地域イノベーション共用化装置

BRUKER autoflex I 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 I 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。

<u>◎測定準備(基本的に各研究室にて行う)</u>

•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	226.230	ナに合き古いての心だに用いたわる
(1,8-Dihydroxy-9[10H]-anthracenone)		主にロバ南カナの力彻に用いられる
CHCA	189.169	ペプチド測定を中心に標準マトリックスとし
$(\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-cinnamic Acid)		て最も多く用いられる
DHBA	154.120	水溶性が高く、糖鎖・複合脂質・(極性の高い)
(2,5-Dihydroxy-benzoic Acid)		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	224.211	ティッパク計測に用いたわる
(3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic Acid)		王にタンハン計測に用いられる
HABA	242.233	主に合成高分子、ペプチド/タンパク質の分析
(2-(4-hydroxy phenylazo)benzoic Acud		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1µl)ずつ秤量する。
- ② ①で秤量したものに THF を 100 µ1 ずつ添加し、1mg/100 µ1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 μ1 とマトリックス溶液 10 μ1 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 1μl とマトリックス溶液 10μl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1µl)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 µ1 ずつ添加し、 1mg/100 µ1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 μ1 とマトリックス溶液 10 μ1 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 μ1ずつ添加し、1mg/100μ1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 1µ1 とマトリックス溶液 10µ1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1µl)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 µ1 ずつ添加し、 1mg/100 µ1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 μ1 とマトリックス溶液 10 μ1 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100μ1ずつ 添加し、1mg/100μ1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 1μl とマトリックス溶液 10μl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

- 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 µ1 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。



*準備

- 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。
- 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、 <u>ズレがないように</u>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)。



<u>注意!!</u> 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、<u>Open</u>をクリックする(通常は*²RP_O-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 <u>Vacuum</u>の文字をクリックする。

AutoXecute Sample Carrier	spectrometer Detection Processing Setup Calibration Status	
Status Instrument is operating	Details	ו
Processor Subsystem:	Ready	
High Voltage:	Ready	
Laser and Trigger:	LTB MNL106, Laser is operating	Uperate
Digitizer:	Acqiris DP240 Version 1.5 Temperature 37.00 °C Memory 262144 kB Serial 21501 Bus 2 Slot	Standby
Vacuum:	Ready	
Sample Carrier:	Out	
Display Info:	Show Version Status Info: Report	r

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。1~2e⁻⁶ またはOOe⁻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

Check Pressures			
Lock Rough:	4.3e-2	mbar	
Source Rough:	4.4e-2	mbar	
Source High:	1.9e-7	mbar	
Analysator Rough:	N/A	mbar	
Analysator High:	N/A	mbar	
		ancel	

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ーが黄⇒緑になるまで待つ。 (黄⇒赤になったら指導教官に連絡)

	🔠 flexControl - autoflex TOF/TOF - [RP_0-2kDa.par]	
	Elle Display Yew Iools Compass Help	
		1 4 7 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
Center: ND_TARGET Center: ND_TA	Stat Stat Stat Stat Stat Stat Stat Stat Stat Stat Stat Stat Stat Stat Stat Stat <th></th>	
HeCovied (RP_0-03Dapar) Setect Method Add/Cock Sector Sector Method Detail	Camer: NO_TARGET	V V V 200 400 800 800 1000 1200 1400 1600 1600 Strip strips = 0.0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
ar Holp, press F1 Reflector tof-user Reflector tof-user Reflector tof-user Reflector tof-user Reflector tof-user	BalControl (RP_03D3par	Advidence Sample Carine Spectrometer Detection Processing Stature Mature Instrument is operating Details Processor Suboptien: Ready High Voltage: Ready Digitizer Acquire DP2400 Version 15 Temperature 27.00 °C Memory 202744188 Senid 275018 Sez 2564 Sample Carine: Out Digitizer: Out Digitizer: Out Digitizer: Out Digitizer: Out
🗗 start 🔰 📾 🕤 🕙 🔛 finiciand-autoin	For Help, press F1	Reflector tof-user RRADY O
	🛃 start 🔄 😂 😂 🖉 🔠 🛃 flexControl - autoflex	50 H

*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、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. <u>サンプルモニターの内側</u>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 以上にすると機械が故障する可能性が大)





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。



*本サンプル測定

- 26. マウスで CCD カメラの位置を<u>ターゲットプレートの上</u>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」に回を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 10⁴~10⁵ 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. <u>Add と Start</u>を繰り返しクリックし、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



