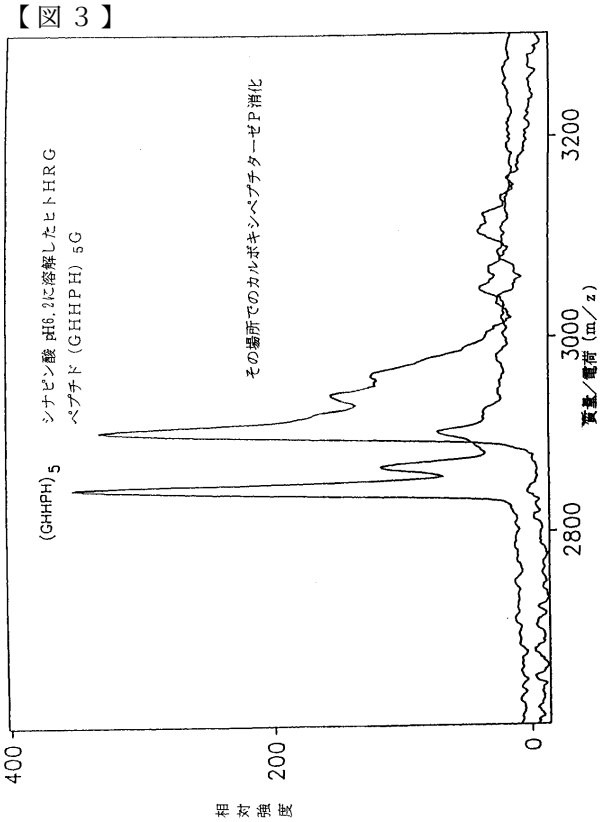

FIGURE 3

【図５】

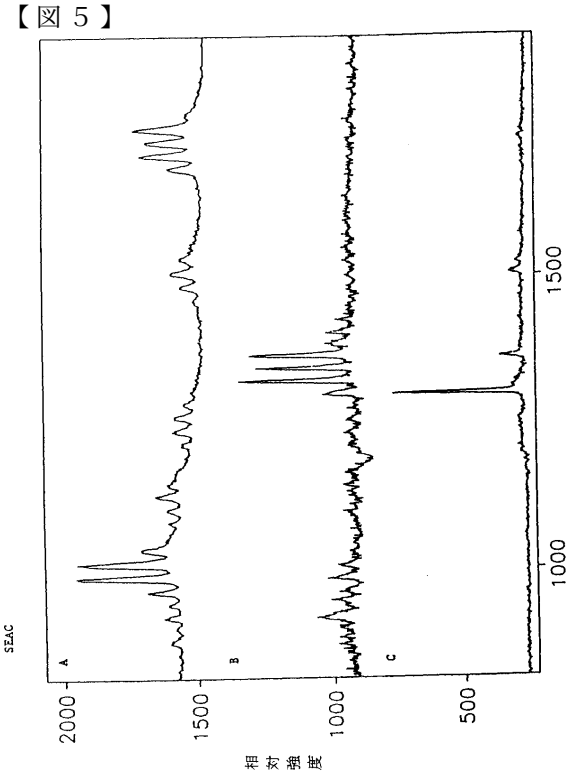

FIGURE 5

【図５】

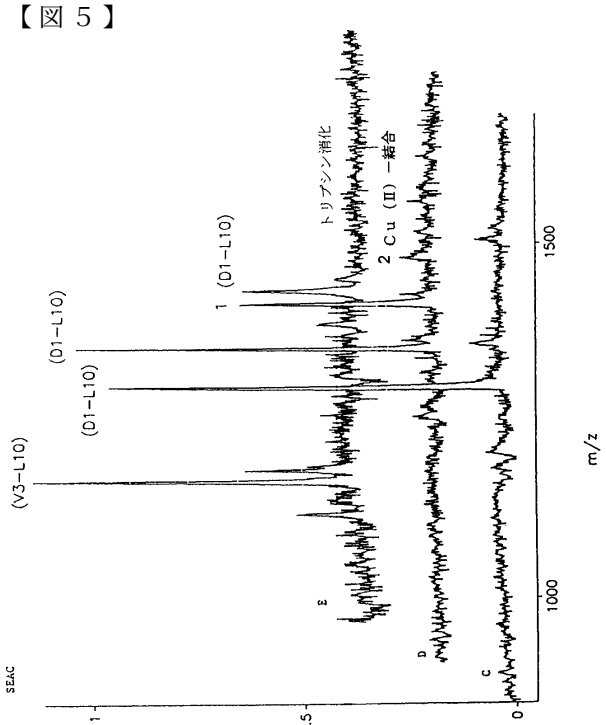

FIGURE 5

【図６】

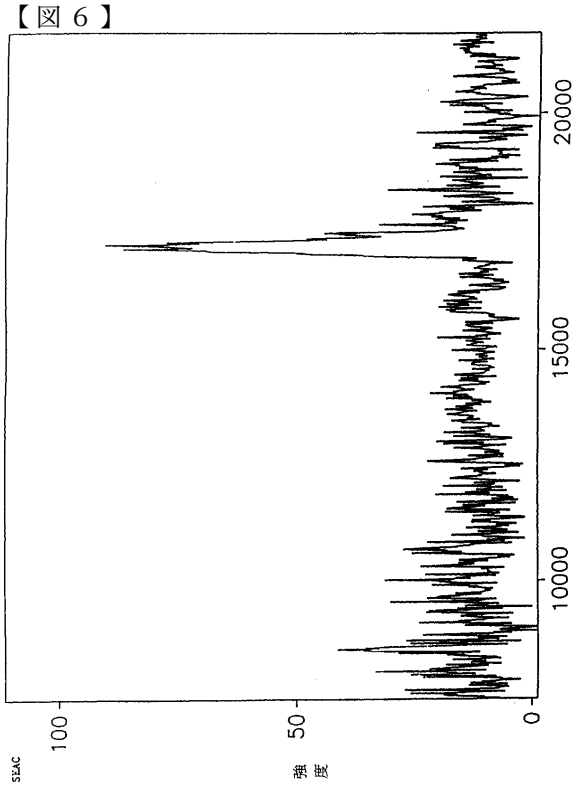

FIGURE 6

【図７】

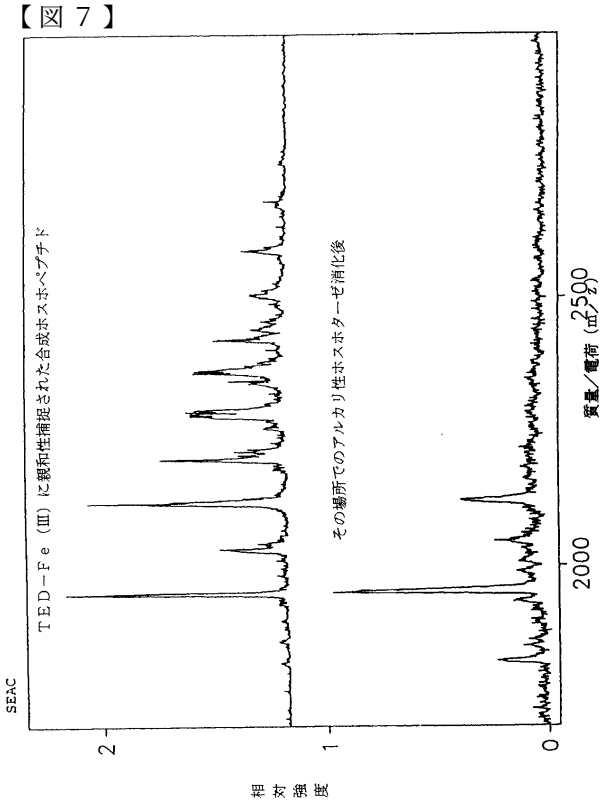

FIGURE 7

【図８】

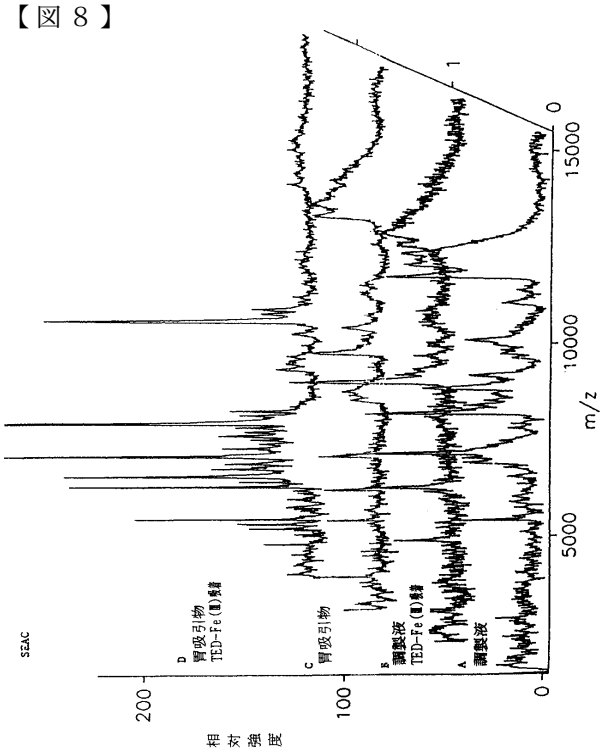

FIGURE 8

【図９Ａ】

