

文件编号: WU-ISCMS-QM ××××××××

版本号: V1.0

受控状态:

分发号:

分子科学公共实验平台

质量管理文件

基质辅助激光脱附-高分辨飞行时间质谱 (MALDI-TOF) MALDI-TOF Shimazu Axima-Performance 标准操作规程

2022年10月23日发布

年 月 日实施

分子科学公共实验平台 发布

目 录

1. 目的.....	1
2. 范围.....	1
3. 职责.....	1
4. 质谱实验室安全管理规范.....	2
4.1. 进入或离开实验室规定.....	2
4.2. 实验操作规定.....	2
4.3. 气瓶使用规定.....	3
5. 质谱实验室仪器设备管理规范.....	4
5.1. 基质辅助激光脱附-高分辨飞行时间质谱(MALDI-TOF)预约与使用.....	4
5.2. 预约制度.....	4
5.3. 培训考核制度.....	5
6. 实验内容.....	6
6.1 样品的准备.....	6
6.1.1 样品靶板.....	6
6.1.2 制样.....	6
6.2 软件.....	10
6.2.1. 基理登陆.....	10
6.2.2. 设备组成介绍.....	10
6.2.3. 软件.....	11
6.3 测试.....	13
6.3.4.1. 放样.....	13
6.3.4.2. 运行标准品(Reflectron)并校正仪器.....	17
6.3.4.2.1. 标品选择.....	17
6.3.4.2.2. 采集方法编辑.....	17
6.3.4.2.3. 运行标准品 (Reflectron).....	22
6.3.4.2.4. 标准谱图处理 (Reflectron).....	24
6.3.4.2.5. 标准谱图校正 (Reflectron---isotope calibration).....	28
6.3.4.3. 样品测试 (Reflectron).....	31
6.3.4.4. 运行标准品 (Linear)并校正仪器.....	31

6.3.4.4.1. 标准谱图处理(Linear)	32
6.3.4.4.2. 标准品校正(Linear---average calibration).....	35
6.3.4.4.3. 样品测试 (Linear)	37
6.4 数据导出.....	37
6.5 关机.....	37
6.6 实验结束处理.....	38
7. 相关/支撑性文件	38
8. 记录.....	38
9. 附件.....	38
附录一 标准品分子量信息表	39
附录二 靶板清洗方法	40

分子科学公共实验平台

1. 目的

建立基质辅助激光脱附-高分辨飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF)使用操作规程, 使其被正确、规范地使用。

2. 范围

本规程适用于所有使用基质辅助激光脱附-高分辨飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF)的用户。

3. 职责

3.1. 用户: 严格按本程序操作, 发现异常情况及时汇报实验室技术员。

3.2. 实验室技术员: 确保操作人员经过相关培训, 并按本规程进行操作。

3.3. 文章致谢格式:

根据学校指导意见, 使用各校级平台仪器设备表征产生的科研成果必须致谢平台。如果您在文章成果中使用了光谱、色质谱、磁共振波谱以及其他属于分子科学平台的仪器设备, 请务必在文末致谢分子科学公共实验平台。

英文文章致谢:

① Acknowledgement: The author thanks (Dr. XXX from) Instrumentation and Service Center for Molecular Sciences at Westlake University for (the assistance/discussion/supporting in) ... measurement/data interpretation.

② Coauthorship on the resulting publications would be appreciated if our staff make technical contributions (including but not limited to critical sample preparation, novel experiment designation and comprehensive data analyzation).

Affiliation address: "Key Laboratory of Precise Synthesis of Functional Molecules of Zhejiang Province, School of Science, Instrumentation and Service Center for Molecular Sciences, Westlake University, 18 Shilongshan Road, Hangzhou 310024, Zhejiang Province, China."

