

Préparation des échantillons en vue d'une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF

F. Rusconi¹ et J.M. Schmitter²

¹Institut Européen de Chimie Biologie, École Polytechnique, ENSCPB, Avenue Pey Berland, BP. 108, 33402 Talence Cedex, France.

²Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels, UPRESA CNRS 5472, Université Bordeaux I, 351 cours de la Libération, 33405 Talence Cedex, France

An optimal sample preparation is a determining step of MALDI mass spectrometry analysis, preferably involved in the overall analytical process from the very beginning of sample handling. Commonly used preparation procedures, such as dried droplet and thin layer, have been reviewed. Since matrix selection itself (and sometimes use of additives) is a crucial step, special emphasis has been put on the criteria that govern the matrix choice as a function of the analyte structure. Synoptic tables allow a quick selection of the optimal matrix -occasionally with additives- depending on each of the four main analytical applications of MALDI: protein, oligosaccharide, oligonucleotide and synthetic polymer analysis.

Le processus d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) [1–3] est un mode de production d'ions qui présente une grande tolérance par rapport à la présence de composés divers pouvant être associés aux analytes : sels, tensio-actifs, réducteurs et complexants, par exemple. Cependant, la préparation des échantillons à analyser ne doit être en aucun cas une étape bâclée. Bien au contraire, il s'agit d'une phase cruciale du processus d'analyse, qui doit être soigneusement optimisée pour chaque type d'échantillon en fonction de la nature de celui-ci, de la sensibilité requise et du type d'information recherché [4–6]. En effet, il convient de préciser ici que la préparation d'un échantillon n'est pas la même lorsqu'il s'agit d'effectuer une simple mesure de masse ou une détermination de séquence de peptide à partir de l'analyse des ions fragments en mode Post Source Decay (PSD), avec l'obligation, dans ce dernier cas, de conserver un signal intense et stable pendant une durée de plusieurs minutes. Afin de donner un aperçu le plus complet possible de ces méthodes de préparation, nous donnerons d'abord une description des principales manières de réaliser le dépôt de l'échantillon associé à la matrice. Préparer un échantillon, c'est aussi choisir la matrice qui convient le mieux à sa nature. Les critères gouvernant le choix de la matrice seront décrits dans une série de tableaux passant en revue les grandes classes de composés analysables par MALDI (peptides, protéines, acides nucléiques, oligosaccharides, polymères synthétiques) en nous référant systématiquement aux modes de dépôt décrits au préalable. Etant donné la richesse des applications de la technique MALDI, nous ne saurions prétendre être exhaustifs dans notre présentation et avons fait à dessein un

choix de quelques modes de préparation qui ont été soigneusement éprouvés dans différents laboratoires.

Les matrices

Le rôle de la matrice est d'effectuer l'ionisation de l'analyte après qu'elle ait été excitée par les photons incidents du laser. Elle constitue un réservoir "tampon" d'énergie et transfère aux molécules d'analyte l'énergie nécessaire à leur ionisation. Nous nous limiterons ici au cas le plus répandu du laser à azote qui émet dans l'ultraviolet à 337 nm. C'est pourquoi toutes les matrices dont nous détaillerons l'emploi ci-dessous sont compatibles avec un laser à 337 nm. Cette sélection de matrices a été éminemment empirique, car à ce jour nous ne connaissons pas de règle qui permette de prédire, en fonction de la structure d'une molécule donnée, si celle-ci détiendra les propriétés d'une bonne matrice. Cependant, certains critères sont rédhibitoires : la matrice doit pouvoir former des cristaux dopés avec l'analyte et ne doit pas sublimer dans les conditions de vide poussé qui règnent dans la source du spectromètre de masse.

- acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (ACHCA),
- acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapinique, AS),
- acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB),
- acide 2-hydroxy-5-méthoxybenzoïque (additif pour préparer le super DHB, S/DHB),
- 2,4,6-trihydroxyacétophénone (THAP),
- acide 2-(4-hydroxyphénylazo)benzoïque (HABA),
- 6-aza-2-thiothymine (ATT),
- acide 3-hydroxypicolinique (3-HPA),
- 1,8,9-anthracène-triol (Dithranol, DT),
- acide rétinoïque (AR).

