キャピラリープローブとナノ体積液体を活用した 走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法の開発

Development of Scanning Probe Electrospray Ionization Utilizing Capillary Probe and Nano-Volume Liquid

大塚洋一

Yoichi OTSUKA

大阪大学大学院理学研究科化学専攻 Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University

(Received November 25, 2019; Accepted November 29, 2019)

1. はじめに

細胞の大きさは、直径は数十 μm 、体積は数 pL で、内包する分子群の濃度範囲は nM から mM と幅広い¹⁾。分子量や化学的構造が異なる多彩な分子同士が相互作用しながら、代謝反応が進み、細胞の健康状態によって分子種のバランスがダイナミックに変化する。この密に詰まった分子夾雑環境は未解明な点が多く、一例として分子相互作用に基づいた液-液相分離に伴う、非平衡化学反応の機構解明は近年注目されている²⁾。したがって、細胞やその集積構造体である組織を対象とした生命科学研究では、複雑な状態そのものを調べる方法がますます重要となると考えられる。

質量分析法を用いると、イオン化された多種多様な成分を網羅的に計測することができる。ソフトイオン化法の一つであるエレクトロスプレーイオン化法 (ESI: electrospray ionization)³⁾は、微小帯電液滴から気相イオンが生成される現象を活用する。分子溶液に高電場を与えると、溶液は電場方向に変形し、やがて円錐形のTaylorコーンが形成される。Taylorコーンの先端部分から対向する電極に向かって帯電液滴が放出される。この液滴は乾燥の過程でさらに分裂を繰り返しながら、最終的に気相分子イオンが生成される⁴⁾。分子溶液に高電圧を印加するというシンプルな方法で、巨大分子でもフラグメンテーションを起こすことなく気相イオンへと変換できるため、ESIはライフサイエンス分野の研究には欠かせない技術の一つとなっている。

ESIの重要かつ興味深い特徴は、帯電液滴の体積を減少すると、イオンの検出感度が逆に増加する、体積効果が生じる点にある。これは帯電液滴の表面電荷密度が、液滴半径の平方根の逆数に比例するためである。液滴の体積を小

さくすると、液滴中の分子密度に対する表面電荷密度が高まり、気相イオンへの変換効率が向上する⁵⁾。さらに、塩や界面活性剤などによるイオン化抑制が軽減される。実験的には、エミッターの開口径を小さくする ($\sim 100\ \mu\text{m}$ から、数 $\sim$ 数十 μm に変更する) こと、溶液の流量を小さくする (数百 nL/min $\sim$ 数 $\mu\text{L/min}$ に設定する) ことで実施することができる。この特徴を用いたイオン化法は、ESIと区別してnano ESIと呼ばれ、タンパク質複合体のイオン化などに利用されている^{6)~8)}。

ESIによる生体巨大分子のソフトイオン化に関する一連の研究は、Fenn博士の2002年ノーベル化学賞へと結実した⁹⁾。現在もESIの特徴を活用した質量分析技術の研究開発が進められ、広く応用されている。多彩な生体成分の質量分析を行う場合には、二種類の相補的な手法を用いることができる。

第一の手法は、生体成分を抽出・分離した後でESIを行う方法である。代表的技術である液体クロマトグラフィー-質量分析法 (LC/MS) を用いると、マトリックス効果 (共存成分によるイオン化抑制やイオン化促進を生じること) が軽減されるため、網羅的・定量的計測に有効となる。一方で、計測に要する時間が長いことや、試料成分の位置情報が失われるというデメリットもある。

第二の手法は、大気圧環境下で生体成分を直接的に抽出 (サンプリング)・イオン化する方法である。分離工程を省き、局所的に抽出した成分を直ぐにイオン化することで、位置情報に基づいたマススペクトルの計測や迅速分析を行うことができる。位置情報を担保したマススペクトルの計測は、生体組織中の疾患関連成分など、成分の二次元分布を捉えたい場合には特に有用である。試料の局所領域をイオン化し、そのマススペクトルを計測することを試料全体にわたって行い、計測後に特定の質量電荷比 (m/z) のイオンピークの強度の二次元分布を画像化する、質量分析イ

