

## 地域イノベーション共用化装置

BRUKER autoflex II TOF-Mass 使用マニュアル

(文書更新日：H27.12.11)

地域イノベーション技術支援スタッフ 正担当者：立中 咲樹

副担当者：松本 文子

BRUKER autoflex II TOF-Mass は非常に高価な機器であるため大切に扱うこと。

また、使用するに当たり、

- 学生は本マニュアル記載以外の操作を行わないこと。
- エラー表示や普段と異なる事象が発生した場合は速やかに使用を中止するとともに指導教官に連絡をし、その時の状況を報告すること。

### ◎測定準備（基本的に各研究室にて行う）

- 1.5mL 容量マイクロチューブを準備する
- 標準物質として PEG を用いる【PEG は 5 種類(200、400、950-1050、1450、3350)あるので自分の測定サンプルの分子量に近いものを選ぶこと】
- キャリブレーション溶液は必ず THF を用いて調製すること。
- マトリックス\*1 は 5 種類ある。新規化合物を測定する場合は 5 種類すべてのマトリックスを用いて測定を行い、既知化合物を測定する場合は過去のデータに従って測定を行うこと。
- できるだけ有機溶媒に溶かしてサンプルを調製する（後片づけの手間が少ない）。

\*1 マトリックスとは…MALDI（マトリックス支援レーザー脱離イオン化）等の Mass において、分析の対象となる化合物を分散保持するためのもの。

例) マトリックスの種類

| マトリックス   | mono MW | 使用用途   |
|--|---------|--|
| Dithranol<br>(1,8-Dihydroxy-9[10H]-anthracenone)   | 226.230 | 主に合成高分子の分析に用いられる                                   |
| CHCA<br>( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-cinnamic Acid) | 189.169 | ペプチド測定を中心に標準マトリックスとして最も多く用いられる                     |
| DHBA<br>(2,5-Dihydroxy-benzoic Acid)               | 154.120 | 水溶性が高く、糖鎖・複合脂質・(極性の高い)合成高分子、ペプチド、核酸関連物質 等、応用範囲は幅広い |
| SA<br>(3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic Acid)       | 224.211 | 主にタンパク計測に用いられる                                     |
| HABA<br>(2-(4-hydroxy phenylazo)benzoic Acid)      | 242.233 | 主に合成高分子、ペプチド/タンパク質の分析に用いられる                        |

## \*キャリブレーション溶液、サンプル溶液の調製

### I. サンプルが THF に溶ける場合

- ① 用意したマイクロチューブにマトリックス、PEG、測定サンプルをそれぞれ 1mg (または 1  $\mu$ l) ずつ秤量する。
- ② ①で秤量したものに THF を 100  $\mu$ l ずつ添加し、1mg/100  $\mu$ l の溶液を調製する (MS 専用シリンジを使用)。
- ③ 用意したマイクロチューブに②で調製した PEG 溶液 1  $\mu$ l とマトリックス溶液 10  $\mu$ l を添加し、よく混合する (ピペッティングでもボルテックスでもよい)。  
[⇒これがキャリブレーション溶液となる](#)
- ④ 用意したマイクロチューブに②で調製したサンプル溶液 1  $\mu$ l とマトリックス溶液 10  $\mu$ l を添加し、よく混合する (ピペッティングでもボルテックスでもよい)。  
[⇒これがサンプル溶液となる](#)

### II. サンプルが THF 以外の有機溶媒に溶ける場合

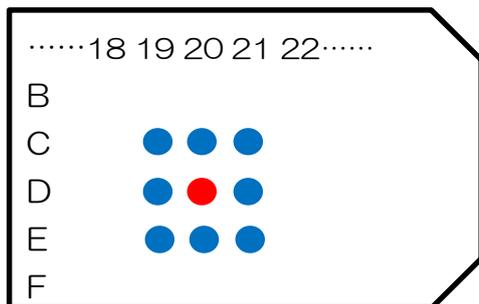
- ① 用意したマイクロチューブにマトリックス、PEG、測定サンプルをそれぞれ 1mg (または 1  $\mu$ l) ずつ秤量する。マトリックスは 2 本分秤量する。
- ② ①で秤量した PEG とマトリックス 1 本目に THF を 100  $\mu$ l ずつ添加し、1mg/100  $\mu$ l の溶液を調製する (MS 専用シリンジを使用)。
- ③ 用意したマイクロチューブに②で調製した PEG 溶液 1  $\mu$ l とマトリックス溶液 10  $\mu$ l を添加し、よく混合する (ピペッティングでもボルテックスでもよい)。  
[⇒これがキャリブレーション溶液となる](#)
- ④ ①で秤量したサンプルとマトリックス 2 本目にサンプルが溶ける有機溶媒を 100  $\mu$ l ずつ添加し、1mg/100  $\mu$ l の溶液を調製する (MS 専用シリンジを使用)。
- ⑤ 用意したマイクロチューブに④で調製したサンプル溶液 1  $\mu$ l とマトリックス溶液 10  $\mu$ l を添加し、よく混合する (ピペッティングでもボルテックスでもよい)。  
[⇒これがサンプル溶液となる](#)

### Ⅲ. サンプルが水にしか溶けない場合

- ① 用意したマイクロチューブにマトリックス、PEG、測定サンプルをそれぞれ 1mg（または 1  $\mu$ l）ずつ秤量する。マトリックスは 2 本分秤量する。
- ② ①で秤量した PEG とマトリックス 1 本目に THF を 100  $\mu$ l ずつ添加し、1mg/100  $\mu$ l の溶液を調製する（MS 専用シリンジを使用）。
- ③ 用意したマイクロチューブに②で調製した PEG 溶液 1  $\mu$ l とマトリックス溶液 10  $\mu$ l を添加し、よく混合する（ピペッティングでもボルテックスでもよい）。  
⇒これがキャリブレーション溶液となる
- ④ 0.1%(v/v) TFA 水溶液を調製する。調製した TFA 水溶液とアセトニトリルを 2:1 (v/v) で混合する。
- ⑤ ①で秤量したサンプルとマトリックス 2 本目に④で調製した混合液を 100  $\mu$ l ずつ添加し、1mg/100  $\mu$ l の溶液を調製する（MS 専用シリンジを使用）。
- ⑥ 用意したマイクロチューブに⑤で調製したサンプル溶液 1  $\mu$ l とマトリックス溶液 10  $\mu$ l を添加し、よく混合する（ピペッティングでもボルテックスでもよい）。  
⇒これがサンプル溶液となる

