

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2006年5月4日 (04.05.2006)

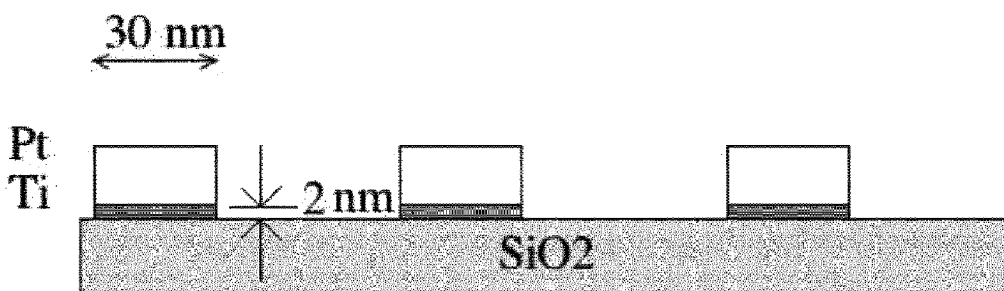
PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2006/046697 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 27/62 (2006.01) G01N 1/28 (2006.01)  
G01N 1/10 (2006.01) G01N 27/64 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/019900
- (22) 国際出願日: 2005年10月28日 (28.10.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2004-315699  
2004年10月29日 (29.10.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 本田 亜希 (HONDA, Aki) [JP/JP]; 〒2230062 神奈川県横浜市港北区日吉本町3-16-11 ル・グランヴェール I I A 2 0 2 Kanagawa (JP). 鈴木 孝治 (SUZUKI, Koji) [JP/JP]; 〒2200012 神奈川県横浜市西区みなとみらい4-10-3-W2 7 0 6 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 谷川 英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SUBSTRATE FOR MALDI-TOF MS AND MASS SPECTROMETRY METHOD USING THE SAME

(54) 発明の名称: MALDI-TOF MS用基板及びそれを用いた質量分析方法



(57) Abstract: A substrate for MALDI-TOF MS whereby even a high-molecular weight substance such as a protein or a nucleic acid can be analyzed by mass spectrometry at a high reproducibility and a mass spectrum can be easily obtained; and a mass spectrometry method by MALDI-TOF MS by using the same. This substrate for MALDI-TOF MS has a nanodot region for adhering a test substance thereto the surface of which is made of a material having a high protein or nucleic acid absorptivity. A mass spectrometry method for analyzing a protein or a nucleic acid which comprises using this substrate and performing mass spectrometry by MALDI-TOF MS with the use of the nucleic acid or the protein as a test sample.

(57) 要約: タンパク質や核酸のような高分子物質であっても、再現性良く質量分析を行うことができ、また、質量スペクトルが得られやすい、MALDI-TOF MS用基板及びそれを用いたMALDI-TOF MSによる質量分析方法が開示されている。MALDI-TOF MS用基板は、表面が核酸又はタンパク質に対して易吸着性の物質から成る、被検物質を付着させるナノドット領域を具備する。核酸又はタンパク質の質量分析方法は、この基板を用い、核酸又はタンパク質を被検試料としてMALDI-TOF MSにより質量分析を行なう。



WO 2006/046697 A1

## 明 細 書

## MALDI-TOF MS用基板及びそれを用いた質量分析方法

## 技術分野

[0001] 本発明は、MALDI-TOF MS用基板及びそれを用いた質量分析方法に関する。

## 背景技術

[0002] MALDI-TOF MS(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析)は、生体高分子等の質量分析に広く用いられている方法である。MALDIは、被検試料とマトリックス(レーザー光を吸収する化合物)を混合し、数ナノ秒という短時間のレーザー光を照射することにより被検試料をイオン化する手法であり、タンパク質、多糖類、脂質などの幅広い生体関連物質をほとんど分解しない緩和な条件でイオン化する特徴を有する。TOF MSは、イオン化した試料を高電圧の電極間で加速し、高真空無電場領域のフライトチューブと呼ばれる管中へ導入して等速度飛行させ、一定距離を飛行するのに要する時間を測定して質量を算出する手法である。原理的には質量が大きい場合でも、測定条件としては時間が長くなるだけで理論上の測定限界がないので、高分子に適した質量分析手法である。

[0003] 従来、MALDI-TOF MS用の基板としては、金や自己組織化膜などの皮膜をコーティングしたアルミニウム基板が用いられている。しかしながら、従来のMALDI-TOF MS用基板を用いてタンパク質やDNAの質量分析を行なうと、再現性が悪く、高分子量の被検物質についてはスペクトルが得られにくいという問題がある。特に、DNAではこの傾向が顕著であり、これまでDNAの解析にMALDI-TOF MSが有効に用いられた例は少ない。

[0004] 特許文献1:特開2001-13110号公報

特許文献2:特開2004-266100号公報

特許文献3:米国特許6,743,607B2

特許文献4:米国特許6,693,187B1

特許文献5:米国特許公開公報2003/0220254A1

非特許文献1:Koomen, J. et al., Anal. Chem., 72: 3860 (2000)

非特許文献2:Vorm, O. et al., Anal. Chem., 66: 3287 (1994)

非特許文献3:Berggren, W. T., et al., Anal. Chem., 74: 1745 (2002)

非特許文献4:Papac, D. I. et al., Anal. Chem., 68: 3215 (1996)

非特許文献5:Hung, K. C. et al., Anal. Chem., 70: 3088 (1998)

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の目的は、タンパク質や核酸のような高分子物質であっても、再現性良く質量分析を行うことができ、また、質量スペクトルが得られやすい、MALDI-TOF MS用基板及びそれを用いたMALDI-TOF MSによる質量分析方法を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0006] 本願発明者らは、鋭意研究の結果、表面が核酸又はタンパク質に対して易吸着性の物質から成る、被検物質を付着させる微小なナドット領域(以下、「被検物質付着領域」)をMALDI-TOF MS用基板に設け、被検物質を前記ナドット領域に付着させてMALDI-TOF MSを行なうことにより、タンパク質や核酸のような高分子物質であっても、再現性良く質量分析を行うことができ、また、質量スペクトルが得られやすくなることを見出し、本発明を完成した。