Les méthodes de dépôt

Goutte séchée (GS)

C'est la méthode la plus simple à mettre en œuvre : une solution acide (acide trifluoroacétique (TFA) 1/1000) de

matrice (saturée ou de concentration connue) est mélangée à l'échantillon à analyser et une goutte de cette préparation est déposée sur la surface métallique de la cible du spectromètre. Le mélange est soit réalisé au préalable (pre-mix), soit effectué sur la cible elle-même. Dans ce dernier cas, un cône de pipette sert de chambre de mélange. Ce mélange matrice-analyte est effectué par une série d'aspirations et de refoulements dans le cône. La cristallisation obtenue par séchage de la goutte à température ambiante peut être accélérée par chauffage, ventilation forcée ou aspiration sous vide. Dans ce type de méthode le solvant organique utilisé pour solubiliser la matrice est le plus souvent l'acétonitrile (AcN).

Couche mince (CM)

La matrice est ici mise en solution dans un solvant très volatil, tel que l'acétone (noter que l'on n'acidifie pas la solution de matrice). Une goutte de solution de matrice est déposée sur la cible et l'évaporation rapide du solvant produit une couche mince et homogène de cristaux. L'échantillon est alors déposé sur cette préparation, avec l'avantage de pouvoir réaliser un dépôt de très faible dimension [6]. Les cristaux de matrice de la couche mince servent de germe de nucléation pour le mélange échantillon-matrice déposé successivement. Ce type de dépôt est compatible avec un lavage optionnel dans le cas où l'analyte est riche en substances contaminantes : on ajoute sur le dépôt 1 – 5 µL d'eau acidifiée à 1/1000 de TFA, on attend quelques secondes et on réaspire l'eau avec une pipette. L'eau s'est chargée en substance contaminante (sels, urée...).

Sandwich (S)

Cette méthode fait intervenir en premier lieu la préparation d'une couche mince (voir le paragraphe correspondant). On rajoute successivement les composés suivants sur la couche mince de cristaux de matrice : 1 – 2 µL d'une solution de 1/1000 TFA dans l'eau (acidification de la couche de matrice) ; 0,5 µL de la solution d'analyte (son pH peut être légèrement supérieur à 7) ; 0,5 µL d'une solution de matrice (ACHCA ou AS). Le dépôt est alors séché à température ambiante (sur la pailleasse). Ici aussi on peut laver le dépôt (cf. plus haut).

ACHCA/Nitrocellulose (ACHCA/NC)

Cette méthode fait appel à de la nitrocellulose (sous forme de membrane, par exemple) en plus de l'ACHCA. La solution de ACHCA/nitrocellulose est préparée par solubilisation de deux parties de ACHCA plus une partie de nitrocellulose (membrane) dans un mélange d'acétone : alcool isopropylique (4 : 1, v/v) à raison de 20 mg/mL d'ACHCA et de 10 mg/mL de nitrocellulose. 0,5 µL de cette solution sont déposés sur la cible et laissés sécher à l'air libre. On peut alors déposer l'échantillon pré-mélangé avec la matrice.

Membranes

Le transfert (ou le dépôt) de protéines sur divers types de membranes et la désorption de ces protéines directement dans la source du spectromètre sont bien documentés (polyéthylène [7], PVDF [8], NC [9,10]). Néanmoins, l'utilisation directe de ces membranes peut poser deux types de problèmes : une absence de désorption ou une mesure de masse difficile à étalonner. Dans le cas le plus fréquent d'une uti-

lisation de laser UV à azote (337 nm), le polyéthylène donne de bons résultats [7] et une préparation adéquate permet de travailler avec d'autres supports comme le polypropylène, par exemple [11]. Les protéines peuvent également avoir été électro-transférées sur membrane à partir d'un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. La membrane est immergée dans une solution de matrice, séchée et analysée directement par spectrométrie de masse MALDI-TOF [12].