#### \*ターゲットプレート準備

- ① ターゲットプレートにキャリブレーション溶液とサンプル溶液をのせる（下図参照）
  - ・キャリブレーション溶液とサンプル溶液はそれぞれ隣り合うようにのせる。
  - ・のせる量はごく少量（0.5  $\mu$ l 程度）で、印からはみ出さないようにする。
- ② それぞれのせた位置を記録し、プレートにふたをして測定室へ行く。



- ：サンプル溶液
  - ：キャリブレーション溶液
- （隣り合う位置のどこか **1 か所** でよい。  
つまり、一度に 8 サンプルが測定できる）

## ◎測定

### \*準備

1. 使用前に、使用記録簿に date【使用年月日】、name(Lab)【測定者名(研究室)】、tel【内線番号】、matrix【マトリックスの試薬名】、method【パラメーター】、good solvent for the sample【サンプルが溶ける溶媒】を記入する。
2. 測定室にあるプレート台座(下写真参照、注意)にターゲットプレートをセットし、ズレがないようにしっかりと合わせる(この時、サンプルをのせた部分を手で触れないように注意)。



### 注意!!

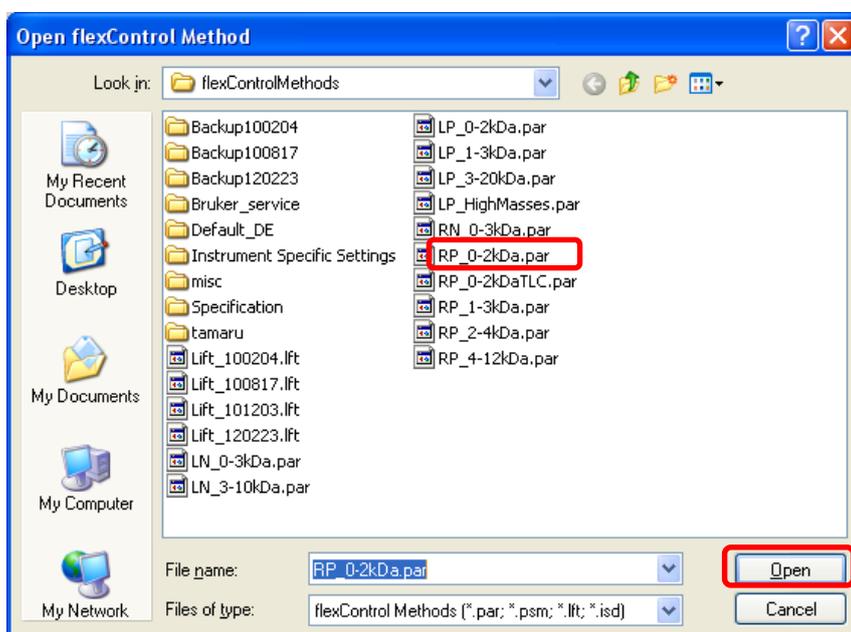
この部分が外れやすくなっているのでターゲットプレートの取り付け、取り外しの際には十分に注意すること!!

\*PC 起動、ターゲットプレート導入

3. PC およびプリンターの電源を入れる。
4. デスクトップ上 `flexControl` のアイコンをダブルクリックする。



5. 測定用メソッドを選択し、Open をクリックする（通常は\*`RP_0-2kDa.par`）。



\*2①メソッドの最初→測定モードを示す 2 文字

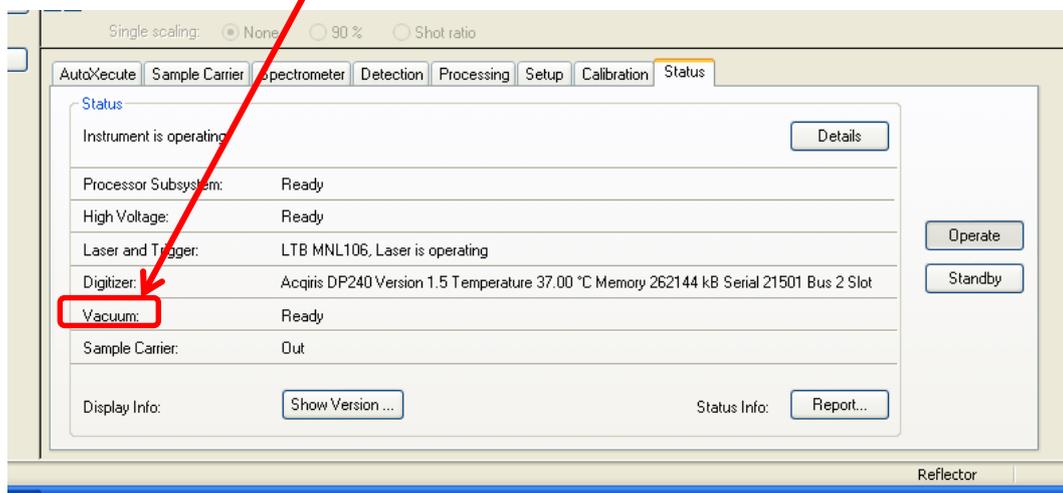
LP:Linear Positive、LN:Linear Negative

RP:Reflector Positive、RN:Reflector Negative

②その後の数字→メソッドがチューニングされているおおよその分子量

※測定の目的やサンプルの性質・質量数の合わせて適切なメソッドファイルを選択する。

6. Status タブの中の Vacuum の文字をクリックする。



7. 画面上に表示された「Source high」の値を使用記録簿に値を記入する。  $1 \sim 2e^{-6}$  または  $00e^{-7}$  以外の値の時は指導教官に連絡し指示を仰ぐこと。記入後、Cancel で画面を閉じる