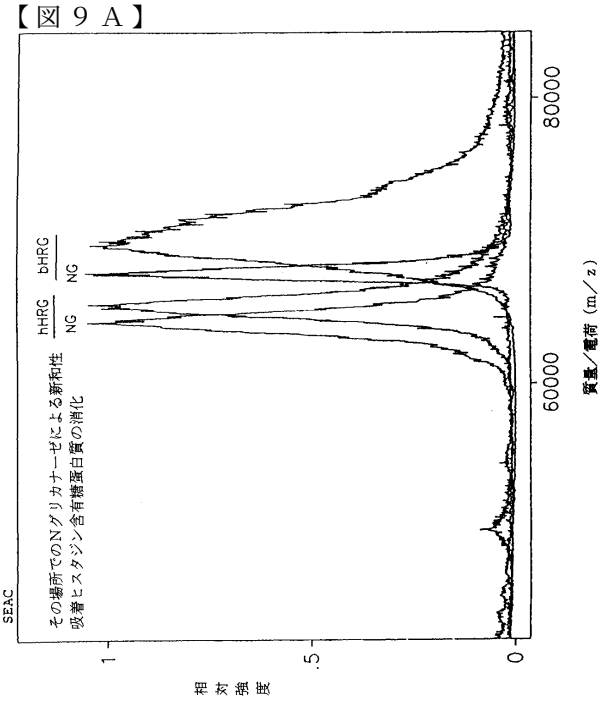

FIGURE 9A

【図９Ｂ】

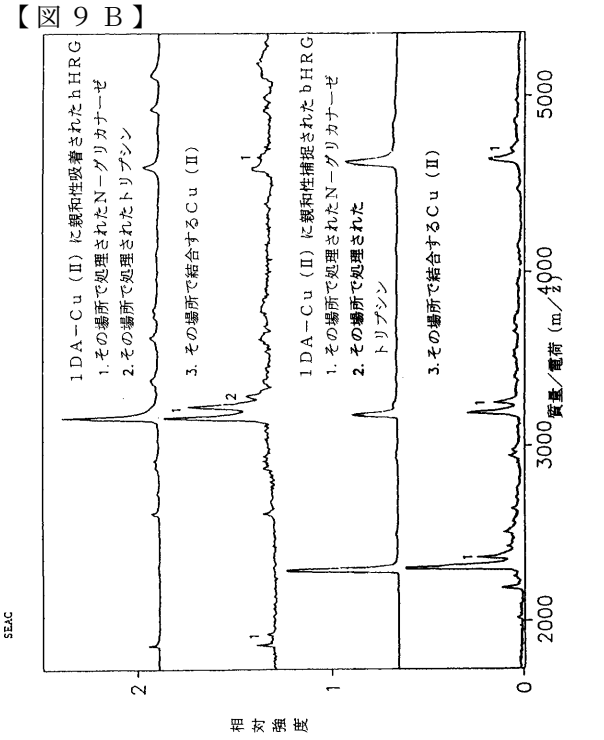

FIGURE 9B

【図９Ｃ】

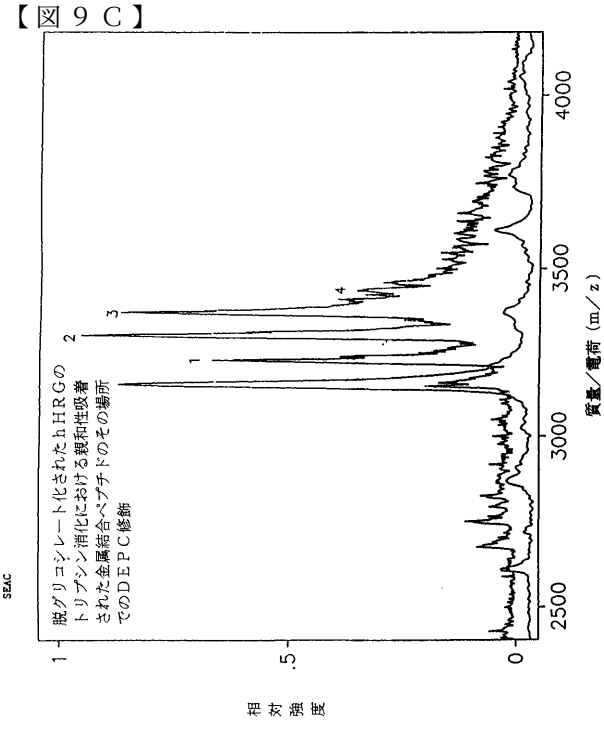

FIGURE 9C

【図９Ｄ】

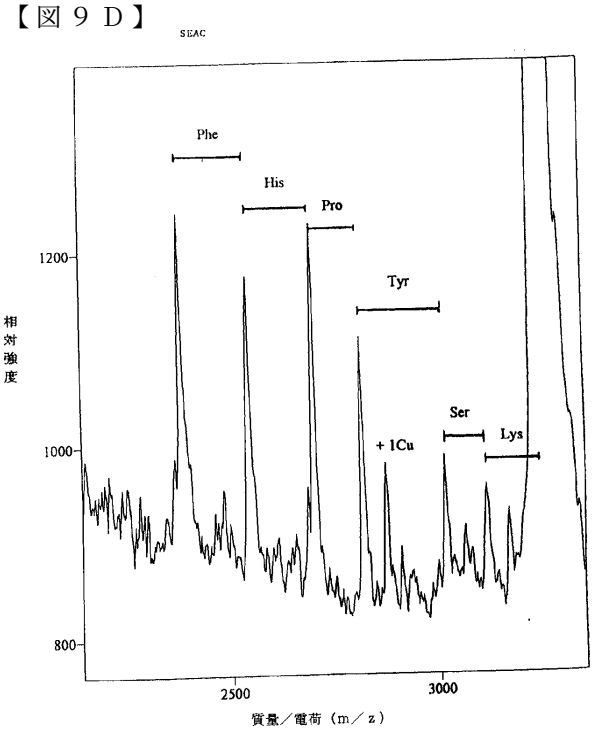

FIGURE 9D

【図１０】

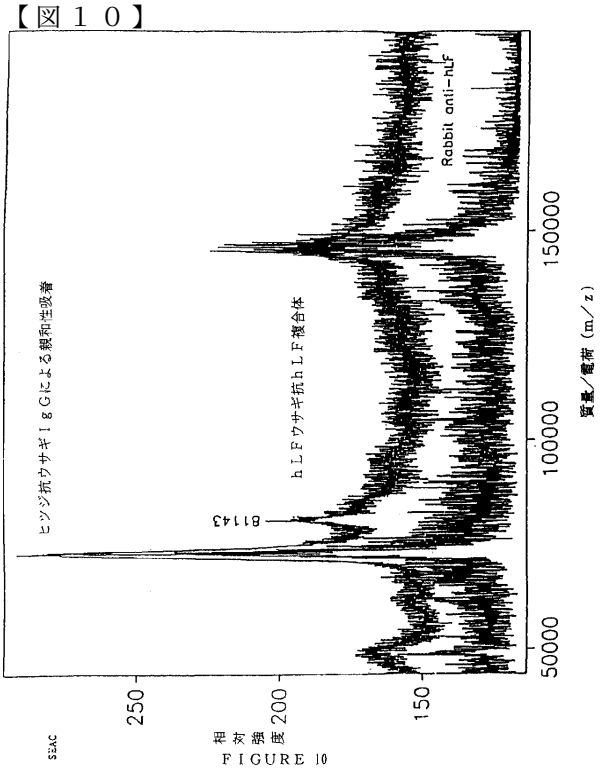

FIGURE 10

【図１１】

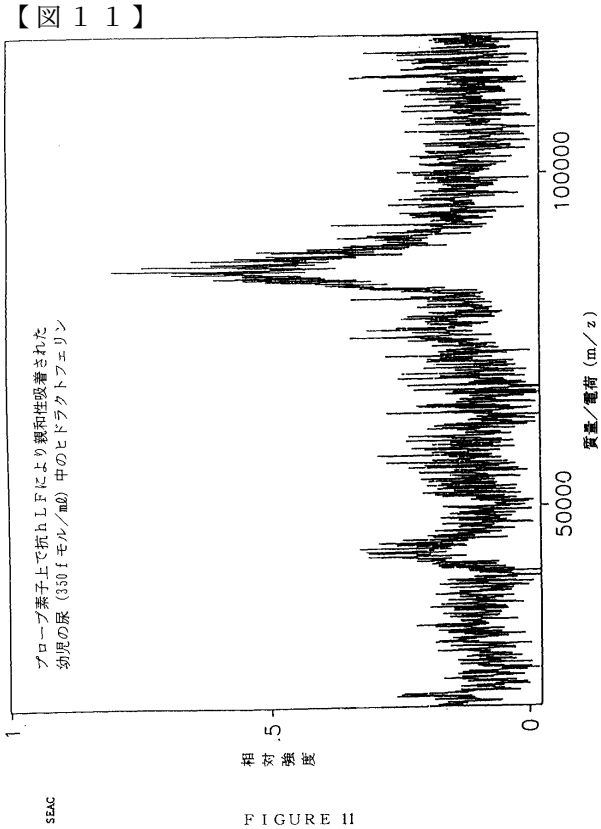

FIGURE 11

【図１１】