Dessalage et micro-chromatographie

En maintes circonstances il est nécessaire de débarrasser les échantillons de la présence de sels ou de détergents. Ces contaminants sont couramment éliminés par une étape de chromatographie en phase liquide à polarité de phase inversée. L'élution est obtenue par l'emploi d'un solvant organique, comme l'acétonitrile. La fraction contenant l'analyte dessalé est alors analysée par spectrométrie de masse. Cependant, il peut arriver que la quantité de matériel biologique disponible soit trop faible pour procéder de cette manière. Des micro-techniques qui permettent de dessaler des quantités d'échantillon aussi faibles que quelques picomoles ont été mises au point [4,13]. Notons également que, dans le cas d'un échantillon complexe de peptides et de polypeptides, certains constituants du mélange peuvent ne pas être mis en évidence lors de l'analyse par spectrométrie de masse à cause d'un phénomène d'extinction de signal appelé suppression spectrale [14]. Une étude récente a permis de montrer que l'on pouvait faire de la chromatographie à basse pression sur 0,3 µL de phase et en présence de différentes matrices (DHB, AS, ACHCA) [15]. Les auteurs ont ainsi montré qu'il était possible de réaliser simultanément trois traitements différents d'un échantillon biologique complexe : dessalage, micro-séparation chromatographique et mélange des espèces moléculaires éluées avec une matrice au choix. Le dépôt en sortie de colonne se fait directement sur la cible, limitant ainsi les pertes de matériel dues à des interactions incontrôlées entre l'analyte et les consommables en plastique couramment utilisés. De plus la suppression spectrale est ainsi fortement limitée.

Extraction de protéines et de peptides de gels d'électrophorèse dénaturante (SDS-PAGE)

Un certain nombre de travaux ont montré que les colorants employés pour révéler la présence de bandes de protéines après migration sur gel d'électrophorèse sont compatibles avec une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ainsi, la coloration au bleu de Coomassie et la coloration à l'argent ne constituent pas une gêne pour la désorption/ionisation de peptides obtenus par digestion dans le gel des protéines séparées par électrophorèse [16–19].

Interactions non covalentes observées par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les interactions non covalentes entre plusieurs protéines peuvent être observées par spectrométrie de masse MALDI-TOF si l'on prête une attention particulière au mode préparatoire de l'échantillon. Les paramètres principaux sur lesquels on joue lors de la préparation de l'échantillon sont la nature des solvants de l'échantillon et de la matrice, ainsi que la vitesse d'évaporation de ces solvants au moment du dépôt. Les solvants employés dans ce cas sont beaucoup moins agressifs pour les protéines que ceux couramment

employés (les solvants organiques sont généralement proscrits, par exemple). Ainsi, il est même possible de faire des digestions enzymatiques sur un dépôt qui a déjà servi pour montrer l'interaction non covalente entre plusieurs protéines. C'est une technique en plein développement actuellement [20,21].

Choix de la matrice

Le choix de la matrice est conditionné par la nature des composés que l'on souhaite analyser [4,22] et par le type d'information recherché : In Source Decay (ISD), PSD, analyse de complexes non covalents, protéome, par exemple.

Protéines (Tab. I) :

Pour les biopolymères protéiques, le critère fondamental est la taille de la molécule. Un peptide (masse moléculaire inférieure à 6 – 10 kDa) sera le mieux analysé à l'aide de l'une des trois matrices ACHCA, DHB ou THAP. Il arrive, dans certaines conditions de dépôt, que l'ACHCA provoque la désorption/ionisation préférentielle des peptides de masse moléculaire plus élevée [23]. Pour contrecarrer ce phénomène de suppression spectrale, la THAP est employée car elle opère une sélection contraire : elle permet de mieux analyser les peptides de faible masse moléculaire. Ainsi, il peut arriver que, pour obtenir une bonne vérification de séquence, l'expérimentateur doive faire plusieurs types de dépôts du même échantillon mélangé à différentes matrices.