[0007] すなわち、本発明は、表面が核酸又はタンパク質に対して易吸着性の物質から成る、被検物質を付着させるナドット領域を具備するMALDI-TOF MS用基板を提供する。また、本発明は、上記本発明の基板を用い、核酸又はタンパク質を被検試料としてMALDI-TOF MSにより質量分析を行なう、核酸又はタンパク質の質量分析方法を提供する。

### 発明の効果

[0008] 本発明により、タンパク質や核酸のような高分子物質であっても、再現性良く質量分析を行うことができ、また、質量スペクトルが得られやすい、MALDI-TOF MS用基板及びそれを用いたMALDI-TOF MSによる質量分析方法が提供された。本発明の基板を用いることにより、被検物質がタンパク質や核酸であっても、測定結果が再現

性良く得られ、また、質量スペクトルも得られやすく、かつ、ピークも明瞭になるので、正確な測定が可能となる。従って、本発明は、タンパク質や核酸等の生体関連物質の質量分析に大いに貢献するものと期待される。

#### 図面の簡単な説明

[0009] [図1]本発明の実施例で作製した、ナノドット領域を有するMALDI-TOF MS用基板の模式断面図である。

[図2]本発明の実施例で作製した、ナノドット領域を有するMALDI-TOF MS用基板における各スポットの特定方法を説明する模式平面図である。

[図3]本発明の実施例で行った、本発明の基板を用いて、MALDI-TOF MSによりDNA混合物を質量分析して得られた質量スペクトル(上段)及び市販の基板を用いて得られた質量スペクトル(下段)を示す図である。

[図4]本発明の実施例で行った、本発明の基板を用いて、MALDI-TOF MSによりDNA混合物を質量分析して質量スペクトルが得られた確率(スポットA1～E4)及び市販の基板を用いて質量スペクトルが得られた確率(左端)を示す図である。

[図5]本発明の実施例で行った、本発明の基板を用いて40-merのポリCから成るDNAを質量分析して得られた質量スペクトル(上段)及び市販の基板を用いて得られた質量スペクトル(下段)を示す図である。

[図6]本発明の実施例で行った、24-mer DNAを内部標準とし、23-mer DNAの濃度を振って、本発明の基板又は市販の基板を用いてMALDI-TOF MSを行い、得られた質量スペクトルのピーク面積の比を取って描いた検量線を示す。

[図7]本発明の実施例で行った、ナノドット領域を白金、金又はチタンで形成した本発明の基板を用いて、MALDI-TOF MSによりDNA混合物を質量分析して質量スペクトルが得られた確率(%)並びに比較対照であるナノドット領域を形成しないSiO<sub>2</sub>基板及び市販の基板を用いた場合の確率を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

[0010] 上記の通り、本発明のMALDI-TOF MS用基板は、表面が核酸又はタンパク質に対して易吸着性の物質から成る、被検物質を付着させるナノドット領域を具備する。ナノドット領域は、少なくともその表面が、核酸又はタンパク質に対して易吸着性の物質(

以下、単に「易吸着性物質」)から成る。易吸着性物質としては、例えば金、白金、銀、銅、鉄等のような、アルカリ金属及びアルカリ土類金属以外の金属(それらの間の合金でもよい)、並びにポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン等の疎水性ポリマーを挙げることができる。これらのうち、加工工程や測定時において熱的及び化学的に安定な、金、白金及びチタンが好ましい。なお、被検物質付着領域は、その表面が易吸着性物質で構成されておればよく、下層は異なる物質で形成されていてもよい。例えば、基板との密着性を高める接着層等を介在させてもよい。下記実施例では、白金や金が易吸着性物質として用いられているが、シリコン酸化膜の表面に、チタン層を介して白金層又は金層を形成している。

[0011] 本発明のMALDI-TOF MS用基板では、被検物質が付着される領域(以下、「被検物質付着領域」ということがある)が、上記易吸着性物質から成るナドット領域である。ここで、「ナドット領域」とは、直径が $1\ \mu\text{m}$ 未満、好ましくは $10\text{nm}\sim 150\text{nm}$ 程度、さらに好ましくは $20\text{nm}\sim 40\text{nm}$ 程度の微小領域を意味する。なお、ナドット領域の形状は円形に限られず、三角形、正方形、長方形、五角形、六角形、八角形などの多角形や楕円等、他の形状でもよい。円形以外の場合には、長径又は最も長い辺が上記の大きさであれば本願発明でいう「ナドット領域」に包含される。もっとも、短径又は最も短い辺も上記範囲に含まれるものが好ましい。製造の容易さから円形が特に好ましい。

[0012] 本発明において、被検物質付着領域がナドット領域であることが重要な特徴である。上記のように、表面が金製のMALDI-TOF MS用基板は既に公知であり、市販もされている。そして、金は上記したとおり、本発明において好ましく用いられる易吸着性物質である。本願発明者らは、被検物質が付着される領域をナドット領域とすることにより、同一の易吸着性物質から形成された、ナドット領域を有さないMALDI-TOF MS用基板と比較してもタンパク質や核酸のような高分子物質を再現性良く質量分析を行うことができ、また、質量スペクトルが得られやすくなるという驚くべき知見を得、この知見に基づいて本願発明に到達したものである。なお、被検物質が付着される領域をナドット領域とすることにより、質量分析の再現性が向上し、質量スペクトルが得られやすくなるメカニズムは、よくわからないが、電子顕微鏡観察により、被検物

質の結晶状態が異なっていることを確認している。すなわち、被検物質が核酸のような線状ポリマーである場合、ナドット領域上では、針状の結晶が形成されるのに対し、ナドット領域を有さない公知の基板では、結晶が塊状になっており、本発明の基板を用いた場合の方が、被検物質がよく分散されて整然と結晶化されることがわかっている。