中文文章致谢:

① 致谢: 感谢西湖大学分子科学公共实验室平台 XXX 博士(或者 XXX 老师)在.....表征或数据分析上提供的帮助。

② 共同作者: 如果分子科学平台老师在您课题组样品表征或文章发表上有重要技术贡献(包括但不限于关键样品制备、新型实验设计和深度数据分析), 我们感谢您将相关老师列为共同作者, 作者单位地址如下: 西湖大学, 分子科学公共实验平台, 功能分子与精准合成浙江省重点实验室, 杭州, 310030, 浙江。

4. 质谱实验室安全管理规范

4.1. 进入或离开实验室规定

- 4.1.1. 进入实验室之前必须通过学校、中心和平台的安全考试或考核, 严格遵守本实验室的各项安全警示标识。
- 4.1.2. 进入质谱实验室, 请仔细阅读本实验室的安全管理规定。
- 4.1.3. 进入实验室需穿戴实验服, 严禁穿拖鞋、高跟鞋进入实验室, 长发请束发。
- 4.1.4. 进入实验室应了解消防器具与紧急逃生通道位置, 实验室通道及消防紧急通道必须保持畅通。
- 4.1.5. 严禁将自己授权的门卡转借他人, 一旦发现将进行禁用处理。
- 4.1.6. 禁止将实验无关人员带入实验室。
- 4.1.7. 严禁在实验室饮食、吸烟或随意走动。
- 4.1.8. 夜间实验, 需两人在场。
- 4.1.9. 为保持实验室内环境温度及湿度稳定, 进入实验室后保持实验室门窗关闭。实验结束后, 实验人员必须进行清场。最后离开实验室人员需检查水、电、门窗等。
- 4.1.10. 严禁戴手套接触门把手或电梯。禁止随意丢弃实验废弃物。
- 4.1.11. 实验室应保持整洁, 严禁摆放与实验无关的个人物品。
- 4.1.12. 空压机及 UPS 所处房间应使用空调, 要保持室内空气干燥, 在潮湿的季节应该除湿。至少每周一次检查除湿机有无积水。

4.2. 实验操作规定

- 4.2.1. 实验室内均为大型科研设备, 有专人负责管理, 未经培训人员, 不得擅自上机使用。
- 4.2.2. 送样或自主上机的用户, 均需使用大仪系统进行系统。
- 4.2.3. 请严格按送样要求进行制样。由于样品问题造成色谱柱损坏或仪器配件更换, 无论独立上机或是委托测试, 费用将由用户所在课题组承担;

- 4.2.4. 请严格按仪器操作规程进行操作。实验过程中有任何不确定必须联系技术员，自主上机因操作错误造成设备或色谱柱等损坏的，该用户课题组也需承担相关费用。
- 4.2.5. 实验过程中如发现仪器设备发生异常状况、仪器报错、报警等，务必立即联系仪器负责人严禁擅自处理、调整仪器主要部件，凡自行拆卸者一经发现将给予严重处罚。
- 4.2.6. 色谱类仪器，必须根据样品分离方法和要求，选择合适的色谱柱或设置洗脱梯度、进样盘等，因用户本人选择色谱柱或梯度设置错误，导致仪器故障或色谱柱耗材损坏的，所有费用由课题组全权负责。
- 4.2.7. 仪器均为高压设备，使用仪器需严格遵守用电安全规定，严禁擅自更改电路或切断仪器电源等相关危险操作。
- 4.2.8. 实验室内的药品、试剂必须存放药品柜，并做好使用登记。
- 4.2.9. 使用化学试剂或药品前，必须了解其物理化学性质、毒性及防护方法，使用时必须配戴护目镜、手套等，做好个人防护。
- 4.2.10. 非常规实验测试须技术员同意并指导方可进行。实验数据须通过学校数据中心进行下载，禁止将个人 U 盘、移动硬盘等易带入病毒的存储设备与各色质谱仪器工作站连接拷贝数据。
- 4.2.11. 垃圾、废液必须严格按标识进行分类，禁止将锐器、玻璃丢弃在常规垃圾箱中。
- 4.2.12. 自主上机用户须在预约时间内须使用本人的账号登陆基理系统进行仪器使用；使用结束应做好仪器使用等级，如实记录仪器使用状态。

4.3. 气瓶使用规定

- 4.3.1. 首次使用实验室气瓶，须经实验室技术员培训指导。
- 4.3.2. 请按实验室气瓶标识选择正确的气源。
- 4.3.3. 打开气瓶，先确认管路已连接稳妥，禁止未接气路或气路未连接稳妥，开气瓶减压阀。
- 4.3.4. 更换气瓶，首先确保减压阀关闭，且管路中气压排空归零，先用扳手拧松后，再用手旋下管路。换气瓶，确认气瓶螺纹吻合后，先手紧气体管路，再用扳手拧 1/8 圈左右。
- 4.3.5. 开气瓶或更换气瓶，禁止站在减压阀出气口正前方。