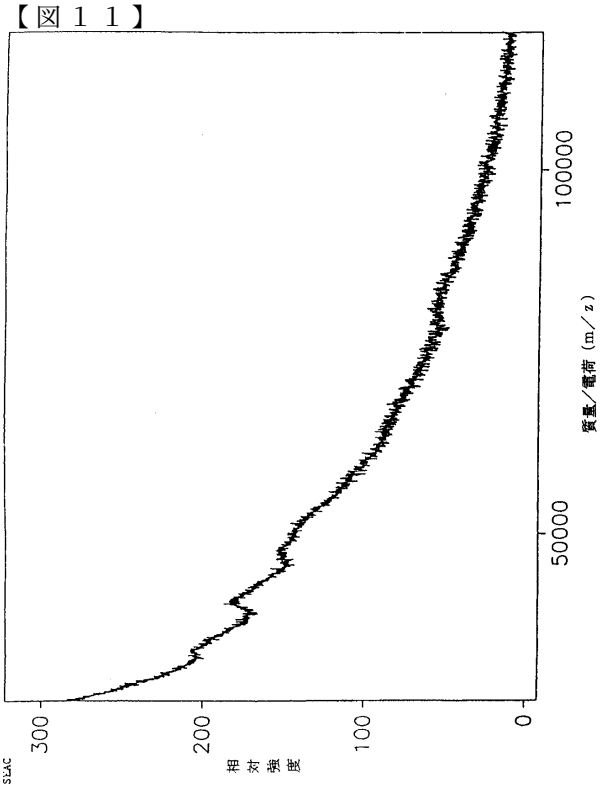

FIGURE 11

【図１２】

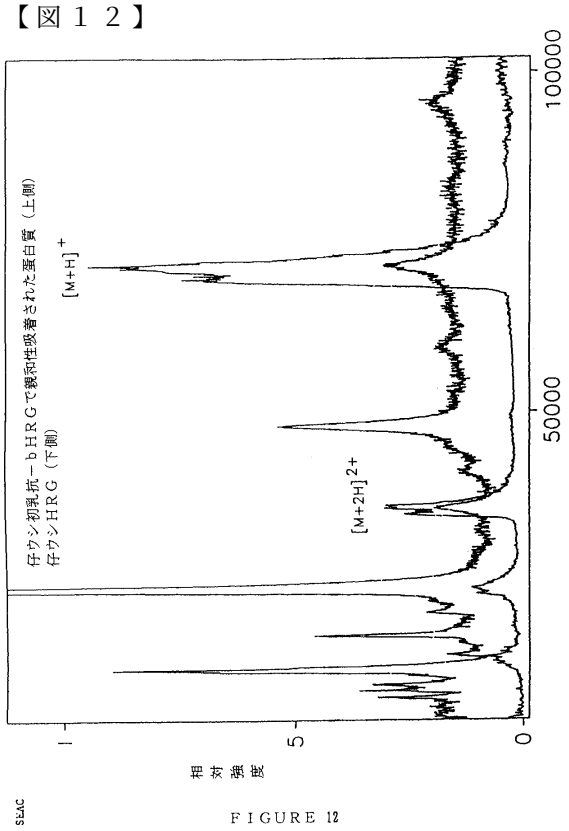

FIGURE 12

【図１３】

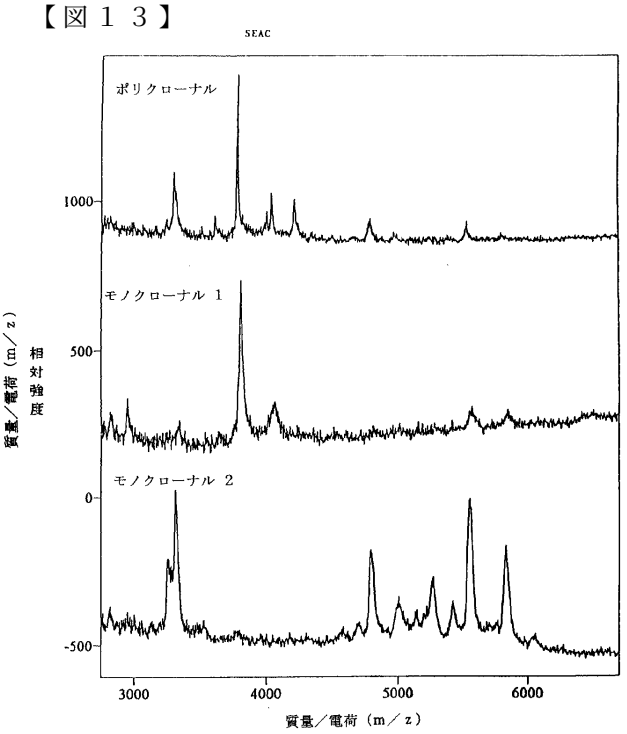

FIGURE 13

【図１４】

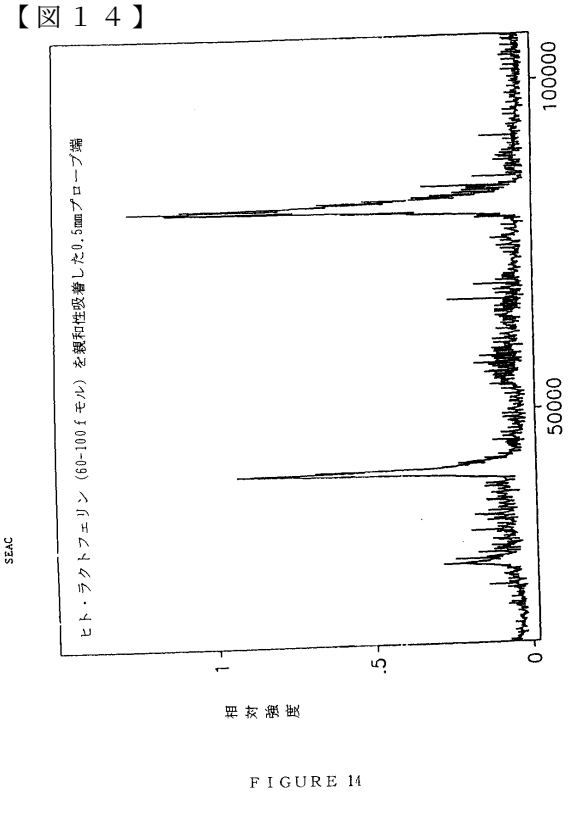

FIGURE 14

【図１５】

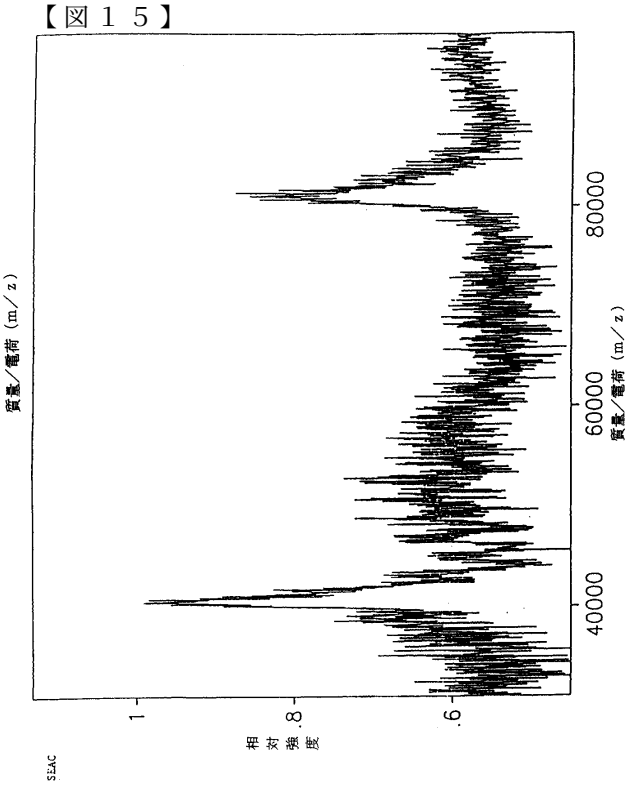

FIGURE 15

【図１６Ａ】

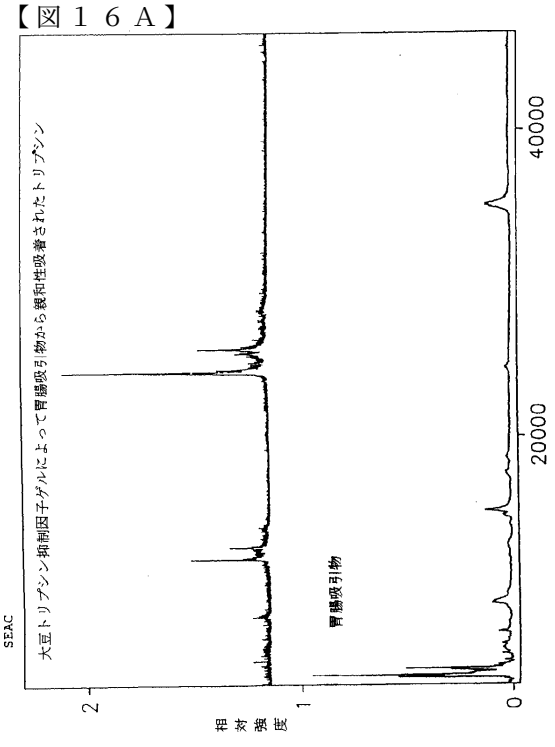

FIGURE 16A

【図１６Ｂ】