[0013] 被検物質付着領域をその表面に形成する基板の材質は特に限定されないが、核酸及びタンパク質に対して難吸着性(以下、単に「難吸着性」)の材質から成ることが好ましい。すなわち、本発明の好ましい一形態では、難吸着性の基板の上に、表面が易吸着性物質から成るナドット領域が形成される。難吸着性の材質の好ましい例としては、シリコン及びシリコン酸化物を挙げることができる。シリコン基板や、シリコン基板の表面にシリコン酸化物の皮膜を形成した基板は、微細加工技術が確立されており、後述する溝等を容易に形成することができるので、この点からも好ましい。ナドット領域を易吸着性物質で形成し、基板(すなわち、ナドット領域の周辺)を難吸着性材料で形成することにより、タンパク質や核酸のような高分子物質を再現性良く質量分析を行うことができ、また、質量スペクトルが得られやすくなるという本発明の効果がさらに向上する。そのメカニズムはよくわからないが、基板に添加された被検試料中の被検物質が、ナドット領域上に多かれ少なかれ集まり(ナドット領域は光学顕微鏡で見えないほど小さいので、後述のように、被検試料は、ナドット領域上のみ点着されるのではなく、ナドット領域を含むある程度大きな面積の領域に施されるので、ナドット領域以外の領域にも被検試料が施される)、これがナドット上の被検物質の結晶化に影響するものと推測される。

[0014] ナドット領域は、測定感度を高めるために、1枚の基板の上に、通常、複数形成される。ナドット領域を複数形成する場合に、その配列の周期(複数のナドット領域の中心間の距離)は、特に限定されないが、周期を小さくすることにより高密度化が可能である。このため、周期は、1000nm以下が好ましく、さらには600nm以下が好ましい。なお、複数のナドット領域は、互いに分離しているため、周期の下限は、ナドット領域の直径よりも必然的に大きく、好ましくは、ナドット領域の直径の2倍以上である。なお、ナドット領域を複数形成する場合、各ナドット領域を構成する易吸着性物

質は同一の物質にすることが製造上簡便で好ましいが、異なる易吸着性物質から形成されたナドット領域を組み合わせることも可能である。

- [0015] 一群のナドット領域を、1つのグループとし、1グループのナドット領域を、基板に形成した溝で囲まれる領域内に形成し、このようなグループ(スポット)を複数形成してもよい。このように、ナドット領域がグループ化されていると、例えば、各グループ内では同一の被検試料を測定し、異なるグループでは被検試料を異ならしめる等、実験の操作上、便利に使用することができる。スポットに滴下した被検試料は、スポットを規定する溝よりも外には流れて行かないので、スポット間での被検試料の混合が防止される。このようなスポットのサイズは、何ら限定されないが、通常、直径が0.5mm～5mm程度である。
- [0016] ナドット領域は、基板上に公知の方法により形成することができる。例えば、易吸着性物質が金属の場合には、フォトレジストや電子線レジストを用いた真空蒸着等により容易に形成することができる。真空蒸着としては、均一な膜を作製し易い電子ビーム(EB)蒸着が好ましい。EB蒸着を用いた、表面が白金から成る被検物質付着領域の作製方法が下記実施例に具体的に記載されている。
- [0017] 本発明のMALDI-TOF MSによる質量分析方法は、上記本発明の基板を用い、上記被検物質付着領域上に被検試料とマトリックスとの混合物を付着させて測定に供することを除き、従来のMALDI-TOF MSと全く同様に行うことができ、具体的な方法の一例が下記実施例に記載されている。なお、本発明の基板では、被検物質付着領域がナドット領域であるが、ナドット領域は、光学顕微鏡で見えない小さなものであるため、ナドット領域上にもみ選択的に被検試料を点着することは困難であり、ナドット領域を含むより広い領域一帯に被検試料が施される。このため、被検試料は、ナドット領域以外の領域にも施される。基板に施す被検試料の量は、特に限定されないが、通常、0.5～5 $\mu$ L程度、特に1～2 $\mu$ L程度である。また、被検試料中の被検物質(質量分析する核酸やタンパク質等)の濃度は、特に限定されないが、通常、0.1 $\mu$ M～100 $\mu$ M程度、好ましくは、1 $\mu$ M～50 $\mu$ M程度である。
- [0018] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

## 実施例 1

### [0019] 白金ナドット領域を具備する基板の作製

直径2インチのシリコン基板の表面に厚さ1  $\mu\text{m}$ の熱酸化膜が形成された基板の上に、図1に模式的に示すナドット領域を、電子線レジストを用いるEB蒸着により形成した。下層のチタン層は、厚さ2nm、直径30nm、上層の白金層は、厚さ50nm、直径30nmであった。各ナドット領域の周期(縦方向及び横方向とも)は60nm、90nm又は120nmであり、各ナドット領域は、シリコン酸化膜内に形成された、直径2.4~2.5 $\mu\text{m}$ 、幅100  $\mu\text{m}$ 、深さ190nm又は250nmのリング状の溝により囲まれた領域(スポット)内に形成してグループ化した。

[0020] 以上は、具体的には下記工程により行なった。すなわち、まず、下層レジストとして、電子線ポジ型レジストZEP520(日本ゼオン製)をスピコートし(膜厚:50nm)、オープン中、165°C、30分間プリベークした。次に、上層レジストとして、20%フラーレン(C60/70)添加ZEP520レジスト(日本ゼオン製)をスピコートし(膜厚:40nm)、オープン中、165°C、30分間プリベークした。EB描画装置JBX9300FS(日本電子製)100 kV, 7 nA(ビーム径:約20nm)を用いて、ナドット領域を形成する部分にEBを照射した。現像液ZED-N50(日本ゼオン製)に60秒間浸漬して現像した。次に、市販のEB蒸着装置を用いたEB蒸着により、厚さ2nmのチタン層、その上に厚さ50nmの白金層を被着した。Shifley Remover 1165(商品名)に浸漬してレジストを現像し、基板上に、チタン層に白金層が積層されて成るナドット領域のみを残留させた。次に、シリコン酸化膜内に、リング状の溝を形成し、先に形成したナドット領域の各グループを、各リング状の溝で囲んだ。これは具体的には次のようにして行なった。電子線レジストであるZEPレジスト(日本ゼオン製)をスピコートし(膜厚:250 nm)、オープン中、165°C、30分間プリベークした。EB描画装置JBX9300FS(日本電子製)100 kV, 7nA(ビーム径:約20nm)を用いて、リング状溝を形成する部分にEBを照射した。現像液ZED-N50(日本ゼオン製)に120秒間浸漬して現像した。次に、反応性イオンエッチング装置10-NR(Samco社製)を用い、 $\text{CHF}_3$ ガス反応性イオンエッチング(RIE, Reactive Ion Etching)を、出力100 W、ガス圧0.8 Paで行なった。次いでUV/ $\text{O}_3$ 処理によりレジストを除去した。