4.3.6. 测试过程中, 请根据需要及时更换气瓶。使用者应根据气瓶使用情况, 变更气瓶使用牌状态“满瓶”“使用中”“空瓶”等。

4.3.7. 气瓶应保持正立并固定。

5. 质谱实验室仪器设备管理规范

5.1. 基质辅助激光脱附-高分辨飞行时间质谱(MALDI-TOF)预约与使用

该仪器遵从学校“科研设施与公共仪器中心”对大型仪器设备实行的管理办法和“集中投入、统一管理、开放公用、资源共享”的建设原则, 面向校内所有教学、科研单位开放使用; 根据使用机时适当收取费用; 并在保障校内使用的同时, 面向社会开放。

该仪器的使用实行预约制度, 请使用者根据样品的测试要求在学校“大型仪器共享管理系统”(以下简称大仪网)进行预约, 并按照要求登记预约信息。根据预约制度可登陆大仪网站即时预约机时, 包括周末; 寒暑假及国庆假期将另行通知。

1. 委托测试

- ① 送样前与仪器负责人沟通样品信息。
- ② 请在大仪网进行送样预约并将制备好的样品交给仪器负责人。
- ③ 测试结果请通过数据中心进行下载。
- ④ 样品如需回收请在测试后尽快取回, 一周未取回平台将作化学废弃物处理。

2. 自主上机

- ① 质谱仪器培训至少需要两小时, 申请培训前先与仪器负责人联系。
- ② 请在大仪网预约培训机时, 培训时请携带纸质版仪器培训申请表。
- ③ 技术员进行现场培训。
- ④ 培训后两周内, 用户可在技术员指导下用实际样品进行上机测试, 并按自主上机计费; 根据自身掌握情况, 用户需在两周内进行上机考核, 考核通过的用户即获得自主上机权限, 原则上一星期复考; 未考核或考核不通过的用户, 需重新接受培训。

5.2. 预约制度

为充分利用仪器效能、服务全校科研工作, 根据测试内容与时间的不同, 实验室仪器需进行网上预约制度。基质辅助激光脱附-高分辨飞行时间质谱 (MALDI-TOF)使用涉及流动相更换, 自主上机用户需根据预约制度登陆大仪共享网站最少提前 30 分钟预约机时, 包括周末; 寒暑假及法定节假日请关注实验室实时通知。

请严格遵守预约时间使用仪器, 以免浪费机时。如需调换时间段, 在技术员同意下可与其他使用者协商。因故不能在预约时间内测试者, 请提前 30 分钟取消预约并通知技术员。恶意预约机时或有多次无故不遵预约时间的用户, 实验室将进行批评教育、通报批评或取消上机资格等处罚。

预约时段		预约时间	测试内容
周一至周日	09:00 至 22:00	不限制	分子量表征

- (1) 校内使用者须经过技术员的实验操作培训, 考核合格后方可上机使用;
- (2) 实验开始时务必在实验记录本上登记, 结束后如实记录仪器状态;
- (3) 严禁擅自处理、拆卸、调整仪器主要部件。使用期间如仪器出现故障, 使用者须及时通知技术员, 以便尽快维修或报修, 隐瞒不报者将被追究责任, 加重处理;
- (4) 因人为原因造成仪器故障的 (如硬件损坏), 用户课题组须承担维修费用;
- (5) 本实验室所有原始数据不允许在仪器工作站上删改, 尤其不允许用 U 盘与移动硬盘直接拷贝。用户应根据要求通过科研仪器网/数据服务器传送下载原始数据至本地电脑, 以保存并做数据处理; 实验数据在本实验室电脑中保留 2 年。
- (6) 用户应保持实验区域的卫生清洁, 测试完毕请及时带走样品, 技术员不负责保管。

使用者若违犯以上条例, 将酌情给予警告、通报批评、罚款及取消使用资格等惩罚措施。

5.3. 培训考核制度

校内教师、研究生均可提出预约申请, 由技术员安排时间进行培训, 培训内容包括仪器使用规章制度、送样须知及安全规范、基本硬件知识、标准操作规程 (自主测试) 及相应数据处理。