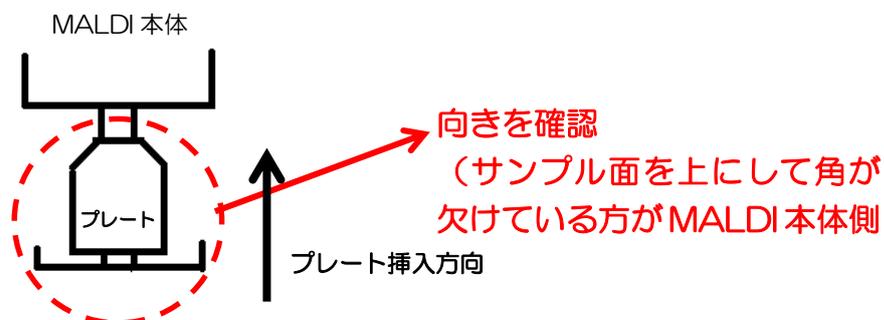


8. Eject をクリック（下図参照）

※取り出す際に取り出し口に人 or 物が当たると機械が故障するので注意する。

※トレイは手で押し戻さず、必ず eject ボタンで操作を行う。

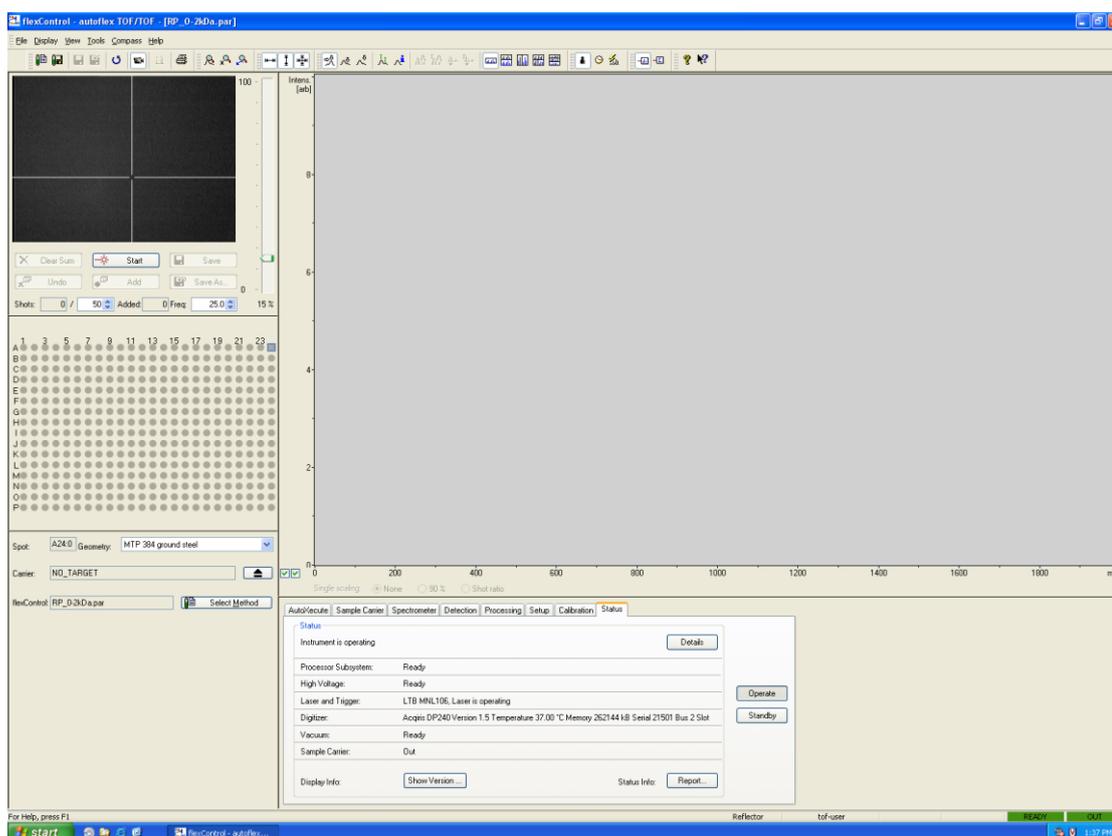
9. ターゲットプレートを機械にセットし、向きが正しいかとズレがないかを確認する。