Fig. 1. タッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法の模式図

メージング (MSI: mass spectrometry imaging) によって、どこにどの分子が存在するかを表現することができる。

一方で、大気圧サンプリングイオン化法を生体組織に適用すると、混合成分が一斉にサンプリング・イオン化されるため、マトリックス効果とマススペクトルの定量評価には注意を払う必要がある。探針エレクトロスプレーイオン化法 (PESI: probe ESI) は数 pL の極微体積溶液の逐次イオン化を活用して、マトリックス効果を抑制できることが報告されている¹⁰⁾。また、ナノスプレー脱離エレクトロスプレーイオン化法 (Nano-DESI: nanospray desorption ESI) では、抽出用の溶媒中に内部標準を添加しておく方法が提案されている¹¹⁾。

これまでにさまざまな方式の大気圧サンプリングイオン化とそれらを用いた MSI が報告されてきた。誌面の都合から個々の技術の説明は割愛するが、脱離エレクトロスプレーイオン化法 (DESI: desorption ESI)¹²⁾、表面支援レーザー脱離イオン化法 (SALDI: surface-assisted laser desorption/ionization)^{13), 14)}、大気圧マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (AP-MALDI: atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization)¹⁵⁾ などに関する内容は、本質量分析学会誌の特集号 (Vol. 67, No. 4 (2019), Vol. 64, No. 1 (2016), Vol. 63, No. 6 (2015)), 総説^{16)~18)} をご参照いただきたい。

本稿では、タッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法¹⁹⁾ (t-SPESI: tapping-mode scanning probe ESI) に関する研究内容を紹介する。キャピラリプローブを介したナノ体積液体のマニピュレーションを活用することで、MSI や、「質量分析 + α 」の計測ができることを示す。

2. t-SPESI の基本原理

われわれはこれまでに、振動するシリカキャピラリプローブ (以降、プローブと記す) を用いて、帯電したナノ体積溶媒を試料表面に付与し、局所抽出と迅速イオン化を行う t-SPESI を開発してきた²⁰⁾。Fig. 1 に装置の模式図を示す。PEEK ティーに、プローブ、シリンジポンプと接続された PEEK チューブ、白金線がそれぞれ接続されており、シリンジポンプから送液された溶媒は、プローブの前段部分で高電圧 (3~5 kV) が印加される。プローブとして、市販の開口径 10 μm の nano-ESI 用シリカエミッタを使用する。プローブはピエゾアクチュエータ上に固定され、共振周波数付近の振動周波数で励振される。

プローブ先端部分が試料と断続的に接触するように、試料ステージの高さを調整すると、プローブが試料と接触したタイミングで両者の間に溶媒の液架橋が形成され、ここに試料成分が抽出される。次にプローブが試料から離れ、プローブと対向したイオン引き出し管に近接する間に ESI が生じる。高速カメラでプローブ端を観察した結果、液架橋が破断した後に 100~200 マイクロ秒経過すると、エレクトロスプレーが生成された。帯電液滴は、加熱されたイオン引き出し管を通過する間に乾燥し、生成した気相イオンが質量分析器に導入される。試料ステージを二次元方向に走査することで、計測位置に対するマススペクトルが計測される。

溶媒の流量は 100 nL/min 程度、プローブの振動周波数は、ピエゾアクチュエータからプローブ端までの長さを調整することで 200~1,000 Hz 程度の範囲で変化できる。したがって、プローブが試料に一回接触した時に試料表面に付与される溶媒量は、およそ 2~8 pL と見積もられる。他の大気圧サンプリングイオン化法と比較して、t-SPESI は抽出溶媒の体積を小さくできる点、抽出された成分を迅速に ESI に供することができる点が特徴であり、nano-ESI の体積効果のように高効率なイオン化が期待できる。これまでに、プローブの開口径を縮小することで、サンプリング領域の微小化とイオン化効率の向上が可能であることを示した²¹⁾。