培训结束后, 两周内培训者需管理人员监督下进行 5 次左右操作, 培训者根据自己的掌握程度, 联系技术员进行上机考核。初级考核合格后, 可在管理人员监督下上机操作, 一周后复考;

实验室技术员认为培训者达到独立操作水平后, 给予培训者授权在所允许的可操作实验范围内独立使用仪器。如果因为人为操作错误导致仪器故障者, 除按要求承担

维修费用之外, 给予重考惩罚、培训费翻倍。

对接受培训人员的核心要求:

(1) 了解基质辅助激光脱附-高分辨飞行时间质谱 (MALDI-TOF) 仪的基本原理及其应用的多学科背景知识;

(2) 熟练掌握 Shimazu Biotech 软件使用, 严格按照标准操作规程操作, 防止因人为操作不当造成仪器故障, 认真做好仪器的使用及故障记录。

6. 实验内容

6.1 样品的准备

6.1.1 样品靶板

型号: DE1580TA

行标: A-P, 纵标: 1-24, 384个点位

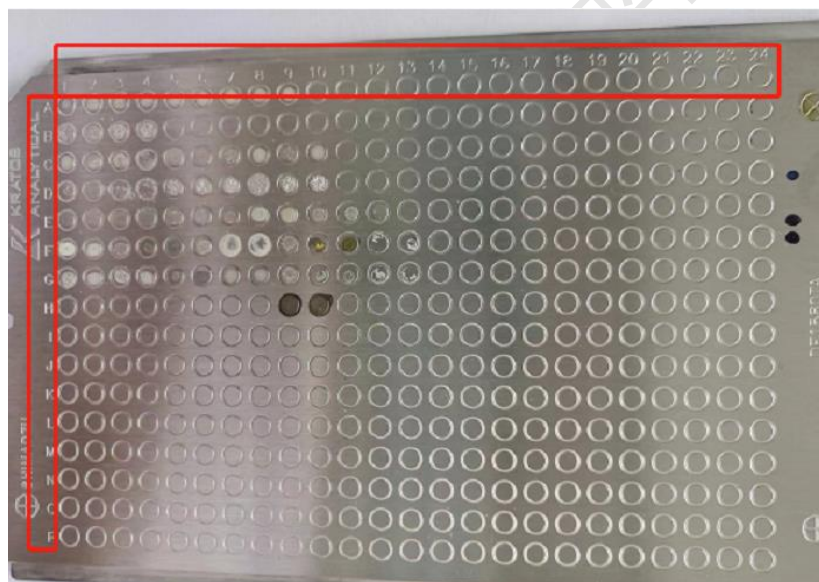


图 6-1

6.1.2 制样

(1) 样品点与标准点位置分布 (分开点样):

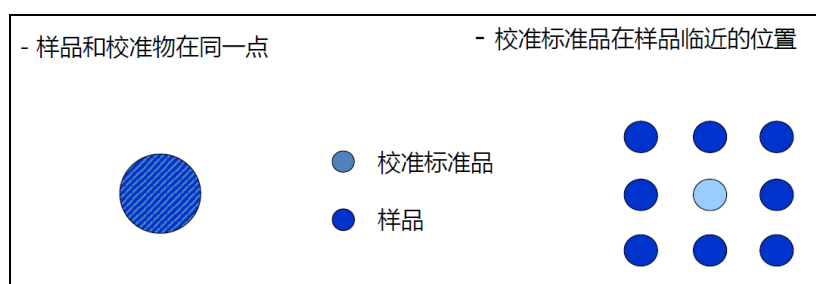


图 6-2

(2) 标准品作用及选择

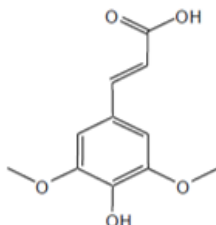
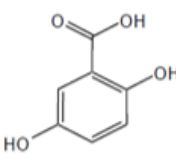
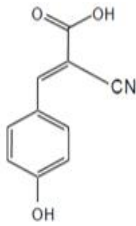
标准品作用：校正TOF质量轴

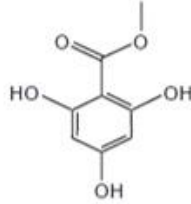
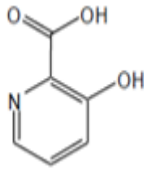
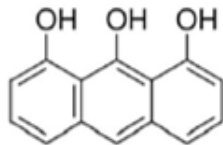
目前平台所用标品及分子量分布，详见附件一。