[0021] なお、各リング状溝で囲まれたスポットは、図2に示すように、上下方向(基板の直線部分を左にして)に1,2,3,4、左右方向にA,B,C,D,Eを付して識別する(例えば、A1、C3のように場所を特定)。なお、作製のばらつきが生じる可能性があるため、各スポット内のナドットの描画の際の露光量を1-10に変えたものを作製した。

[0022] 走査電子顕微鏡で観察したところ、60nm周期及び120nm周期で形成したナドット領域において、露光量が多すぎた各2個のスポットではナドット領域以外の部分にメタル残りが観察されたが、これら以外のスポットでは、所望のナドット領域のみが基板上に残留しており、本発明の基板が得られた。

## 実施例 2

[0023] DNAのMALDI-TOF MS

下記の塩基配列を有する3種類のDNA(各16-mer(merは塩基数を示す)、19-mer、24-mer、分子量:各4893.16, 5815.67, 6713.28)を被検物質とし、マトリックスに3-HPA(3-ヒドロキシピコリン酸)を用い、実施例1で作製した基板のナドット領域上に被検物質とマトリックスの混合物を点着した。

5'-act tct gtg ttt agg t-3'

5'-act tct gtg ttt agg tgt c-3'

5'-act tct gtg ttt agg tgt ctc tca-3'

[0024] この操作は具体的に次のようにして行なった。DNAはMilliQ水を用いてそれぞれ5 pmol/ $\mu$ lの混合溶液とした。3HPAは10 mg/mlに50%アセトニトリル50%水(0.1%TFA)に溶解したものをを用いた。試料溶液1  $\mu$ lと3HPA溶液1  $\mu$ を基板上に滴下して混合し風乾した。基板を装置装填用のアダプターに装着した。これをMALDI-TOF MS装置(ブルカーダルトニクス社製)に装填し、装置の指示書に記載された通りにMALDI-TOF MSを行い、質量スペクトルのチャートを描いた。一方、比較のため、ナドット領域を形成することなく、リング状の溝を形成したシリコン基板、及び市販のMALDI-TOF MS用基板(アルミニウム基板に皮膜を形成したもの)にも同様に試料を点着し、同様にしてMALDI-TOF MSを行なった。結果を図3に示す。

[0025] 図3中、上段のチャートは、実施例1で作製した本発明の基板を用いて得られた質量スペクトル、下段のチャートは、市販のMALDI-TOF MS基板を用いて得られた質

量スペクトルを示す。図3からわかるように、本発明の基板を用いた場合には、市販の基板を用いた場合に比べ、各オリゴヌクレオチドのピークがより明瞭に現れ、測定された質量もより正確であった。なお、ナドット領域を形成することなく、リング状の溝を形成したシリコン基板を用いた場合には、いずれのスポットにおいても有効なスペクトルは得られなかった。

### 実施例 3

#### [0026] MALDI-TOF MSの再現性

実施例2と同じDNA試料を用いて、実施例2と同様にMALDI-TOF MSを行い、再現性の評価を行った。サンプルスポットからランダムに60個所を選び、レーザー照射をしたときにマススペクトルが得られた確率を図4に示した。S/N比が5以上、解像度(m/差分m)が250以上、シグナル強度が300以上のものをシグナルとして、N = 3で標準偏差を算出した。

[0027] A1～E1が60 nm周期、A2～E2が90 nm周期、A3～E4が120 nm周期のドットパターンである。同じ周期で異なるナンバリングはナドットプレートの作製段階で露光量の違いから生じるドットサイズの差異である。横軸の一番左側が市販の基板を用いた場合の結果を示し、スペクトルが得られる確率は約15%に過ぎない。横軸の一番左側以外は、本発明の基板の各スポットについての結果を示す。いずれのスポットでも、市販の基板よりははるかに確率が高く、本発明の基板を用いることにより、高い再現性を持って測定できることがわかる。

### 実施例 4

#### [0028] 高分子量DNAのMALDI-TOF MS

ポリCのDNA40-mer及び50-mer (M.W. 11520, 14412)について、実施例2と同様にMALDI-TOF MSを行い、長鎖のDNAでの検出限界を検索した。結果を図5に示す。

[0029] 図5の上段は、実施例1で作製した本発明の基板を用いて得られた、40-merのDNAについての質量スペクトル、下段は、市販の基板を用いて得られた、40-merのDNAについての質量スペクトルを示す。図5から明らかなように、本発明の基板を用いた40-mer DNAの測定ではS/N比及び検出感度の上昇に成功した。

### 実施例 5

[0030] 濃度とピーク比の関係の直線性

24-mer DNAを内部標準とし、23-mer DNAの濃度を振って、実施例2と同様にMALDI-TOF MSを行い、得られた質量スペクトルのピーク面積の比を取った。検量線は3回の平均値を取ったものである。比較のため、市販のMALDI-TOF MS用基板を用いて同じ操作を行なった。結果を図6に示す。

[0031] 図6からわかるように、市販の基板を用いた場合直線性があるが、本発明の基板を用いた場合でも相関性が失われていないことが明らかになった。

### 実施例 6

[0032] 金ナドット領域を具備する基板の作製

実施例1において、白金に代えて金を用いたことを除き、実施例1と同様な操作により、金ナドット領域を具備する基板を作製した。ただし、ナドット領域の周期は、60nm、90nm、120nmに加え、さらに240nm、480nm、1000nmのものも作製した。

### 実施例 7

[0033] チタンナドット領域を具備する基板の作製

実施例1において、チタン層の厚さを50nmとし、チタン層の上には白金を被着しなかったことを除き、実施例1と同様な操作により、チタンナドット領域を具備する基板を作製した。ただし、ナドット領域の周期は、60nm、90nm、120nmに加え、さらに240nm、480nm、1000nmのものも作製した。

### 実施例 8

[0034] 白金ナドット領域を具備する基板の作製(その2)

実施例1と同じ方法により白金ナドット領域を具備する基板を作製した。ただし、ナドット領域の周期は、60nm、90nm、120nmに加え、さらに240nm、480nm、1000nmのものも作製した。