10. Eject をクリックし、プレートを導入する。

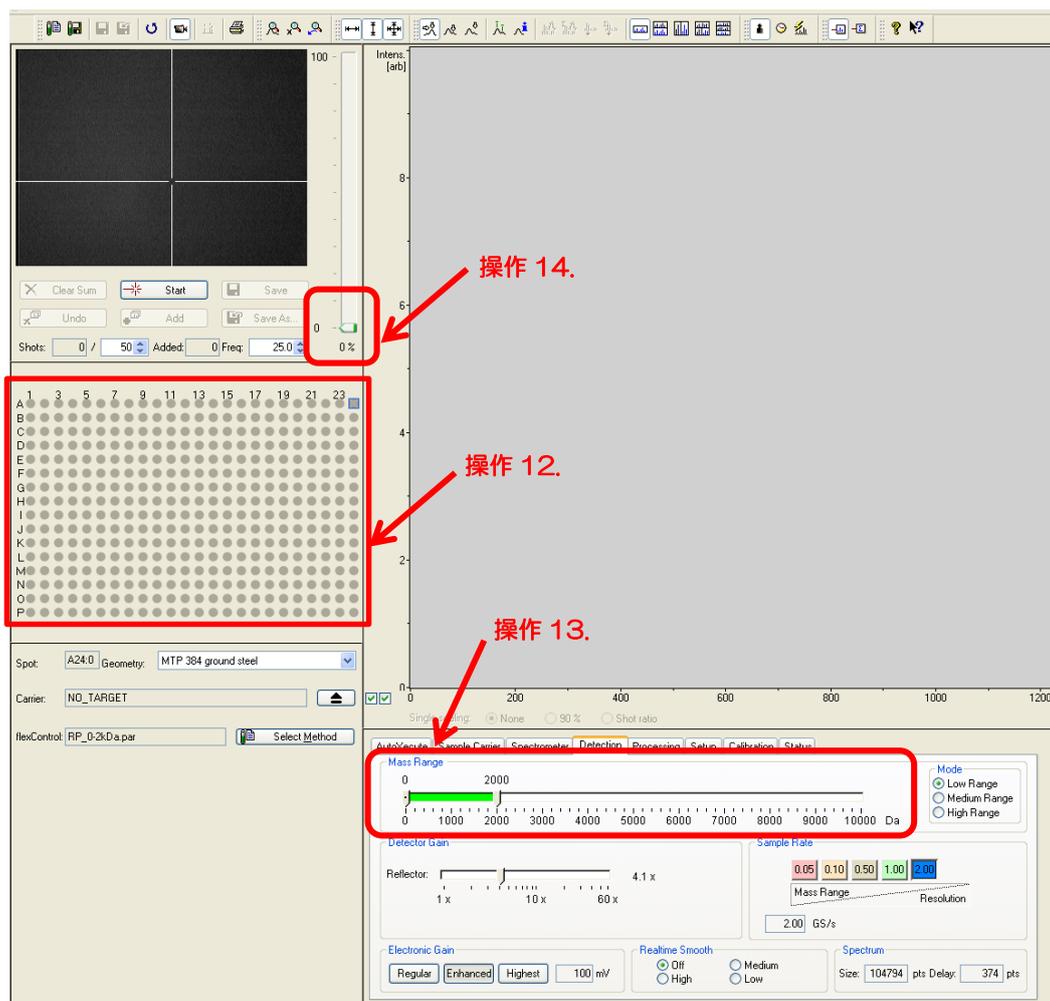
11. flexControl 画面右下にある 2 か所のインジケータが黄⇒緑になるまで待つ。

(黄⇒赤になったら指導教官に連絡)