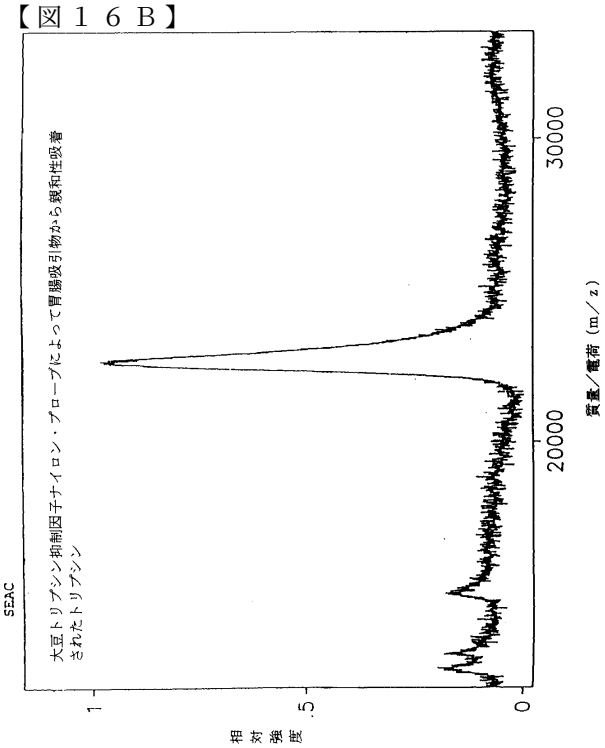

FIGURE 16B

【図１７Ａ】

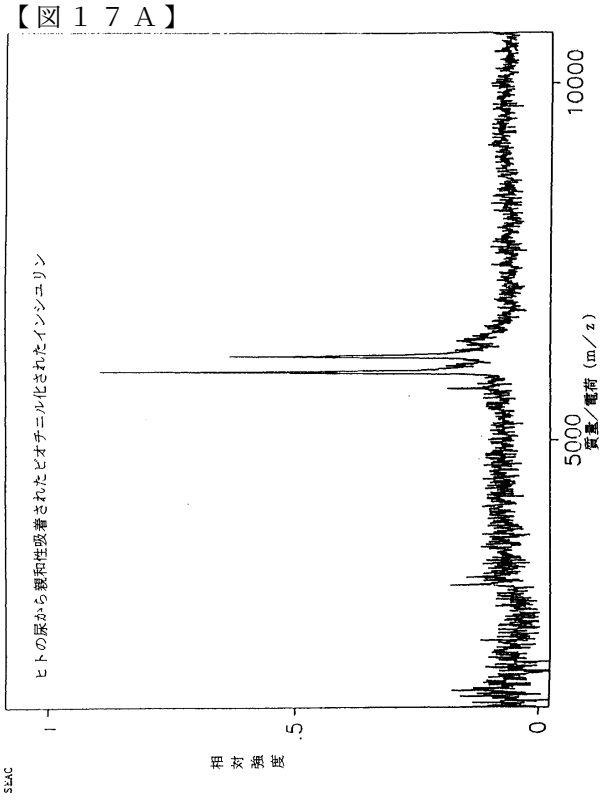

FIGURE 17A,

【図１７Ｂ】

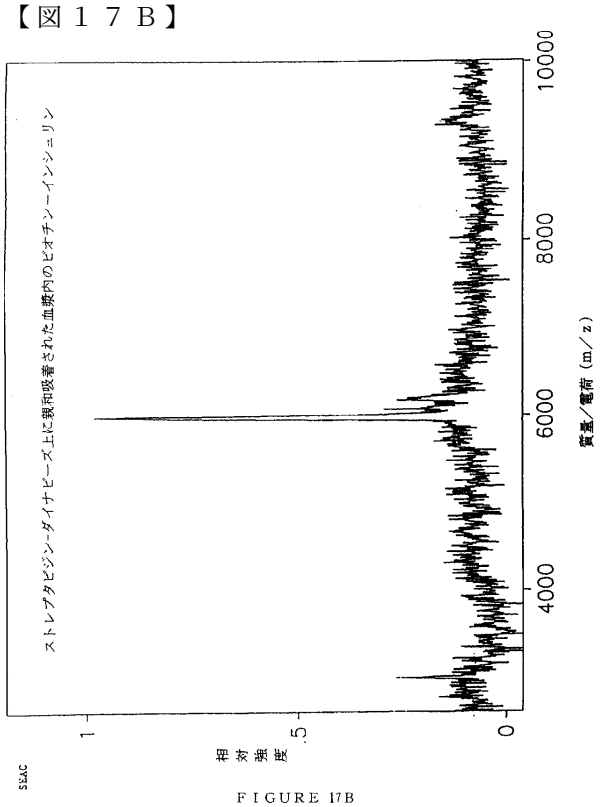

FIGURE 17B

【図１８Ａ】

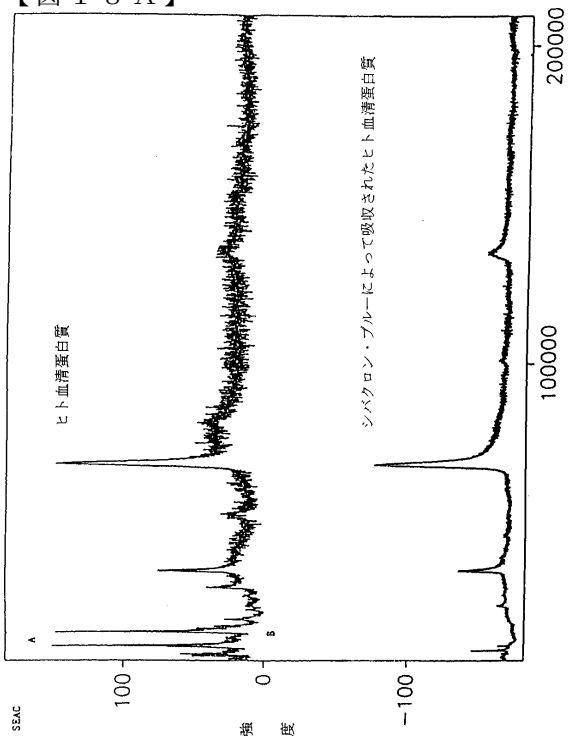

FIGURE 18A&18B

【図１８Ｂ】

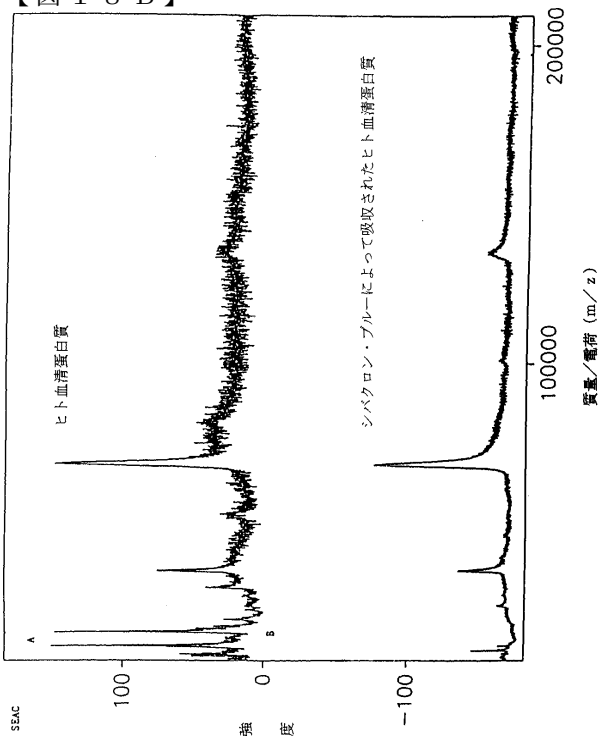

FIGURE 18A&18B

【図１９】

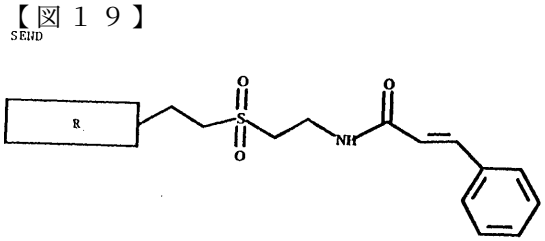