3. 生体組織の質量分析イメージング

生体組織中の疾患関連物質の分布の可視化は、バイオメディカル分野への応用において重要である。次に、t-SPESI を用いたすい臓がん組織の MSI の結果を示す。免疫不全マウスのすい臓尾部にヒト由来すい臓がん細胞を移植し、悪性腫瘍を作製した。摘出されたすい臓組織の新鮮凍結切片をスライドガラス基板に乗せ、計測に用いた。溶媒には (水/エタノール/ギ酸 = 50/50/1, v/v) を利用し、正イオンモードでの計測を行った。

Fig. 2(a) に試料の光学顕微鏡による観察結果を示す。未処理の組織切片は透明であるため、隣接組織切片をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色し、細胞の形態を光学顕微鏡で観察することで、がん部 (I, Fig. 2(b) の赤色領域)・非がん部 (II, Fig. 2(b) の青色領域) を特定した。MSI の結果、がん部と非がん部のそれぞれに局在する分子が計測された。Fig. 2(c), (d) は m/z が 203.225, 146.175 のイオン強度分布であり、それぞれポリアミンの一種である

Fig. 2. マウス肝臓がん組織切片の質量分析イメージングの結果。(a) ガラス基板上的組織切片の光学顕微鏡像。(b) HE染色隣接組織切片から特定された、組織中の疾患領域の区分 (がん部 (赤色), 非がん部 (青色))。 (c-f) 特定の m/z のイオン強度像。(文献19より内容を変更して転載。)

スペルミンとスペルミジンとして推定された。また、がん部のマスマスペクトルの解析を行ったところ、一つの分子に複数のプロトンが付加した多価イオン ($[M+nH]^{n+}$) とみられるピーク群も計測された。多価イオンピークのデコンボリューション解析を行ったところ、分子量が4936.6 (Fig. 2(e)), 4963.6, 10090.6 (Fig. 2(f)), 11072.1 Daの4成分が算出された。過去の文献やデータベースと参照し、それぞれがタンパク質のthymosin beta 10 (Tβ10), thymosin beta 4 (Tβ4), calcyclin (S100-A6), calpactin I light chain (S100-A10) として推定された。上記の成分に加えて、がん部と非がん部に局在した分布を示す化学種が複数計測された²²⁾。

このように、t-SPESIを用いたMSIでは、がん領域への代謝物 (低分子) からタンパク質 (高分子) までの局在状態を可視化できることがわかった。がん領域のポリアミンとタンパク質の共局在は、細胞内夾雑環境におけるポリアミンの過剰産生状態と細胞のがん化に起因するタンパク質の蓄積を示唆すると考えられる。したがって、位置情報を担保した網羅的マスマスペクトルの計測は、細胞内で連鎖的に生じる代謝経路ネットワークを追跡するうえでも有用と考えられる。

4. 計測システムの高度化と「質量分析+α」への展開

t-SPESIの特徴は、振動するキャピラリプローブを用い

て、帯電微小体積液体のマニピュレーションを行う点にある。われわれは、プローブの変位情報を活用することで計測を安定化させる技術開発と、質量分析と異種情報を同時に計測するための計測システムの高度化も進めてきた。

4.1 プローブ走査の安定化技術とマルチモーダルイメージング

実際の生体組織切片は凹凸があり、振動するプローブがこの表面を走査すると、プローブ先端と試料表面の距離が変化し、両者の接触時間が変動する。これは液架橋の形成とESIの生成時間のばらつきを生じると考えられる。したがって、非平坦な試料上におけるプローブの振動安定化は重要である。プローブ先端から供給されるナノ体積液体を安定化することによって、サンプリング空間分解能の向上や、イオン化過程の均一化が実現し、定量的かつ高精細なMSIへの展開が期待できる。そこで、プローブ振動計測とフィードバック制御を組み合わせた計測システムを開発した。