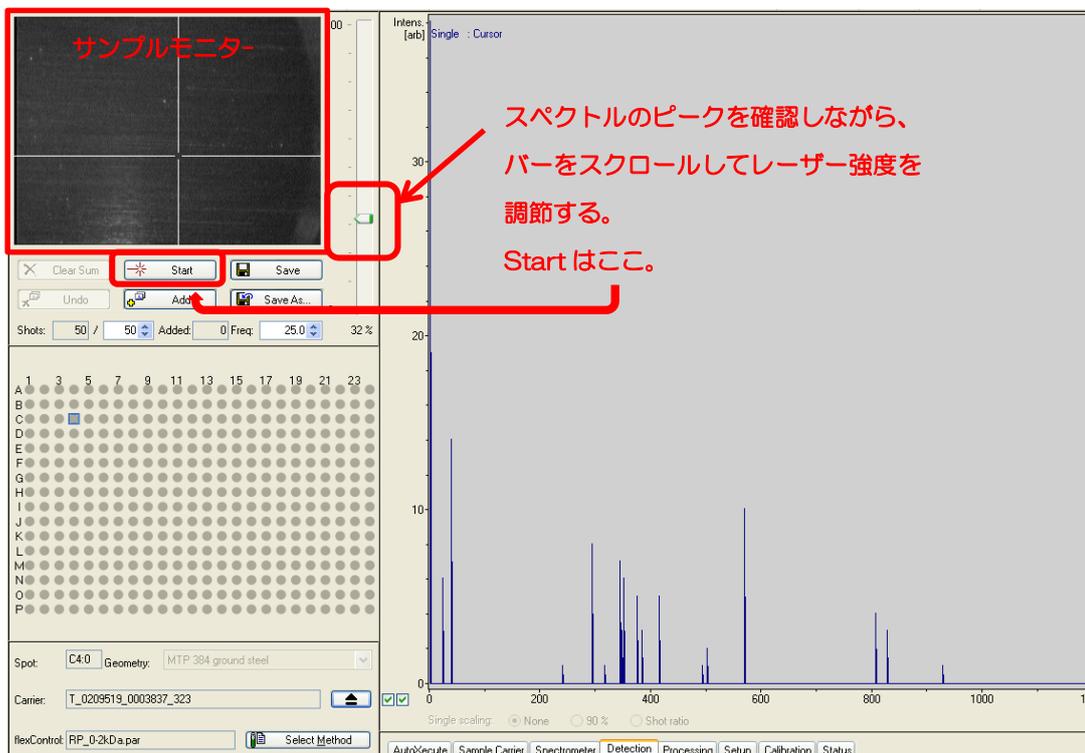


**\*キャリブレーション測定（下図参照）**

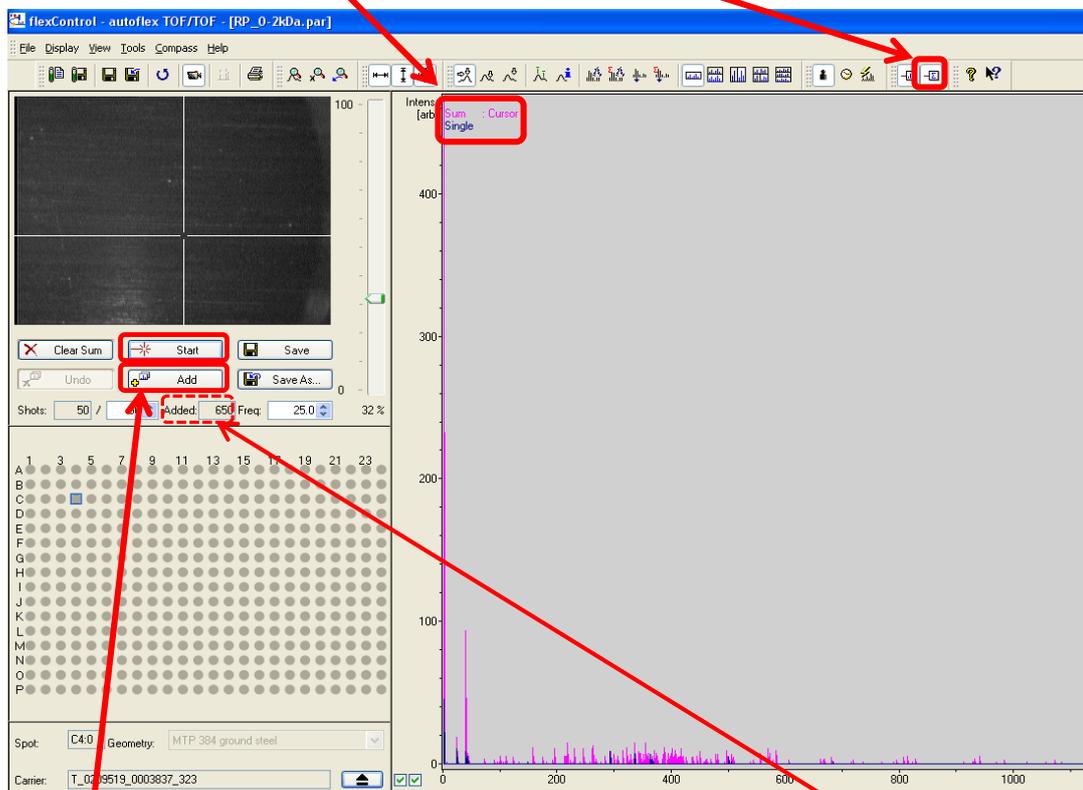
12. マウスでCCDカメラの位置をターゲットプレートの上のキャリブレーション溶液をのせたスポットに合わせて、クリックする。
13. Detection タブをクリックし、Mass Range を見て自分が選択したメソッドに間違いがないかを確認する。
14. レーザー強度を 0%にする。



15. マウスのホイールを動かして、少し（5%前後）ずつレーザー強度を上げ **Start** をクリックする。
16. サンプルモニターの内側をクリックすると、そのポイントにレーザーが照射されるようにターゲットが移動するので、位置の微調整を行う。
17. 操作 15 と 16 を繰り返し行いながら PEG のピークがはっきりと見られるようにレーザー強度を調節する。  
(レーザー強度は 30%~50%くらいが適している。最高でも 60%とする。それ以上になると機械が故障する可能性が大)



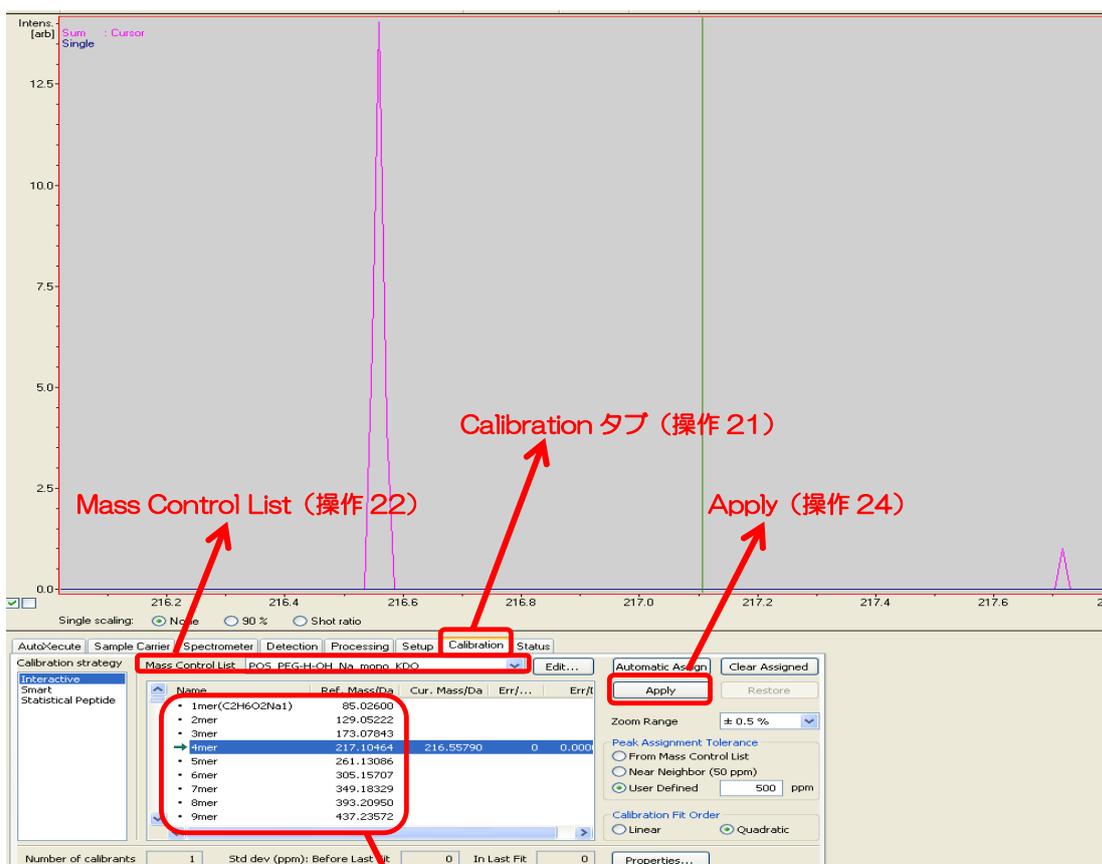
18. ツールバーの $\Sigma$  (積算) ボタンをクリックする。チャート右上にピンク色で Sum と表示されるのを確認する。