FIGURE 19

【図２０】

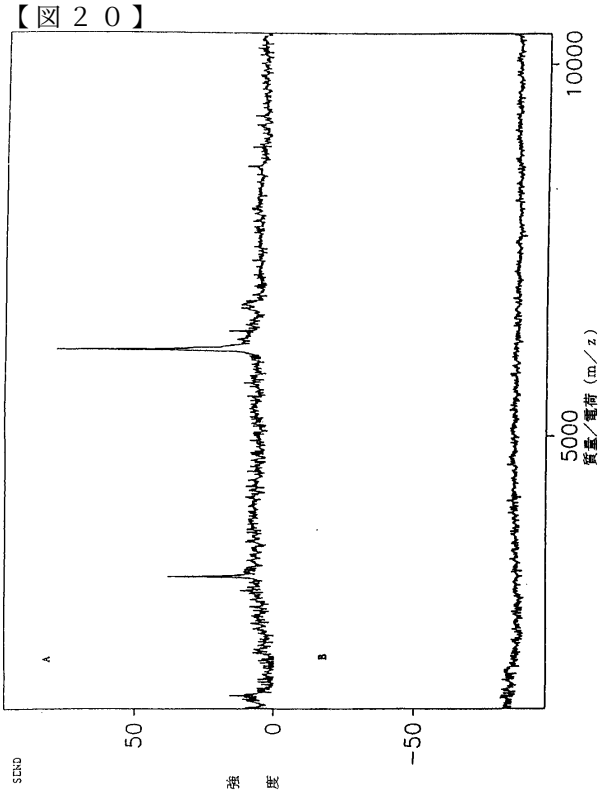

FIGURE 20

【図２１】

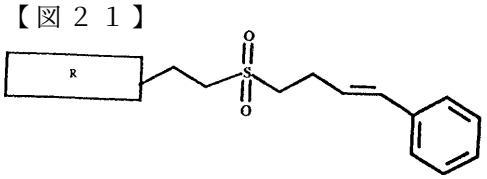

FIGURE 21

【図２２】

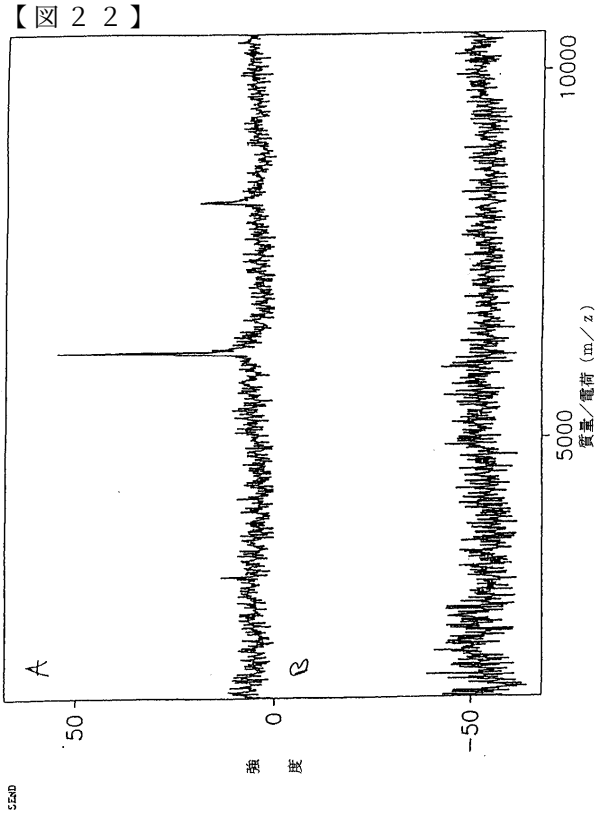

FIGURE 22

【図２３】

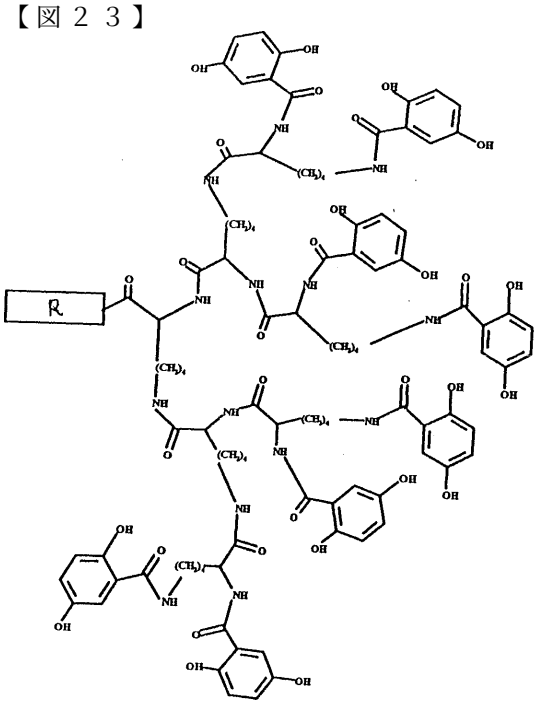

FIGURE 23

【図２４】

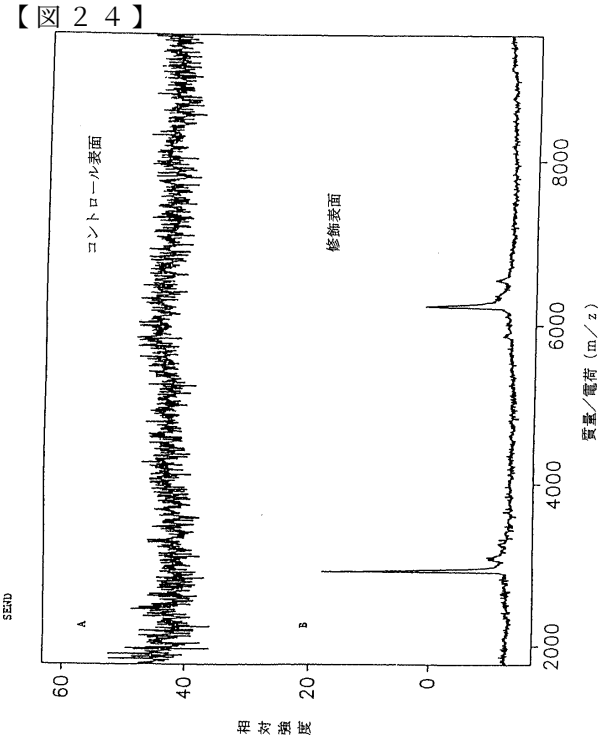

FIGURE 24

【図２５Ａ】

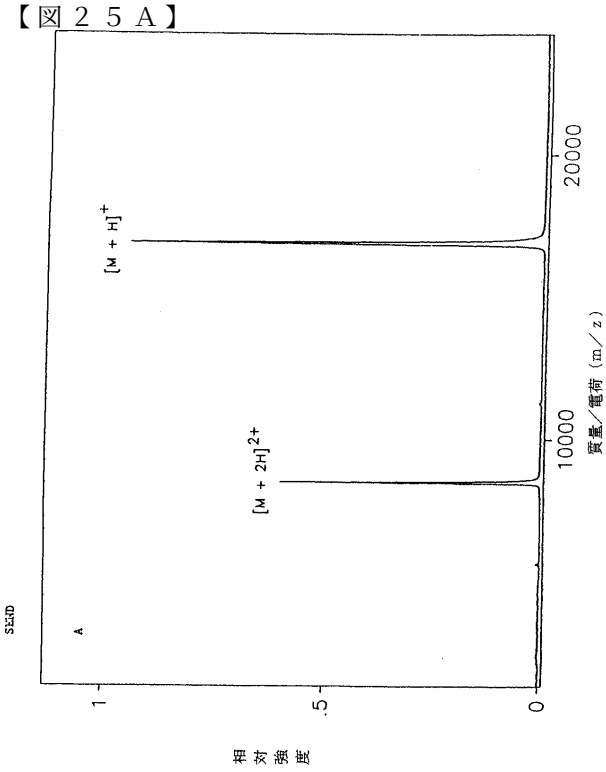