(3) 基质选择

基质的选取一般遵循“相似相溶”原则，通常选择与待测样品极性相似、溶解度相近的基质，这样可以使样品和基质可以形成良好的共结晶体。

常用基质及选择参加下表：

样品类型	基质	基质结构式
proteins/glycos/polar polymers	SA	 <p>Sinapinic acid (SA) 芥子酸</p>
proteins/glycos/sugars/polar polymers	DHB	 <p>2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) 2,5-二羟基苯甲酸</p>
proteins/glycos/sugars/polar polymers	super-DHB	
peptides	CHCA	 <p>α-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid(CHCA) α-氰基-4-羟基肉桂酸</p>
peptides/proteins	HABA	

oligonucleotides	THAP/HPA	 <p>2',4',6'-Trihydroxyacetophenone monohydrate (THAP) 2,4,6-三羟基苯乙酮</p>  <p>3-hydroxypicolinic acid (3-HPA) 3-羟基-2-吡啶甲酸</p>
nonpolar polymers	Dithranol/ IAA	 <p>Dithranol 1,8,9-蒽三酚</p>

(4) 浓度与溶剂

样品浓度: 1-10 mg/mL 级别, 分子量大的聚合物样品可以适当增加浓度 (5-10 mg/mL), 分子量小的样品适当降低样品浓度。

可以配制 1000 pmol/uL 的样品母液, 按照 2-100 pmol 的上样量进行点样。

基质浓度: 一般基质按照 10 mg/mL 配制, SA: 20 mg/mL, 3-HPA: 50 mg/mL, DHB 也可以配制为 30 mg/mL(70% 甲醇溶液)

溶剂: 水、乙腈溶液、甲醇、乙醇、四氢呋喃、氯仿、氯苯等具有挥发性的溶剂。

TOFMIX 试剂盒中的稀释液:

标准品稀释液-30%乙腈水溶液, 含 0.1% TFA;

基质稀释液-50%乙腈水溶液, 含 0.1% TFA, 适用 CHCA、SA、DHB、3-HPA 等多数基质; 除此之外, 蒽三酚、DCTB 等基质推荐使用四氢呋喃、三氯甲烷作为溶剂。

含盐量要求:

缓冲液类型	浓度上限
磷酸盐	50 mmol
碳酸氢铵	30 mmol
Tris buffer	50 mmol
胍	1.0 mol
碱金属盐	1.0 mol
甘油	1%
叠氮化钠	1.0 mmol

(5) 点样方式

基本原则：每个样品点 2 次，减少误差。

- **快速点样法：**移液枪取 0.5-1.0 uL 样品溶液、基质溶液依次点靶，自然干燥。样品与基质溶剂性质差别较大时需要等样品溶液干燥后再点基质。
- **混合点样法：**取样品溶液、基质溶液按比例预先在 EP 管内混合，移液枪吸取 1 uL 点靶，自然干燥，此时样品及校准物质同一个点
- **“三明治”点样法：**取 1uL 基质溶液点靶，5-10 s 后将基质溶液吸走，形成基质薄膜。取 1uL 样品点靶，自然干燥。取 1uL 基质溶液点靶，自然干燥。

特殊情况：

少数情况，添加盐离子（ammonium citrate/Ag-TFA/ Na-TFA/K 盐、Li 盐、Cu 盐）可以改善共晶结构，盐溶液浓度（1mg/mL）

点样比例：样品：基质：盐的体积比 10：10：1。

禁止因素及注意事项：

- (1) 务必控制好浓度，浓度过高也会导致无信号；
- (2) 使用易挥发性溶剂，尽量不要含盐，如必须含盐，请控制好浓度（0.5%以内）；
- (3) 禁止含无机酸碱，会腐蚀靶板；
- (4) 禁止加热靶板，使用时请戴手套，握靶板两侧，切勿掉落，以免变形导致无法使用；
- (5) 请在通风橱或者洁净台内自然晾干；
- (6) 请使用靶板位置点及时记录样品点位置，建议每个样品制两个样品点；

(7) 不好溶解或难清洗样品, 使用结束后请尽快按要求进行靶板清洗;