19. AddとStartを繰り返しくリックし、S/N比 (信号対雑音比) を上げていく。

20. 青色で表示されているピークがほぼなくなるまで操作 20.を繰り返し行う (目安としては Added の値が 1000 前後)。

21. Calibration タブをクリックする。
22. Mass Control List の **POS-PEG-H-OH-Na-mono-KDO** を選択する。
23. Mass Control List 下に表示される 2mer~の中から自分のサンプル分子量の-150~200 のものをクリックし、チャート内の赤の縦線の左側で左クリックする。
24. Apply をクリックする。
25. 操作 23 および 24 を自分のサンプル分子量の±150~200 の範囲のもの全てに対して行う。

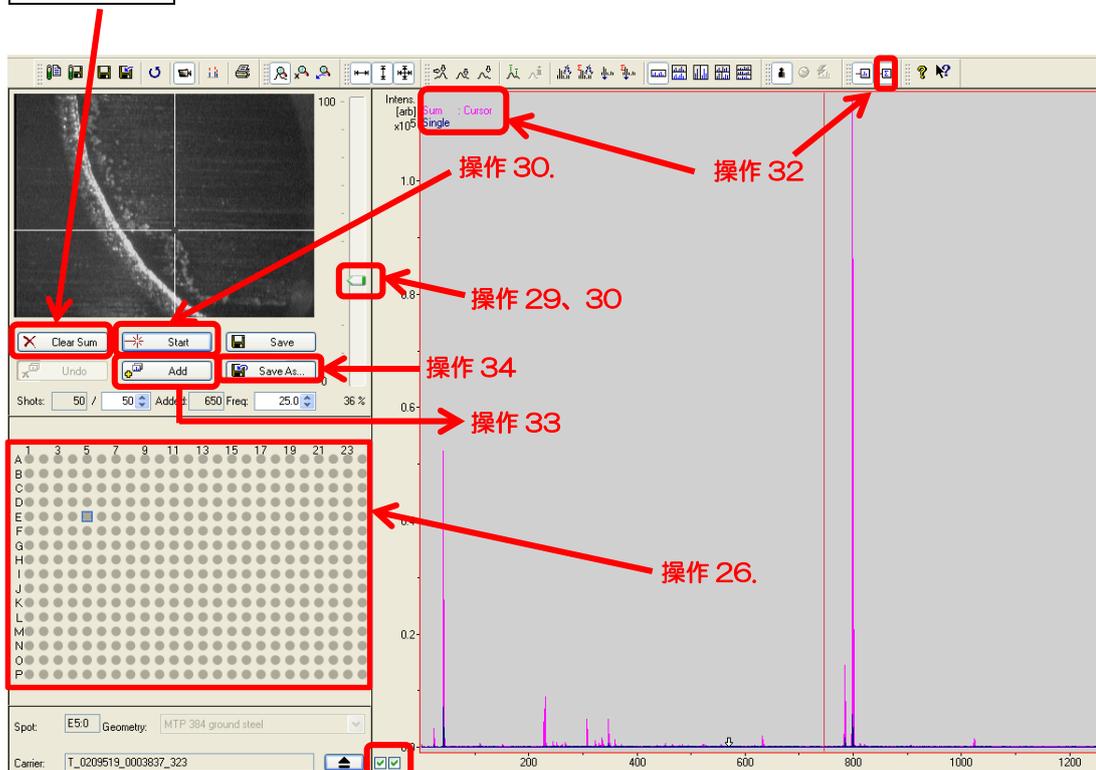


この中から自分のサンプルの分子量の±150~200 の範囲のものを選択。(操作 23、24)

### \*本サンプル測定

26. マウスで CCD カメラの位置をターゲットプレートの上のサンプル溶液に合わせて、クリックする。

27. **Clear Sum** をクリックする (キャリブレーションのデータを消去する)。



28. チャート左下にある口に  を 2 か所とも入れる。

29. レーザー強度を 0% にする

30. マウスのホイールを動かし、少し(5%前後)づつ強度を上げ **Start** をクリックする。

31. 表示されたグラフの強度 (チャート縦軸) が  $10^4 \sim 10^5$  になるようにレーザー強度を調節する。調節の仕方は操作 16~18 を参照。