FIGURE 25A

【図２５Ｂ】

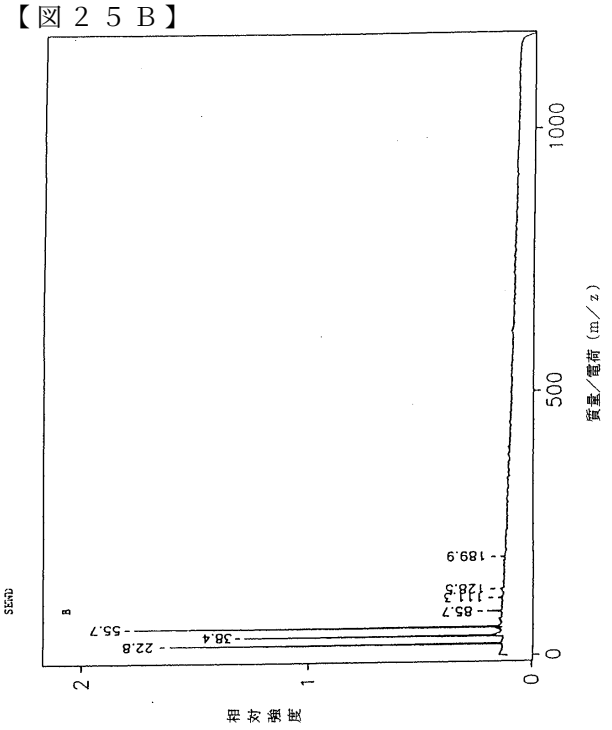

FIGURE 25B

【図２６】

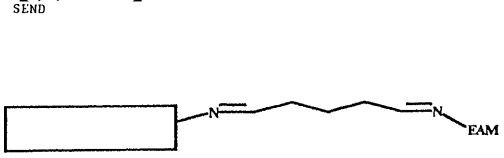

Figure 26

【図２７】

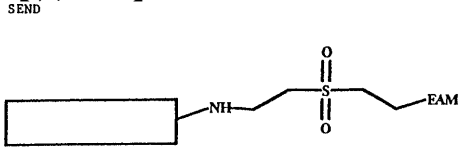

Figure 27

【図３０】

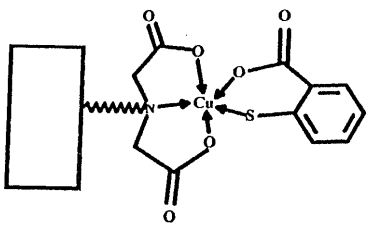

FIGURE 30

【図３２】

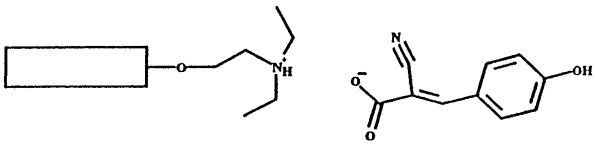

FIGURE 32

【図２８】

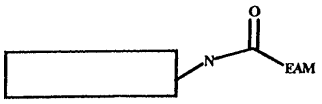