(8) 结晶性差的样品, 点板后易脱落, 禁止直接放入系统测试, 以免样品进入腔体后, 飞升到体腔内, 影响设备性能;

(9) 禁止将含有溶剂的样品靶放入样品仓, 这将导致样品无信号且损伤设备。

重要提醒: 1) 送样人员必须对测试样品的合法性负责, 未注明合法性和物理化学性质的样品不予测试。如测试过程中发现样品含毒品类非法样品, 送样人将负法律责任。

2) 因送样溶液不符合要求而导致管道堵塞或对仪器造成损坏的, 根据情节严重情况进行通报批评、禁用或赔偿等处罚。

注意: 由于用户的样品问题导致仪器异常或配件更换, 所有责任将由用户及所在课题组或单位承担。

6.2 软件

6.2.1. 基理登陆

接入大仪网的仪器操作电脑均需要登陆基理锁屏界面。

(1) 如图 6-3(a), 如界面显示“一卡通用户”, 请在 Account 输入预约者的一卡通账户, Password 栏输入相应账户密码, 点击 Submit;

注意: 如账号或密码输入错误, 请按键盘 Delete 键进行删除, 再重新输入; 禁止点击 Cancel, 否则仪器会自行关机。

(2) 如图 6-3(b), 如界面显示“LIMS User”, Account 显示 Administrator, 请与相关老师联系。

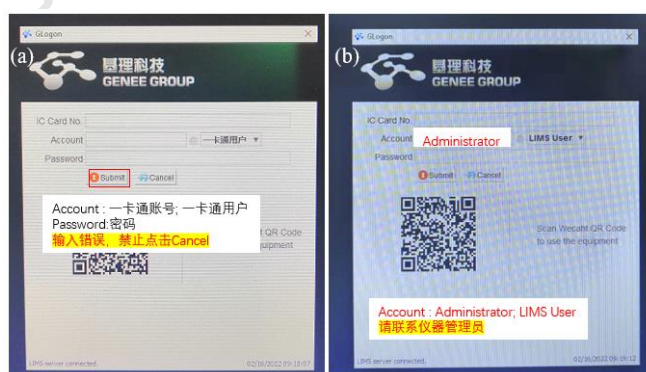