32. ツールバーの **Σ (積算)** ボタンがクリックしてあり、チャート右上にピンク色で Sum と表示されているのを確認する。

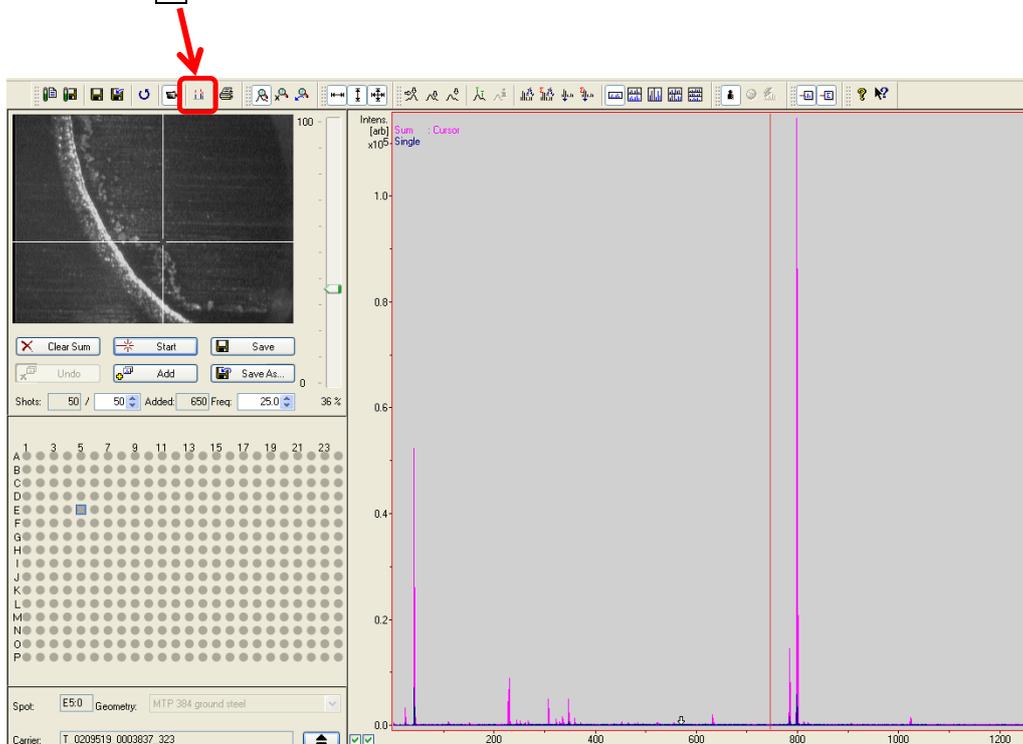
33. **Add** と **Start** を繰り返しくリックし、青色で表示されているピークがほぼなくなるまで行う (目安としては Added の値が 1000 前後)。

34. **Save As** をクリックしデータを保存する。

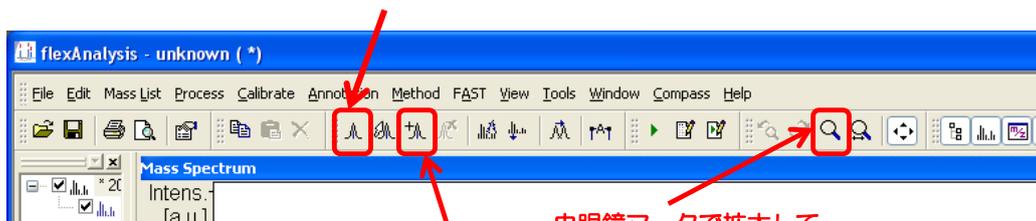
Browse⇒DATA フォルダ⇒Data(D:)⇒指導教官名フォルダ⇒自分のフォルダ⇒  
Choose⇒Sample name を入力 (半角英数字、文字制限なし) ⇒Save