### 実施例 9

[0035] 実施例6～8で作製した基板の性能を実施例3と同様にしてマススペクトルが得られる確率(シグナル獲得確率)を測定した。ただし、DNAの濃度を20  $\mu$  Mとし、マトリックス溶液の組成は、30%アセトニトリル(0.1 % TFA含有)中に50mg/mlの3-HPAと5mg/m

1 クエン酸2アンモニウムを含むものを用いた。

[0036] 結果を図7に示す。図7に示されるように、ナノドット領域を白金、金、チタンのいずれで形成した場合でも、比較対照であるドットなしSiO<sub>2</sub>基板や、市販の及び市販のMALDI-TOF MS用基板(アルミニウム基板に皮膜を形成したもの)に比べて、シグナル獲得確率が明らかに高くなった。また、ナノドットの周期については、60nm~1000nmの範囲にわたって全て比較対照の基板を用いた場合よりもシグナル獲得確率が明らかに高くなった。

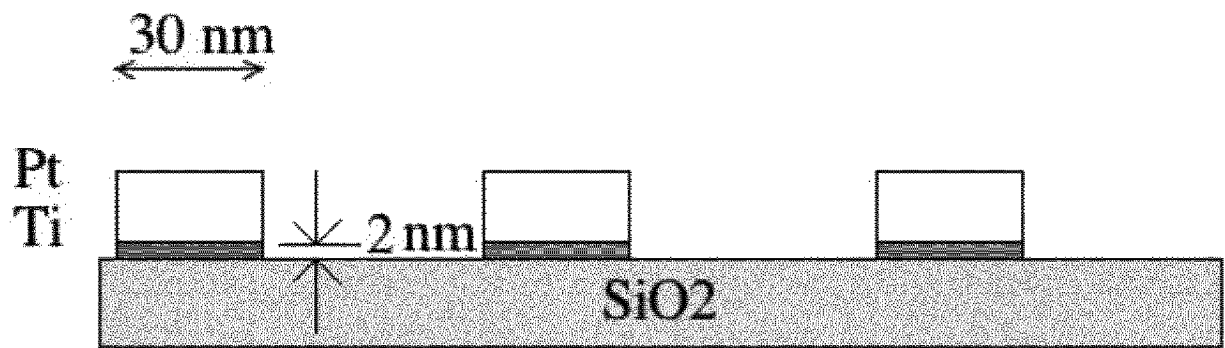
#### 産業上の利用可能性

[0037] 本発明のMALDI-TOF MS基板は、タンパク質や核酸のような高分子物質であっても、再現性良く質量分析を行うことができ、また、質量スペクトルが得られやすい。このため、本発明の基板を用いることにより、被検物質がタンパク質や核酸であっても、測定結果が再現性良く得られ、また、質量スペクトルも得られやすく、かつ、ピークも明瞭になるので、正確な測定が可能となる。従って、本発明は、タンパク質や核酸等の生体関連物質の質量分析に有用である。

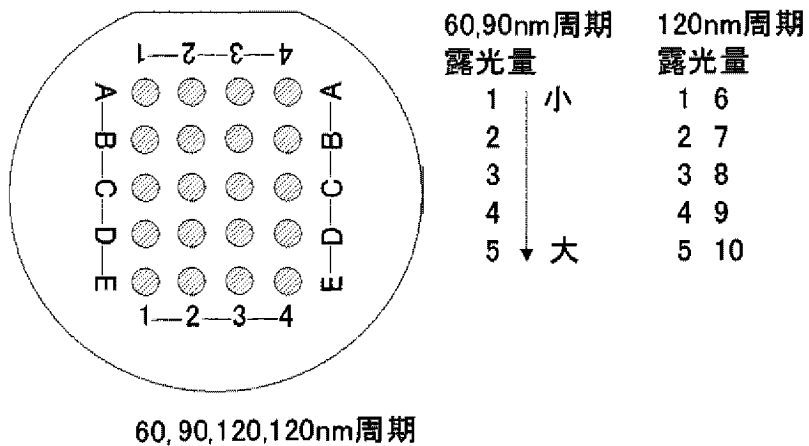
## 請求の範囲

- [1] 表面が核酸又はタンパク質に対して易吸着性の物質から成る、被検物質を付着させるナドット領域を具備するMALDI-TOF MS用基板。
- [2] 前記ナドット領域が、基板上に複数形成されている請求項1記載の基板。
- [3] 核酸又はタンパク質に対して易吸着性の前記物質が、アルカリ金属及びアルカリ土類金属以外の金属である請求項1又は2記載の基板。
- [4] アルカリ金属及びアルカリ土類金属以外の前記金属が、白金、金又はチタンである請求項2記載の基板。
- [5] アルカリ金属及びアルカリ土類金属以外の前記金属が、白金又は金である請求項4記載の基板。
- [6] 核酸又はタンパク質に対して難吸着性の物質から成る基板上に、上記ナドット領域が形成されている請求項1ないし5のいずれか1項に記載の基板。
- [7] 前記基板の少なくとも表面が、シリコン又はシリコン酸化物から成る請求項6記載の基板。
- [8] 請求項1ないし7のいずれか1項に記載の基板を用い、核酸又はタンパク質を被検試料としてMALDI-TOF MSにより質量分析を行なう、核酸又はタンパク質の質量分析方法。
- [9] 被検試料は、上記ナドット領域及び上記ナドット領域以外の領域に施される請求項8記載の方法。