Fig. 3(a) にプローブ振動計測とフィードバック制御のブロックダイアグラムを示す。黄色部分 (上部) がプローブ振動計測部を示す。プローブ上面に照射されたレーザー光の反射光の変位をフォトダイオードで検出する。フォトダイオードの出力信号は、差動アンプ回路とFPGA (field programmable gate array) に入力され、プローブの振動振幅が計測される。本方法は原子間力顕微鏡 (AFM: atomic force microscope) の光てこ方式を応用するものである。プローブの角度の変化に対して、反射光が大きく変位するため、微小な変位を高感度に計測することができる。t-SPESIのプローブはAFMのプローブよりも大きく変位する (~ 1 mm) ため、プローブとフォトダイオードの間にレンズを導入し、反射光の整形を行った。本方法を用いて、プローブの振動を計測した結果をFig. 3(b), (c) に示す。ピエゾアクチュエータへの入力電圧とプローブの振動振幅の相関 (Fig. 3(b)) が線形性を示し、振動振幅を任意の値に制御できることがわかった。また、プローブの励振周波数と振幅の相関 (Fig. 3(c)) より、プローブの共振周波数を正確に計測でき、共振点で励振を制御できることがわかった。

次に、Fig. 3(a) の緑色部分 (右下部) がフィードバック制御部を示す。プローブの振動振幅が参照信号に一致するように、リアルタイムOSを用いたPID制御を行う。出力信号は、高電圧アンプを経由して試料ステージ (ピエゾステージ) に入力される。この制御により、試料上をプローブが走査する間、試料ステージに垂直方向の位置が調整され、プローブの振動振幅が設定された値を維持する。また試料ステージに入力される信号は、試料の凹凸と対応するため、試料形状も同時に計測することができるようになる。

本システムを用いた、化学成分分布と試料形状のマルチモーダルイメージングの結果を示す。試料は、直径1 mmのマイクロウェルが形成されたスライドガラス上に、ローダミンB分子溶液 (10 mM, 0.4 μ L) を滴下し、風乾するこ

Fig. 3. t-SPESIのプローブ振動計測とフィードバック制御システムの開発と、マルチモーダルイメージングの結果。(a) 開発した計測システムのブロック図。(b) ピエゾアクチュエータへの入力電圧とプローブの振動振幅の相関。(c) プローブの共振周波数と振幅の相関。(d) マイクロウェルスライド上に形成されたローダミンB分子薄膜の光学顕微鏡像。(e) フィードバック制御によって得られた表面形状像。(f) ローダミンBのイオン強度像。(g) 表面形状像(上部)とイオン強度像(下部)の断面プロファイルの比較。

とで薄膜を作製した。溶媒は水／メタノール混合溶媒(0.1%ギ酸添加)を用い、正イオンモードで計測した。プローブの走査は100マイクロメートル間隔でステップスキャンを行った。Fig. 3(d)に試料の光学顕微鏡像を示す。スライド上の黒色の撥水性膜中のガラスが露出した領域に、色素分子膜が一つおきに形成されている。本試料に対して、フィードバック制御によって得られた表面形状像(Fig. 3(e))は、すべてのマイクロウェルの凹凸情報を示した。一方で、ローダミンBの分子イオンに対応する m/z 443のイオン強度の二次元分布像(Fig. 3(f))は、ローダミンB薄膜が存在しているマイクロウェルからのイオン生成を示した。表面形状像とイオン強度像の断面プロファイルの比較(Fig. 3(g))においても、マイクロウェルのガラス領域(Fig. 3(g) 上部)とローダミンBイオンの分布領域(Fig. 3(g) 下部)が対応しており、プローブ走査中の振幅が一定に維持され、マルチモーダルイメージングが可能であることが示された。計測後のサンプリング跡の光学顕微鏡による観察の結果、サンプリング幅は約10マイクロメートルであることを確認した。

4.2 ナノ体積液体を用いたサンプリングイオン化過程の可視化

t-SPESIではプローブの振動を活用し、サンプリング過程とイオン化過程を断続的かつ高速に行うことができる。しかしながら、プローブ先端と試料表面の間に形成される液架橋の形成・破断と、イオン化への過程は未解明である。また、溶媒に分子が溶解すると、分子と溶媒の相互作用が生じ、液体の粘弾性などが変化することも考えられる。したがって、帯電したナノ体積液体の動的変化を詳細に捉えることは、サンプリングイオン化過程の理解と、ナノ体積液体の物理特性と質量分析の同時計測法の実現、の両面から重要である。