## ◎データ解析&印刷

35. ツールバー  をクリックする。

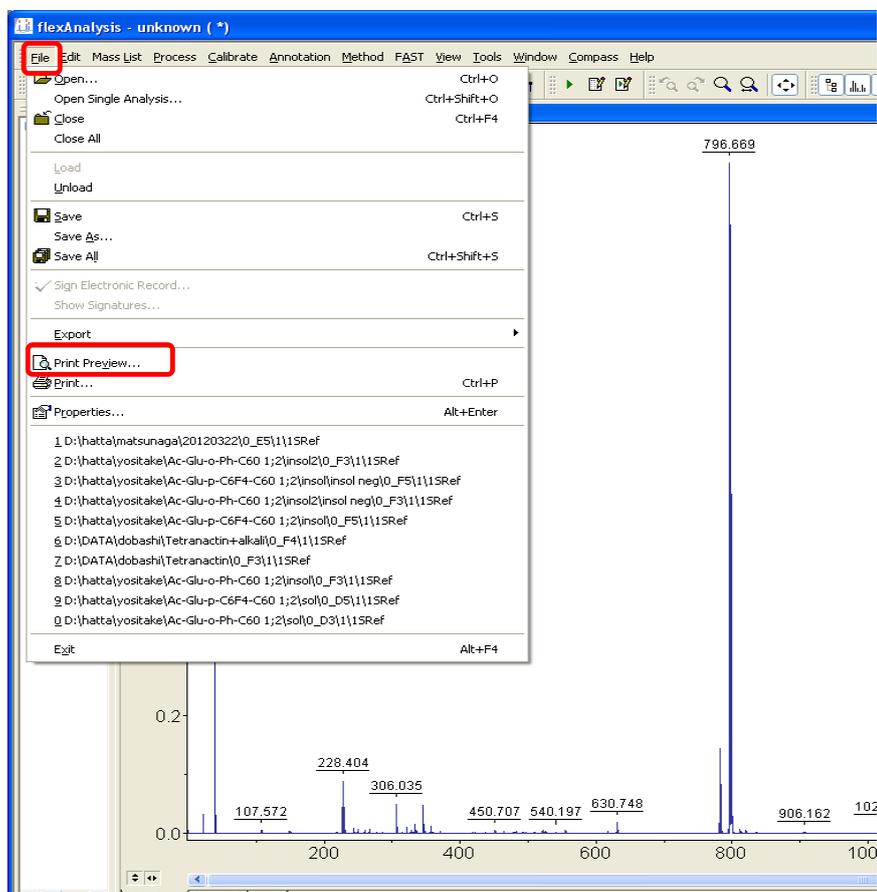


36. 解析ソフトが起動したら、**Find Mass List** をクリックする。

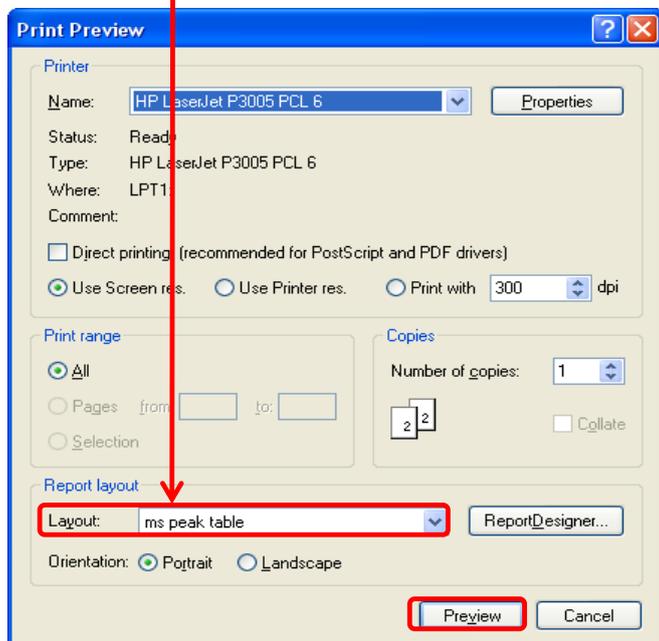


虫眼鏡マークで拡大して、  
ここをクリックするとピークを追加する  
ことができる (必要に応じて行う)。

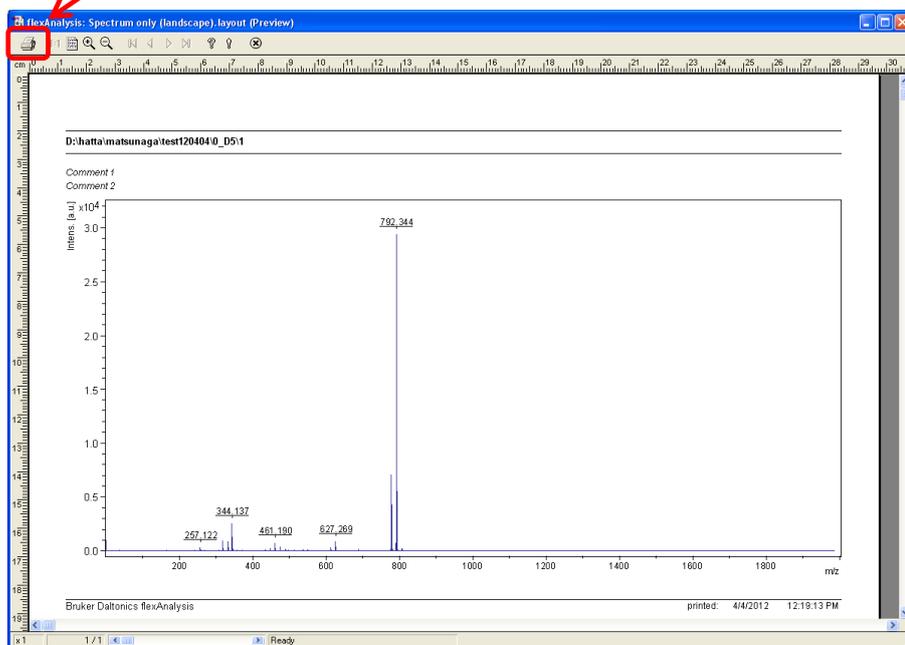
37. File → Print Preview を選択



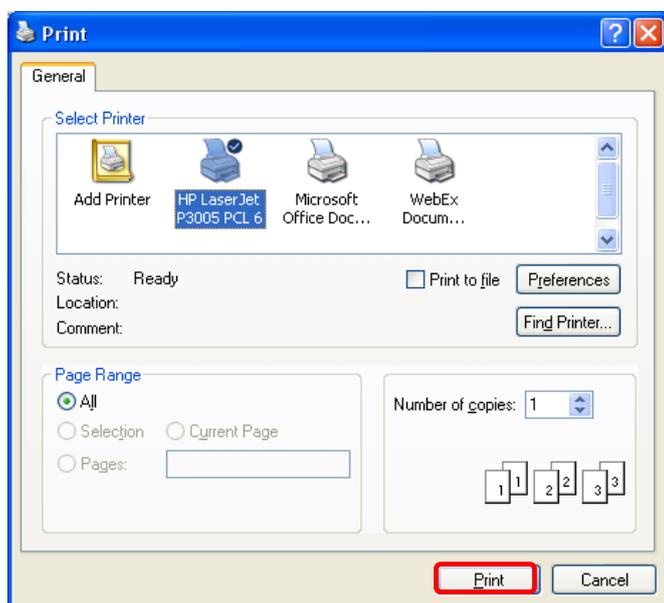
38. Report layout のバーから Spectrum only (landscape) を選択し、Preview をクリックする。



39. 左上のプリンターマークをクリックする。



40. Print をクリックする。



41. 画面右上の  で Print Preview を閉じる。

42. 再び、 →  を選択（操作 37 と同じ）。

43. Report layout のバーから ms peak table を選択し、 をクリックする。

44. 操作 39~41 を行う。

---

## ◎終了操作

45. flexAnalysis 画面を右上の☒で閉じる。英語でメッセージが表示されるので「No」を選択する。
46. Eject をクリックし、ターゲットプレートを取り出す（取り出す際に取り出し口に人 or 物が当たると機械が故障するので注意）。
47. ターゲットプレートを取り出したら、Eject をクリックし、ターゲットプレートに乗せるトレイを機械の中に入れる。
48. flexControl 画面右下にある 2 か所のインジケータが黄⇒緑になったことを確認する（トレイが入るとインジケータの表示が自動的に変わる）。
49. 画面右上の☒で flexControl を閉じる。英語でメッセージが表示されるので「No」を選択する。
50. PC をシャットダウンし、プリンターの電源を OFF にする。
51. 使用記録簿に time【使用時間】を記入する。
52. ターゲットプレートをプレート台座から外す。  
※台座の金具が外れていないかどうか確認すること。
53. ターゲットプレートは測定終了後、サンプルが溶ける溶媒で拭く。  
**※注意：直接、プレートに溶媒をかけると裏面のプラスチックが溶け、プレートが使えなくなるので絶対に溶媒をかけないこと。**