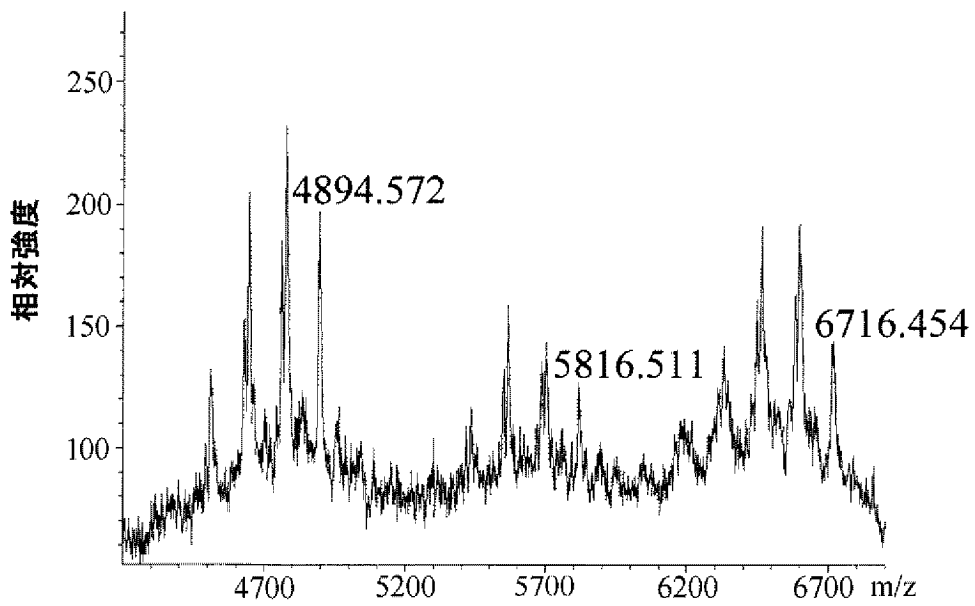
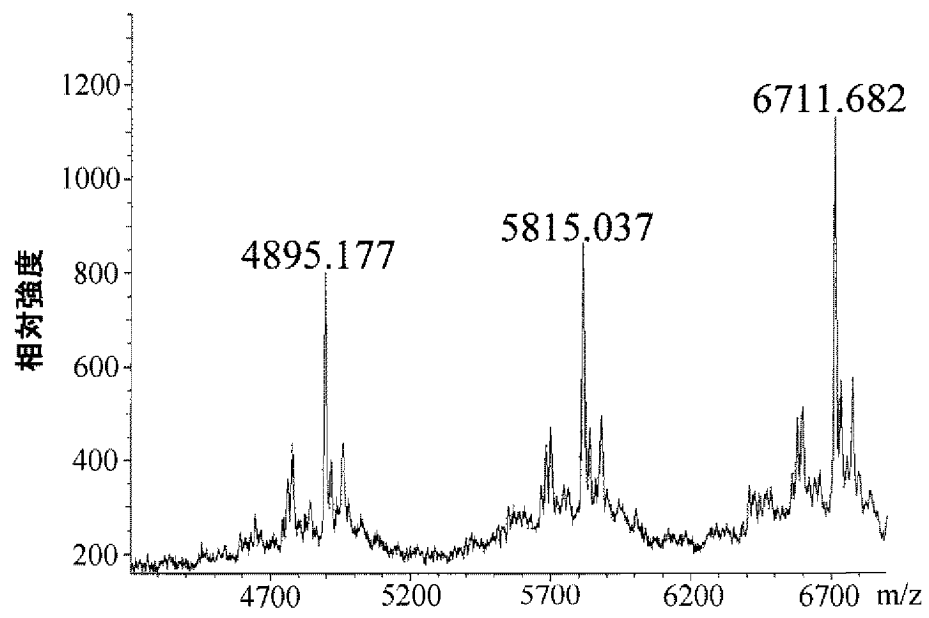
[図1]



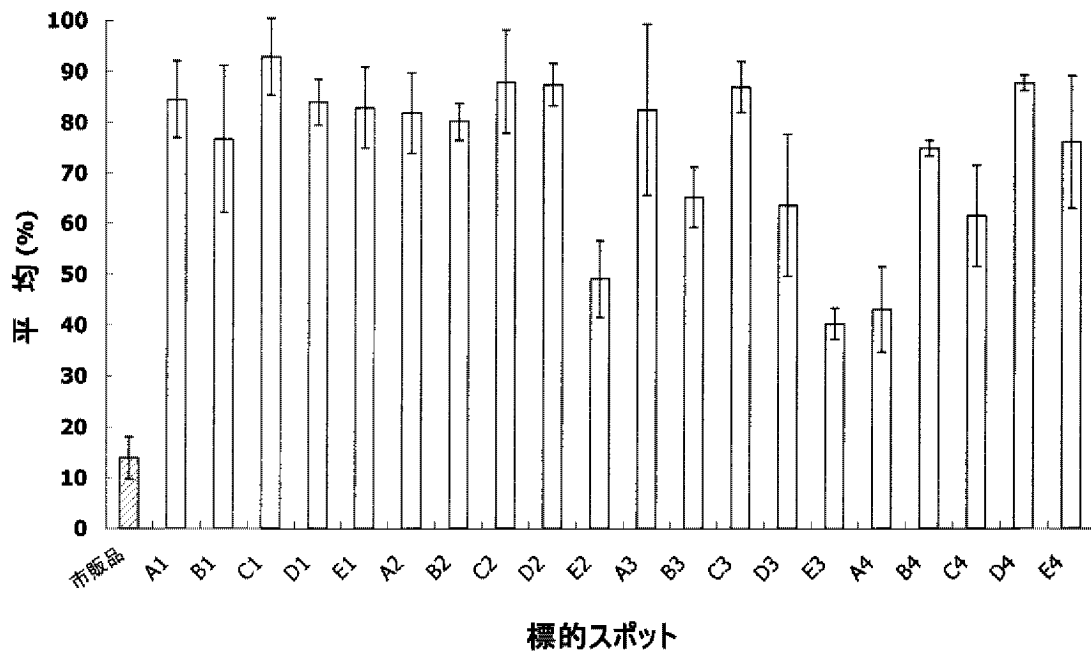
[図2]