われわれは、t-SPESIのサンプリングイオン化過程における溶媒種の効果を詳細に調べるために、キャピラリープローブの振動を止め、一回の液架橋の形成と破断に伴うプローブの微小変位と、マスペクトルの同時計測を行った。本計測における、プローブと試料ステージの位置関係と、サンプリングイオン化過程におけるプローブの変位の模式図をFig. 4(a)に示す。最初、プローブと試料は離れた位置にあり(1)、プローブからは高電圧が印加された溶媒はESIを生じている。次に、試料がプローブに一定速

Fig. 4. (a) ナノ体積液体を用いたサンプリングイオン化過程の計測の概要. (b) ローダミンB分子膜の計測結果. (c) 液架橋が延伸されて破断するまでの時間 t_1 の溶媒依存性. (d) 液架橋が破断してからローダミンBのイオン信号が計測されるまでの時間 t_2 の溶媒依存性. (文献20より内容を変更して転載.)

度で近接する. その後試料がプローブに接触し, プローブが試料ステージに押し上げられ, プローブは斥力を感じる (2). 任意のプローブ変位量に到達した後で, 試料の移動方向が反転し, プローブから離れるように設定されている. プローブ先端が基板から離れた (3) 後に, プローブ先端と試料表面の間で液架橋が伸張し, 破断する (4). 最後にプローブ端においてESIが生じる (5). プローブの変位計測は先述の光てこ方式を用いた. 試料位置の制御は, 試料と一回の接触と乖離を後に, XY方向に試料を移動し, 新しい試料面で次の計測を行うようにした. また, 試料ステージの折り返しの設定値は2 Vとし, 50~60 μm のプローブ変位量が生じるように設定した.

Fig. 4(b) は, ガラス基板上のローダミンB分子膜に対して, メタノール/水混合溶媒 (0.1%ギ酸) を用いた場合の測定結果である. 実線, 四角ドット, 破線のプロットは, それぞれプローブの変位, ローダミンB分子イオンのピーク強度 (m/z 443), プローブが試料から離れているときの基準信号に対応している. プローブと試料表面が離れている期間 (1) のプローブは微小に振動した. これは, プローブ端部で発生するESIによって, プローブ端の溶媒量が時間変動したことで, プローブが微小に振動した結果であると考えられる. 次に, プローブが試料に接触している間 (2) は正電圧の出力が計測され, ステージが上方に移動するにつれて出力値が増加した. この結果はプローブに斥力が生じていることに対応する. その後, 液架橋が伸張されている期間 (3~4) にもプローブに斥力を生じていることが見いだされた. これは, プローブの先端に溜まった溶媒と, 試料表面に広がった溶媒のクーロン相互作用によるものが原因として考えられる. 液架橋が破断した直後 (4) には, プローブの振動周波数が変化し, 振幅が約2倍に増加した. これは, 液架橋が破断したことで, プ

ローブの応力が緩和したこと, 試料表面に残留した溶媒とプローブ先端に保持された溶媒の間に静電相互作用が生じたことが考えられる.

さらに, 物理化学的性質が異なるアルコール溶媒 (エタノール/水, 2-プロパノール/水) を用いて同様の計測を行い, 液架橋が延伸されて破断するまでの時間 t_1 (3~4) と, 液架橋が破断してからローダミンBのイオン信号が計測されるまでの時間 t_2 (4~5) を比較した. t_1 はメタノール>エタノール>2-プロパノールの順に減少した. この傾向は溶媒の表面張力と正相関であり, 液架橋の表面エネルギーが液架橋の延伸時間に影響を及ぼすことを示唆する. 対照的に, t_2 はメタノール<エタノール<2-プロパノールの順に増加した. この傾向は溶媒の粘度と正相関である. 液架橋が破断すると, プローブ端の溶液はイオン引き出し管方向に移動し, エレクトロスプレーに変化する. 溶液が高粘度であるほどTaylorコーンの生成時間が長くなり, イオンの生成時間も増加したと考えられる²³⁾.

5. まとめ

本稿では, タッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法 (t-SPESI) に関する研究結果を紹介した. ナノ体積液体の液架橋形成とエレクトロスプレーイオン化を高速に実施することで, 生体の分子夾雑環境を捉えることができる. プローブ振動の計測技術と安定化技術は, 生体組織を精細に捉えるマルチモーダルイメージングのための基盤技術として重要である. 今後は本技術を導入したt-SPESIを用いて, 疾患組織中の局在性成分群の可視化を進める. また, 柔軟なナノ体積液体の動的変化と質量分析法の融合は, 制御された液体中の化学反応や, 相分離現象を捉えるための計測技術へと展開していく.