Figure 28

【図２９】

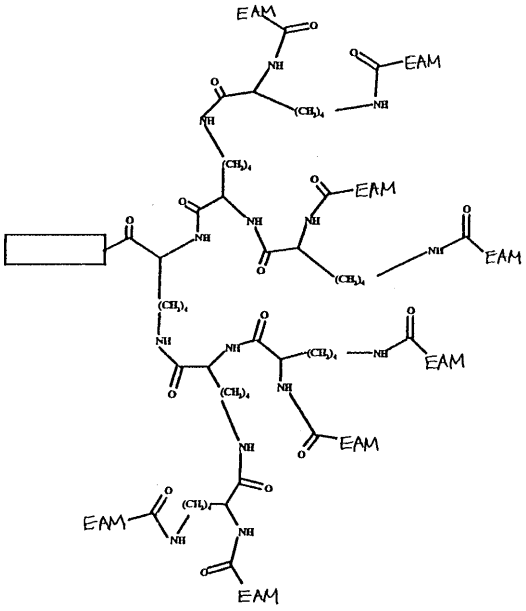

FIGURE 29

【図３１】

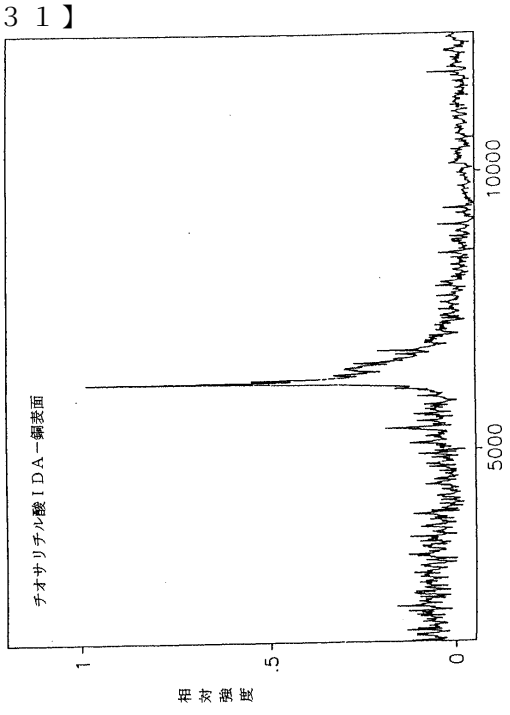

FIGURE 31

【図３３Ａ】

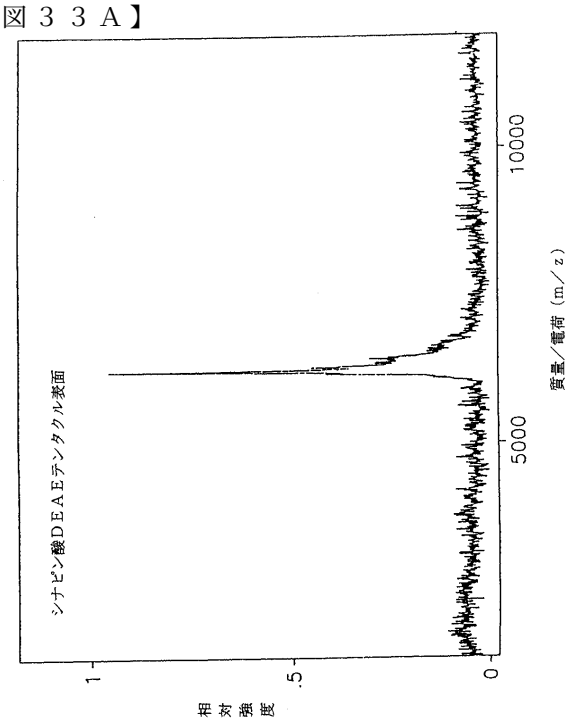

FIGURE 33A

【図３３Ｂ】

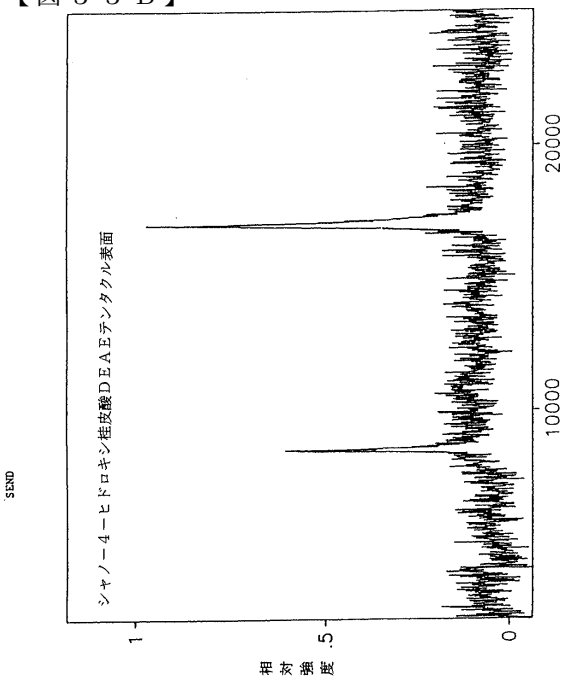

FIGURE 33B

【図３４】

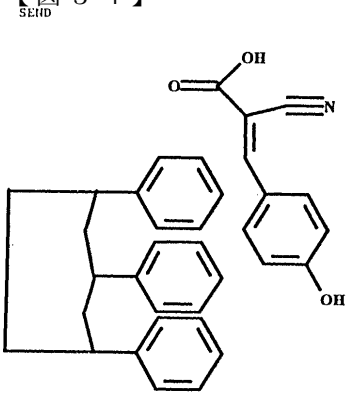

FIGURE 34

【図３５】

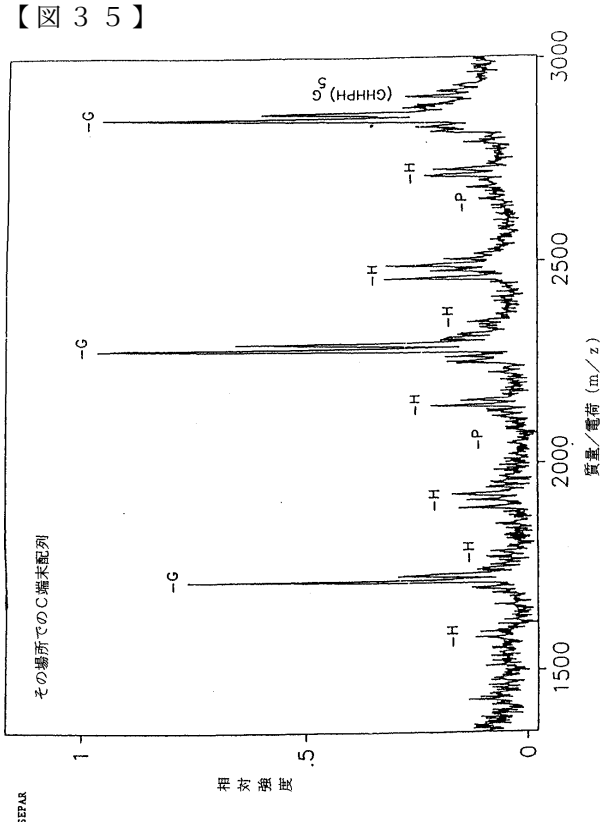

FIGURE 35

フロントページの続き

(72)発明者　ハッチンズ，ティー．ウィリァム
アメリカ合衆国　９５６１６　キャリフォーニア，ディヴィス　グァヴァ　レイン　５５５　アパートメント　８エフ．
(72)発明者　イップ，タイートゥング
アメリカ合衆国　９５６１６　キャリフォーニァ，ディヴィス，ガンジース　プレイス　２７６２

審査官　鈴木　俊光

(56)参考文献　特表平４－５０１１８９（ＪＰ，Ａ）
特表平４－５０７４５８（ＪＰ，Ａ）
特表平５－５０３３５０（ＪＰ，Ａ）
特開平３－８９１６０（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.^{7}，ＤＢ名)
G01N 27/62 - 27/70
H01J 49/00 - 49/48