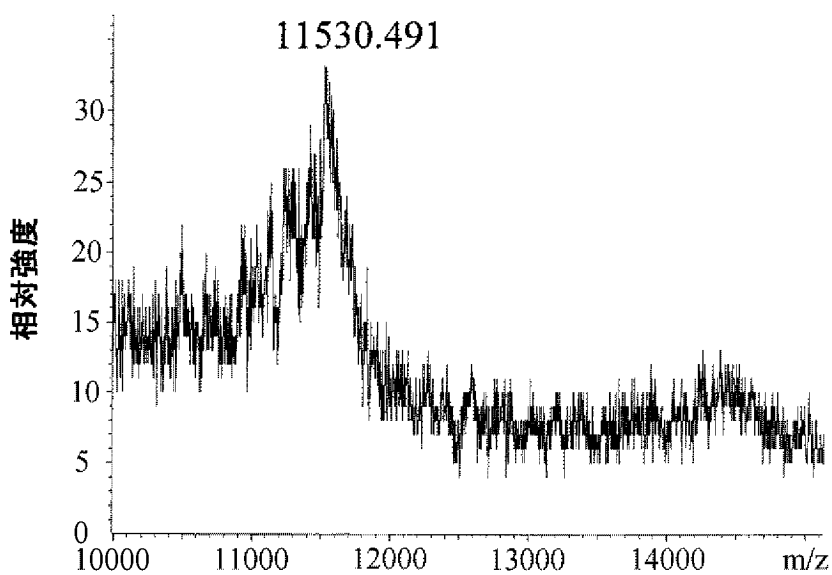
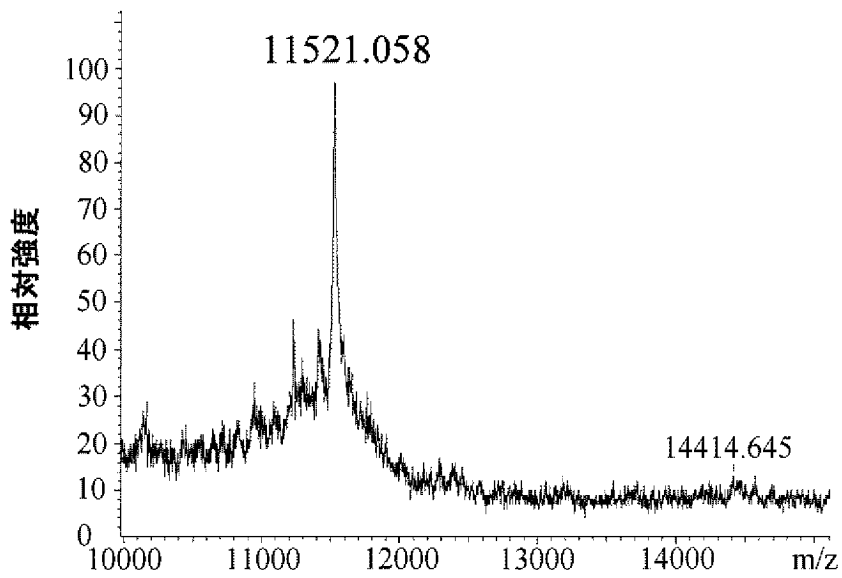
[図3]



[図4]

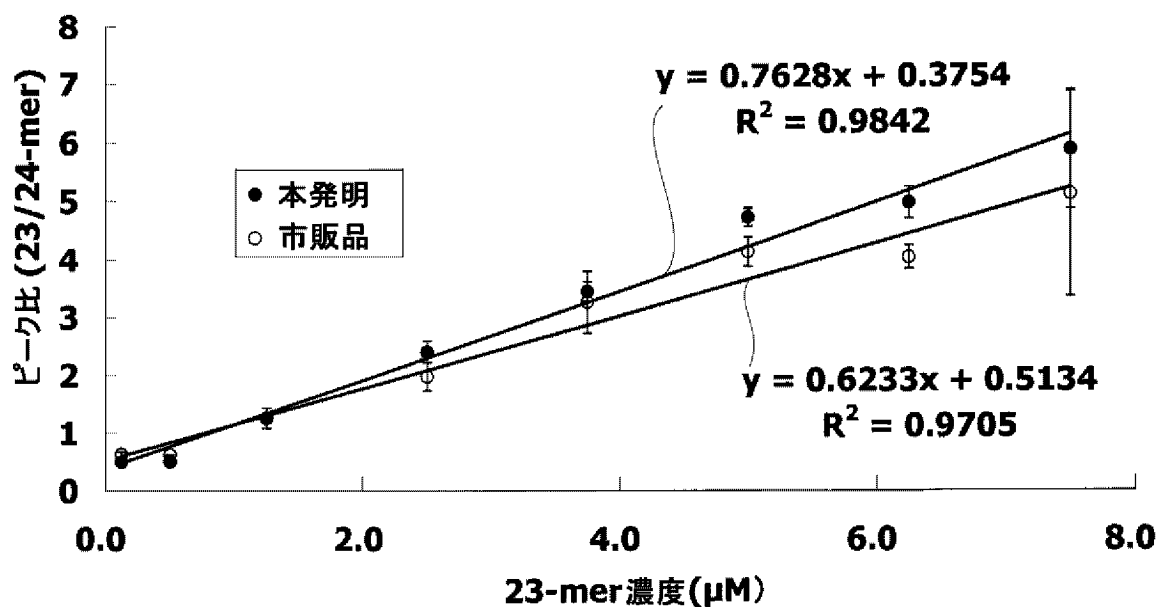


[図5]