Dans le cas des polypeptides (masse moléculaire supérieure à 6 – 10 kDa), la matrice de référence est l'AS. Quand un échantillon de biopolymères est complexe, et qu'il contient des espèces moléculaires peptidiques et polypeptidiques, deux matrices peuvent être requises afin de permettre la désorption/ionisation des molécules de faible et de haute masse moléculaire. Cependant, le mélange de deux matrices pour un seul et même dépôt n'est pas recommandé. Il convient de faire deux dépôts distincts avec le même échantillon additionné soit de la matrice pour peptides soit de la matrice pour polypeptides. Une autre stratégie consiste à faire une micro-chromatographie de l'échantillon [15] (cf. Dessalage et Micro-chromatographie). Enfin, le DHB est presque exclusivement reconnu pour la désorption/ionisation des peptides, mais il peut également être utilisé avec succès et sur de très faibles quantités de matériel micro-purifié contenant des espèces moléculaires de masses très variables (de 1 kDa à 30 kDa, par exemple).

Oligosaccharides (Tab. II) :

Deux matrices se sont imposées dans ce domaine, le DHB et le S/DHB. Certains auteurs préconisent la dissolution (éthanol absolu) et la recristallisation du mélange cristallin matrice/analyte pour améliorer la désorption. Il faut noter que, dans le cas des oligosaccharides, la gamme de masse à laquelle on a accès par spectrométrie de masse MALDI est nettement moins étendue que pour les protéines. L'espèce détectée est très majoritairement l'adduit de sodium $[M+Na]^+$. Un traitement d'échantillon sur la cible à l'aide d'une résine échangeuse d'ions permet d'améliorer sensiblement la détection [24].

Tableau I. Préparation d'échantillon pour l'analyse des protéines par MALDI.

Matrice	Solvant de la matrice	Additif	Mode de dépôt	Références	Commentaire
ACHCA	40 % AcN, 1/1000 TFA		Goutte séchée, Sandwich	[29]	Peptides
ACHCA	99 % Acétone		Couche mince	[6]	Peptides
ACHCA/NC	99 % Acétone	Nitrocellulose	Couche mince	[20]	Peptides
HABA	66 % AcN, 1/1000 TFA		Goutte séchée		Protéines (a)
DHB	Eau, 1/1000 TFA		Goutte séchée		Peptides (b)
S/DHB	(c)	acide 2-hydroxy-5-méthoxybenzoïque	Goutte séchée	[30,31]	Glycopeptides
Sinapinique	50 % AcN, 1/1000 TFA		Goutte séchée, Sandwich	[32,33]	Protéines
Sinapinique	99 % Acétone		Couche mince		Protéines
ATT	Acétate et Citrate d'ammonium		Goutte séchée	[20]	Interactions non covalentes

^a Cette matrice apparaît appropriée pour l'analyse des protéines membranaires purifiées en présence de 0.001 – 0.005 % de détergents (dodecyl maltoside, sarcosyl, lauryl maltoside). L'échantillon est alors en solution, avant son mélange avec la matrice, dans de l'acide formique à 99 %.

^b Cette matrice est avantageusement utilisée dans le cas de mélanges de peptides et polypeptides car elle permet la désorption/ionisation d'espèces moléculaires dont les masses sont nettement différentes (de 1000 Da à 30 kDa, par exemple) [15,34].

^c L'additif est en solution dans l'eau, 1/1000 TFA. La solution de DHB est mélangée avec la solution d'additif à raison de 9 : 1 (v/v). Il faut noter que l'ACHCA donne aussi des résultats intéressants avec les glycopeptides. Ces deux matrices sont couramment utilisées pour l'analyse des glycopeptides, et peuvent s'avérer complémentaires.

Tableau II. Préparation d'échantillon pour l'analyse d'oligosaccharides par MALDI.