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



37. File→Print Preview を選択

🛄 flexAnalysis - unknown (*)							
File dit Mass List Process (alibrate Annotation Metho	d F <u>A</u> ST <u>V</u> iew]	ools <u>W</u> indo	w <u>C</u> ompass	s <u>H</u> elp			
Dpen		Ctr	+0	I ► 🕅	M 8%	~ Q Q		ل الم
Open Single Analysis		Ctrl+Shift	+0			5 1 41		Turret
🖬 🖆 Close		Ctrl	-F4					
Close All						796.669		
Load								
Unload								
Save		Cti	H+S					
Save <u>A</u> s								
🗐 Save Aļ		Ctrl+Shif	+5					
Sign Electronic Record								
Show Signatures								
Export			•					
Rrint Preview								
Brint		Cti	HP					
Properties		Alt+E	ter					
<u>1</u> D:\hatta\matsunaga\2012	0322\0_E5\1\1SRef							
2 D:\hatta\yositake\Ac-Glu-c	o-Ph-C60 1;2\insol2\0_F3\1\19	iRef						
<u>3</u> D:\hatta\yositake\Ac-Glu-p	>-C6F4-C60 1;2\insol\insol neg	\0_F5\1\1SRef						
<u>4</u> D:\hatta\yositake\Ac-Glu-c	>-Ph-C60 1;2\insol2\insol neg\(D_F3\1\15Ref						
5 D:\hatta\yositake\Ac-Glu-p	>-C6F4-C60 1;2\insol\0_F5\1\1	lSRef						
<u>6</u> D:\DATA\dobashi\Tetranac	tin+alkali\0_F4\1\1SRef							
Z D:\DATA\dobashi\Tetranac	tin\0_F3\1\1SRef							
8 D:\hatta\yositake\Ac-Glu-c	3-Ph-C6U 1;2\insol\U_F3\1\15F ccc1, ccc1, cl, llo, p51414c	ker To (
9 D: (natta (yositake (Ac-Giu-p)-C6F4-C6U 1;2(50(U_U5(1(15 - DF 660 1;2(50(U_U5(1(15	er.						
0 D: (Hatta (Yositake (AC-GIU-C		51						
Exit		Alt	-F4					
0.2-								
	228.404							
	3	06.035			7.00			
	<u>107.572</u>	4	50,707 <u>540</u>	<u>).197</u> <u>630</u>	./48		<u>906.162</u>	<u>102</u>
0.0	<u> </u>	<u>.).(41</u>			·	U		
	200	400		600		800		100
֥)							1111

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

P	rint Preview		? 🛛
	Printer		
	<u>N</u> ame: HP	aserJet P3005 PCL 6	Properties
	Status: Read	1 <mark>9</mark>	
	Type: HPL	aserJet P3005 PCL 6	
	Comment:		
	Direct printing	(recommended for PostSc	ript and PDF drivers)
	 Use Screen 	es. 🔿 Use Printer res.	O Print with 300 🗘 dpi
	Print range		Copies
	<u>⊙ A</u> ∥		Number of <u>c</u> opies: 1
	O Pages from	to:	
	◯ <u>S</u> election		
	Report layout -		
	Layout: ms	peak table	Report <u>D</u> esigner
	Orientation: 💿	Po <u>r</u> trait O <u>L</u> andscape	
			Pre <u>v</u> iew Cancel

39. 左上のプリンターマークをクリックする。

Biflex	Analysis: Spectrum of	nly (landscape).layout (Preview)									
cm (0		4 5 6 7 8 9	10 11	12 13 14	15 16	17 18 1	9 20 21	22 23 24	25 26	27 28	29 30
9											
1											
2	D:\hatta\matsuna	aga\test120404\0_D5\1									
3	Comment 1 Comment 2										
4	= ×104			700.044							
2010010	3.0 -			792,344							
70	26-										
8	2.5										
9	2.0										
10	-										
11	1.5										
12											
131	1.0-										
141	0.5										
15		344,137	627 269								
17=	0.0	257,122		<u> </u>	4000	· · · ·	·	1000	·		
185		200 400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800	miz	
19	Bruker Daltonics f	1exAnalysis						printed:	4/4/2012	12:19:13 PM	<u> </u>
×1	1/1	Ready									

40. Print をクリックする。

Print 🛛	?×
General	
Select Printer	
Add Printer HP Laser Jet Microsoft P3005 PCL 6 Office Doc	WebEx Docum
Status: Ready Location: Comment:	Print to file Preferences
Page Range All Selection	Number of <u>c</u> opies:
	11 22 33
	Print Cancel

41. 画面右上の× で Print Preview を閉じる。

42. 再び、File→Print Previewを選択(操作 37 と同じ)。

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

44. 操作 39~41 を行う。

<u>◎終了操作</u>

- 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を 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ーが黄⇒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ー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。