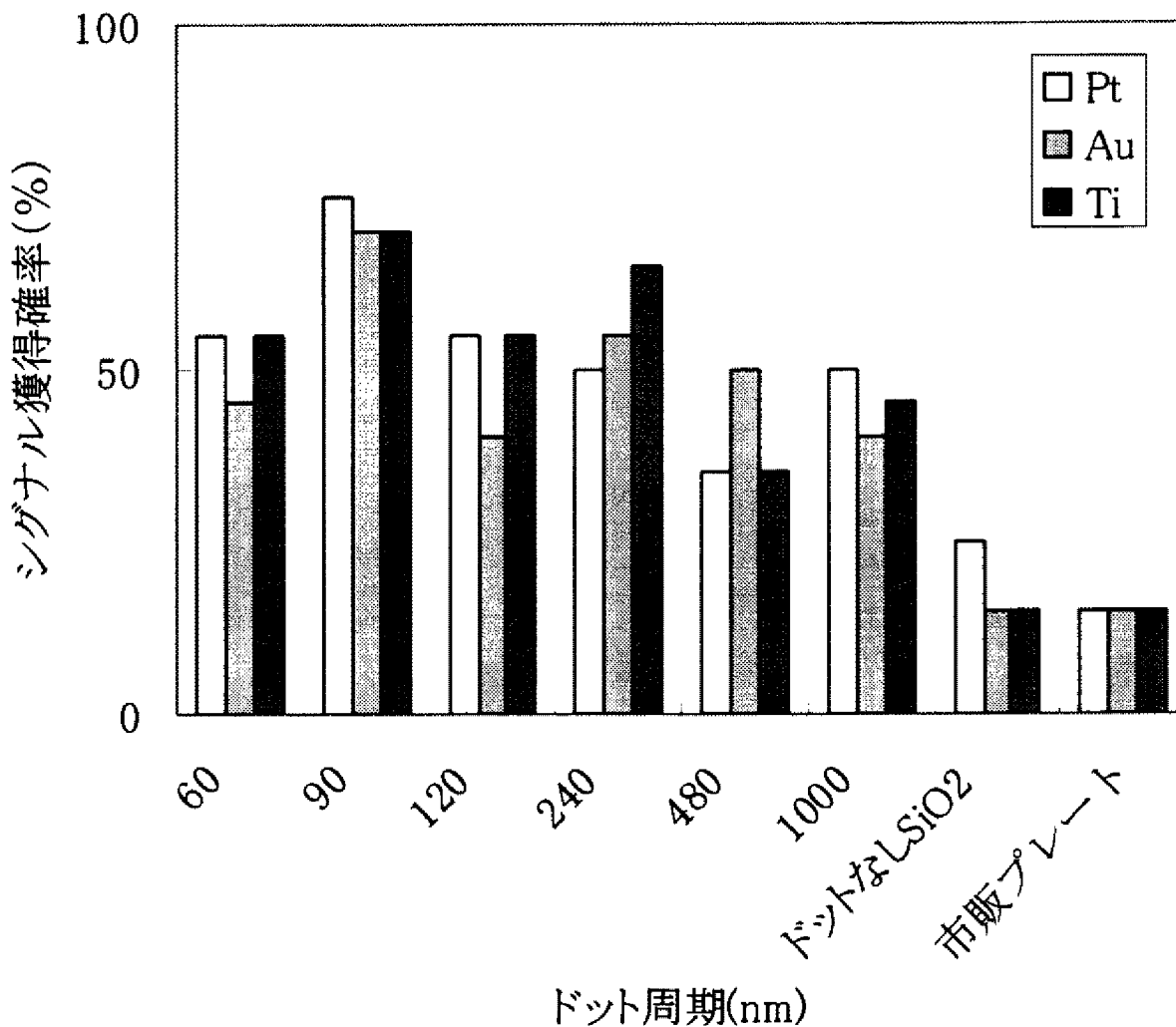




[図6]



[図7]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/019900

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

**G01N27/62**(2006.01), **G01N1/10**(2006.01), **G01N1/28**(2006.01), **G01N27/64**(2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N27/62-G01N27/70, H01J49/00-H01J49/48, G01N1/00-G01N1/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JSTPlus (JOIS)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X <u>A</u>	Martin Schuerenberg et. al., "Prestructured MALDI-MS Sample Supports", Analytical Chemistry, Vol.72, No.15, 01 August, 2000 (01.08.00), pages 3436 to 3442	1-6, 8, 9 <u>7</u>
X	JP 2004-184137 A (NEC Corp.), 02 July, 2004 (02.07.04), Par. Nos. [0034], [0042] to [0048]; Fig. 3 & WO 2004/051253 A1	1-9
X <u>A</u>	JP 2004-125785 A (National Food Research Institute), 22 April, 2004 (22.04.04), Par. Nos. [0105] to [0120] & US 2004/0209294 A1	1, 2, 8, 9 <u>3-7</u>

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
12 January, 2006 (12.01.06)

Date of mailing of the international search report  
24 January, 2006 (24.01.06)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/019900

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-247983 A (Nippon Reza Denshi Kabushiki Kaisha), 05 September, 2003 (05.09.03), Par. No. [0019]; Fig. 9 (Family: none)	1-9

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))                  Int.Cl. G01N27/62(2006.01), G01N1/10(2006.01), G01N1/28(2006.01), G01N27/64(2006.01)</p>												
<p>B. 調査を行った分野                  調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))                  Int.Cl. G01N27/62-G01N27/70, H01J49/00-H01J49/48, G01N1/00-G01N1/44</p>												
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2006年	日本国実用新案登録公報	1996-2006年	日本国登録実用新案公報	1994-2006年		
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2006年											
日本国実用新案登録公報	1996-2006年											
日本国登録実用新案公報	1994-2006年											
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)                  JSTPlus(JOIS)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X A</td> <td>Martin Schuerenberg, et. al., "Prestructured MALDI-MS Sample Supports", Analytical Chemistry, Vol. 72, No. 15, 2000. 08. 01, pp. 3436-3442</td> <td>1-6, 8, 9 7</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2004-184137 A (日本電気株式会社) 2004. 07. 02, 【0034】, 【0042】 - 【0048】, 図 3 &amp; WO 2004/051253 A1</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	X A	Martin Schuerenberg, et. al., "Prestructured MALDI-MS Sample Supports", Analytical Chemistry, Vol. 72, No. 15, 2000. 08. 01, pp. 3436-3442	1-6, 8, 9 7	X	JP 2004-184137 A (日本電気株式会社) 2004. 07. 02, 【0034】, 【0042】 - 【0048】, 図 3 & WO 2004/051253 A1	1-9	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号										
X A	Martin Schuerenberg, et. al., "Prestructured MALDI-MS Sample Supports", Analytical Chemistry, Vol. 72, No. 15, 2000. 08. 01, pp. 3436-3442	1-6, 8, 9 7										
X	JP 2004-184137 A (日本電気株式会社) 2004. 07. 02, 【0034】, 【0042】 - 【0048】, 図 3 & WO 2004/051253 A1	1-9										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの											
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの											
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの											
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献											
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願												
<p>国際調査を完了した日                  12. 01. 2006</p>	<p>国際調査報告の発送日                  24. 01. 2006</p>											
<p>国際調査機関の名称及びあて先                  日本国特許庁 (ISA/J P)                  郵便番号100-8915                  東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)                  高場 正光                  電話番号 03-3581-1101 内線 3292</p>	<p>2W 3311</p>										

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	JP 2004-125785 A (独立行政法人食品総合研究所) 2004. 04. 22, 【0105】 - 【0120】 & US 2004/0209294 A1	1, 2, 8, 9 <u>3-7</u>
A	JP 2003-247983 A (日本レーザ電子株式会社) 2003. 09. 05, 【0019】, 図 9 (ファミリーなし)	1-9