謝 辞 本研究内容は、共同研究者との連携で得られた。また、研究の一部は、大学共同利用機関法人自然科学研究機構新分野創成センターイメージングサイエンス研究分野プロジェクト (IS281003)、公益財団法人野口研究所、公益財団法人旭硝子財団、豊田理研スカラー、JSPS科研費JP18H04554 (新学術領域「分子夾雑の生命化学」) の助成を得て行われた。

文 献

- 1) A. Bray, H. Johnson, L. Raff, and R. Walter, "Essential Cell Biology," 4th Edition (2009).
- 2) 白木賢太郎, "相分離生物学", 東京化学同人, 東京 (2019).
- 3) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse, *Science*, **246**, 64 (1989).
- 4) P. Kebarle and L. Tang, *Anal. Chem.*, **65**, 972A (1993).
- 5) 平岡賢三, "質量分析の源流", 国際文献社, 東京 (2011).
- 6) A. Schmidt, M. Karas, and T. Dülcks, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **14**, 492 (2003).
- 7) J. Hu, Q. Y. Guan, J. Wang, X. X. Jiang, Z. Q. Wu, X. H. Xia, J. J. Xu, and H. Y. Chen, *Anal. Chem.*, **89**, 1838 (2017).
- 8) A. C. Susa, J. L. Lippens, Z. Xia, J. A. Loo, I. D. G. Campuzano, and E. R. Williams, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **29**, 203 (2018).
- 9) J. B. Fenn, Nobel Media AB (2019).
- 10) M. K. Mandal, L. C. Chen, and K. Hiraoka, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **22**, 1493 (2011).
- 11) R. Yin, J. Kyle, K. Burnum-Johnson, K. J. Bloodsworth, L. Susel, C. Ansong, and J. Laskin, *Anal. Chem.*, **90**, 6548 (2018).
- 12) Z. Takáts, J. M. Wiseman, B. Gologan, and R. G. Cooks, *Science*, **306**, 471 (2004).
- 13) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, and T. Matsuo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988).
- 14) T. Ozawa, I. Osaka, T. Ihozaki, S. Hamada, Y. Kuroda, T. Murakami, A. Miyazato, H. Kawasaki, and R. Arakawa, *J. Mass Spectrom.*, **50**, 1264 (2015).
- 15) V. V. Laiko, M. A. Baldwin, and A. L. Burlingame, *Anal. Chem.*, **72**, 652 (2000).
- 16) J. Laskin and I. Lanekoff, *Anal. Chem.*, **88**, 52 (2016).
- 17) C. J. Perez, A. K. Bagga, S. S. Prova, M. Yousefi Taemeh, and D. R. Ifa, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **33**, 27 (2019).
- 18) P. M. Vaysse, R. M. A. Heeren, T. Porta, and B. Balluff, *Analyst*, **142**, 2690 (2017).
- 19) Y. Otsuka, S. Shide, J. Naito, M. Kyogaku, H. Hashimoto, and R. Arakawa, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **26**, 2725 (2012).
- 20) Y. Otsuka, J. Naito, S. Satoh, M. Kyogaku, H. Hashimoto, and R. Arakawa, *Analyst*, **139**, 2336 (2014).
- 21) T. Kohigashi, Y. Otsuka, R. Shimazu, T. Matsumoto, F. Iwata, H. Kawasaki, and R. Arakawa, *Mass Spectrom.*, **5**, S0054 (2016).
- 22) Y. Otsuka, S. Satoh, J. Naito, M. Kyogaku, and H. Hashimoto, *J. Mass Spectrom.*, **50**, 1157 (2015).
- 23) B. Kamihoriuchi, Y. Otsuka, A. Takeuchi, F. Iwata, and T. Matsumoto, *Mass Spectrom.*, **7**, S0078 (2019).

Keywords: Mass spectrometry imaging, Ambient sampling and ionization, Feedback control, Tissue imaging, Liquid bridge, Electrospray ionization