Matrice	Solvant de la matrice	Additif	Mode de dépôt	Références	Commentaire
DHB	10 % Ethanol		Goutte séchée	[35]	
DHB	AcN		Goutte séchée + recrist /Ethanol	[36]	
S/DHB	66 % AcN	acide 2-hydroxy-5- méthoxybenzoïque ^a	Goutte séchée	[37]	
S/DHB	66 % AcN	résine échangeuse de cations Extractigel-D	Goutte séchée + dessalage	[24]	
THAP	Ethanol	Citrate d'ammonium	Goutte séchée	[31]	Oligosaccharides acides

^a Le mélange additif : matrice est de 1 : 9 (m/m).

Oligonucléotides (Tab. III) :

Le squelette des acides nucléiques, riche en groupements phosphate, favorise la formation d'adduits de métaux alcalins (Na⁺ et K⁺, par exemple) qui perturbent la mesure de la masse de l'oligonucléotide. Pour contrecarrer ce phénomène, les solutions de matrice contiennent en général du citrate ou du tartrate d'ammonium à une concentration de 100 mM. Les principales matrices sont décrites dans le tableau correspondant. Mentionnons qu'il peut être utile de purifier par chromatographie échangeuse de cations la matrice 3-HPA qui peut être très contaminée par des sels [25]. Les ions formés à partir des oligonucléotides sont détectés par l'analyse en mode négatif des ions [M-H]⁻. La gamme de masse à laquelle on a accès par spectrométrie de masse MALDI est telle que l'on peut aisément analyser un ARN de transfert intact (75 bases soit 25 kDa) ou des acides nucléiques d'une centaine de bases [25].

Polymères synthétiques (Tab. IV) :

C'est un domaine d'application de la spectrométrie de masse MALDI qui a été exploré récemment par plusieurs labora-

toires [26–28]. La préparation d'échantillon revêt ici toute son importance si l'on veut entreprendre l'analyse d'échantillons à forte polydispersité en raison d'un phénomène de discrimination de masse. La désorption est favorisée par la cationisation de l'analyte avec des ions métalliques. La taille du cation est critique et les auteurs utilisent principalement un gros cation, comme Ag⁺.

Conclusion

Nous avons décrit les principales méthodes de préparation d'échantillon, étape capitale de la démarche analytique dans laquelle s'inscrit la spectrométrie de masse en mode MALDI. Cette revue illustre le soin qu'il convient d'apporter à la préparation de l'échantillon, et combien il est nécessaire de l'intégrer dans l'ensemble du processus analytique en vue de réaliser la meilleure analyse possible dudit échantillon.

Tableau III. Préparation d'échantillon pour l'analyse d'oligonucléotides par MALDI.

Matrice	Solvant de la matrice	Additif	Mode de dépôt	Références	Commentaire
THAP	Ethanol	Citrate d'ammonium	Premix + Goutte séchée	[38]	premix
3-HPA	50 % AcN		Goutte séchée	[39–41]	purification préalable de la matrice par échange d'ions
3-HPA		Tartrate d'ammonium	Goutte séchée	[42, 40]	
ATT	AcN	Citrate d'ammonium	Goutte séchée	[43]	

Tableau IV. Préparation d'échantillon pour l'analyse de polymères synthétiques par MALDI.

Matrice	Solvant de la matrice	Additif	Mode de dépôt	Références	Commentaire
AR	Tetrahydrofuranne	Nitrate d'argent	Premix + Goutte séchée	[26]	
DT	Tetrahydrofuranne	Acétate d'argent	Goutte séchée	[27]	dépôt préalable CH ₃ I
HABA	Tetrahydrofuranne	NaCl	Goutte séchée	[28]	

Références

- Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301.
- Fenselau, C. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 661A-665A
- Stults, J. T. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 691-698.
- Kussmann, M.; Nordhoff, E.; Rahbek-Nielsen, H.; Haebel, S.; Rossel-Larsen, M.; Jakobsen, L.; Gobom, J.; Mirgorodskaya, E.; Kroll-Kristenson, A.; Palm, L.; Roepstorff, P. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 593-601.
- Xiang, F.; Beavis, R. C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 199-204.
- Vorm, O.; Roepstorff, P.; Mann, M. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3281-3287.
- Blackledge, J. A.; Alexander, A. J. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 843-848.
- Strupat, K.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Eckerskorn, C.; Lottspeich, F. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 464-470.
- Liang, X.; Bai, J.; Liu, Y. H.; Lubman, D. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1012-1018.
- Liang, X.; Lubman, D. M.; Rossi, D. T.; Nordblom, G. D.; Barksdale, C. M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 498-503.
- Worral, T. A.; Cotter, R. J.; Woods, A. S. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 750-756.
- Schreiner, M.; Strupat, K.; Lottspeich, F.; Eckerskorn, C. *Electrophoresis* **1996**, *17*, 954-961.
- Brockman, A. H.; Dodd, B. S.; Orlando, R. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4716-4720.
- Mock, K. K.; Sutton, C. W.; Cottrell, J. S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, *6*, 233-238.
- Rusconi, F.; Schmitter, J. M.; Rossier, J.; le Maire, M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3046-3052.
- Rosenfeld, J.; Capdevielle, J.; Guillemot, J. -C.; Ferrara, P. *Analyt. Biochem.* **1992**, *203*, 173-179.
- Rusconi, F.; Potier, M. -C.; Le Caer, J. -P.; Schmitter, J. -M.; Rossier, J. *Biochemistry* **1997**, *36*, 11021-11026.
- Larsson, T.; Norbeck, J.; Karlsson, H.; Karlsson, K. A.; Blomberg, A. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 418-423.
- Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 850-858.
- Glocker, M. O.; Bauer, S. H.; Kast, J.; Volz, J.; Przybylski, M. *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 1221-1227.
- Moniatte, M.; Van der Goot, F. G.; Buckley, J. T.; Pattus, F.; Van Dorsselaer, A. *FEBS Lett.* **1996**, *384*, 269-272.
- Billeci, T. M.; Stults, J. T. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1709-1716.
- Cohen, S. L.; Chait, B. T. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 31-37.
- Rouse, J. C.; Vath, J. E. *Analyt. Biochem.* **1996**, *238*, 82-92.
- Kirpekar, F.; Nordhoff, E.; Kristiansen, K.; Roepstorff, P.; Lezius, A.; Hahner, S.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 3866-3870.
- Schriemer, D. C.; Li, L. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4169-4175.
- Jackson, A. T.; Yates, H. T.; Scrivens, J. H.; Critchley, G.; Brown, J.; Green, M. R.; Bateman, R. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1668-1674.
- Rashidzadeh, H.; Guo, B. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 131-135.
- Beavis, R. C.; Chaudhary, T.; Chait, B. T. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 156-158.
- Tsarbopoulos, A.; Karas, M.; Strupat, K.; Pramanik, B. N.; Nagabhushan, T. L.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2062-2070.
- Papac, D. I.; Wong, A.; Jones, A. J. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3215-3223.
- Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, *3*, 432-435.
- Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, *3*, 436-439.
- Strupat, K.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **1991**, *111*, 89-93.
- Stahl, B.; Steup, M.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1463-1466.
- Harvey, D. J.; Naven, T. J. P.; Küster, B.; Bateman, R. H.; Green, M. R.; Critchley, G. *Organic Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 1556-1561.
- Karas, M.; Ehring, H.; Nordhoff, E.; Stahl, B.; Strupat, K.; Hillenkamp, F.; Grehl, M.; Krebs, B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1476-1481.
- Pieles, U.; Zürcher, W.; Schär, M.; Moser, H. E. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3191-3196.
- Wu, K. J.; Steding, A.; Becker, C. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 142-146.
- Karas, M.; Bahr, U.; Strupat, K.; Hillenkamp, F.; Tsarbopoulos, A.; Pramanik, B. N. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 675-679.
- Tang, K.; Allman, S. L.; Chen, C. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *10*, 943-948.
- Juhász, P.; Roskey, M. T.; Smirnov, I.; Haff, L.; Vestal, M. L.; Martin, S. A. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 941-946.
- Lecchi, P.; Le, H. M. T.; Panell, L. K. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1276-1277.