图 6-3

6.2.2. 设备组成介绍

如图 6-4, 基质辅助激光解析附电离-高分辨飞行时间质谱包括设备主机、操作电脑和显示器三部分。

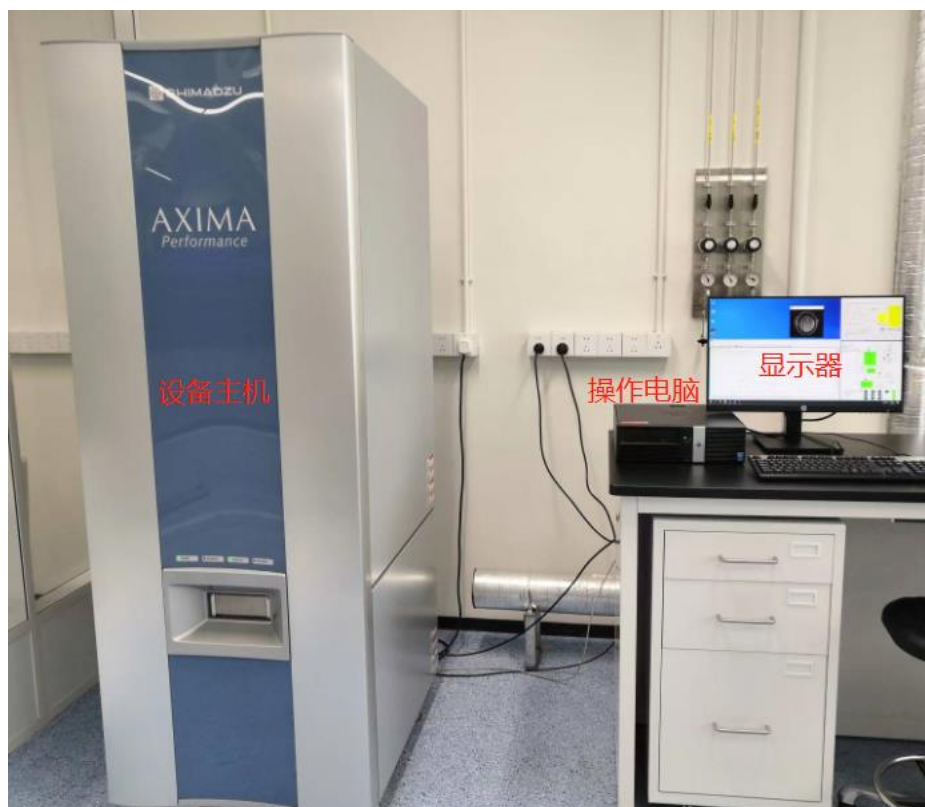


图 6-4

6.2.3. 软件

本设备常规使用软件为 Shimadzu Biotech MALDI-TOF，双击桌面软件图标即可打开。



图 6-5

注：通常使用结束后，待机后，窗口最小化，勿关闭软件。

打开软件后，会出现四个窗口：

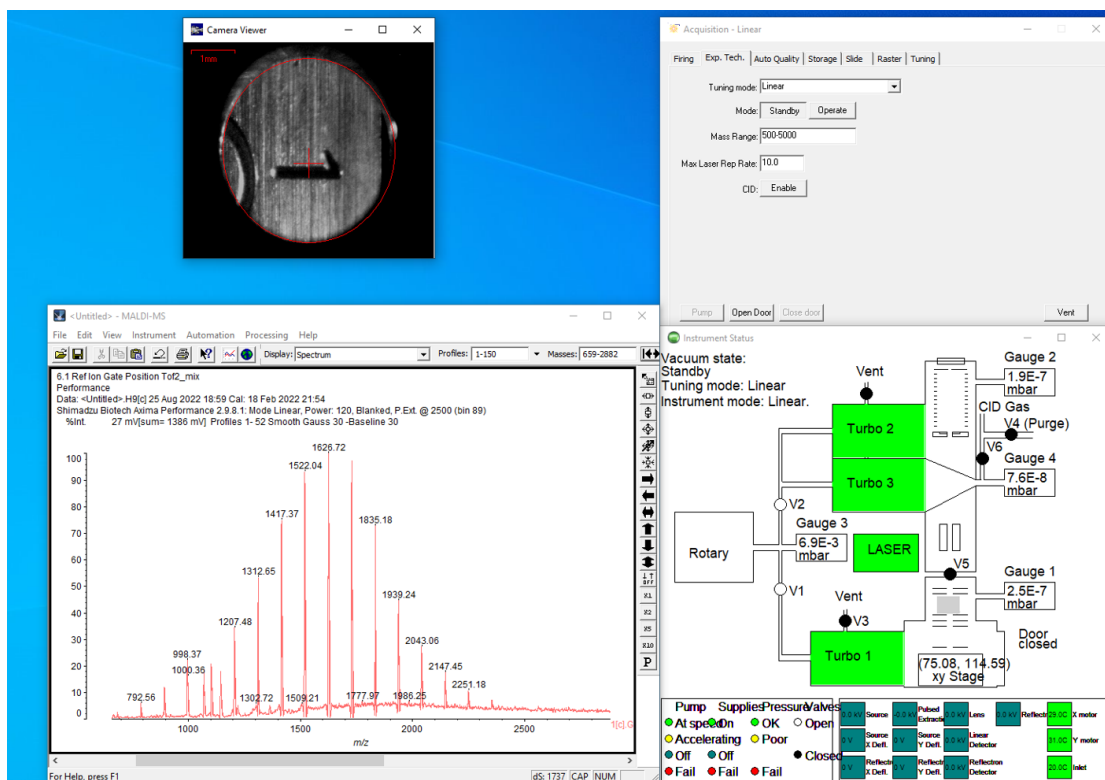


图 6-6

- (1) Camera Viewer: 样品位置光学显示窗口
作用: 确认样品位置;
- (2) Acquisition: 采集方法编辑窗口;
作用: 用于编辑样品运行的采集参数, 根据线性模式和反射模式的选择, 会出现 Acquisition-Linear 或 Acquisition-Reflectron 等显示;
- (3) MALDI-MS: 质谱显示、谱图处理保存界面
实时显示采集的样品质谱图, 并对谱图进行数据存储保存及校正;
- (4) Instrument Status: 仪器状态显示窗口
仪器真空度查看, 真空泵运行状态查看, 电压参数加载查看等。

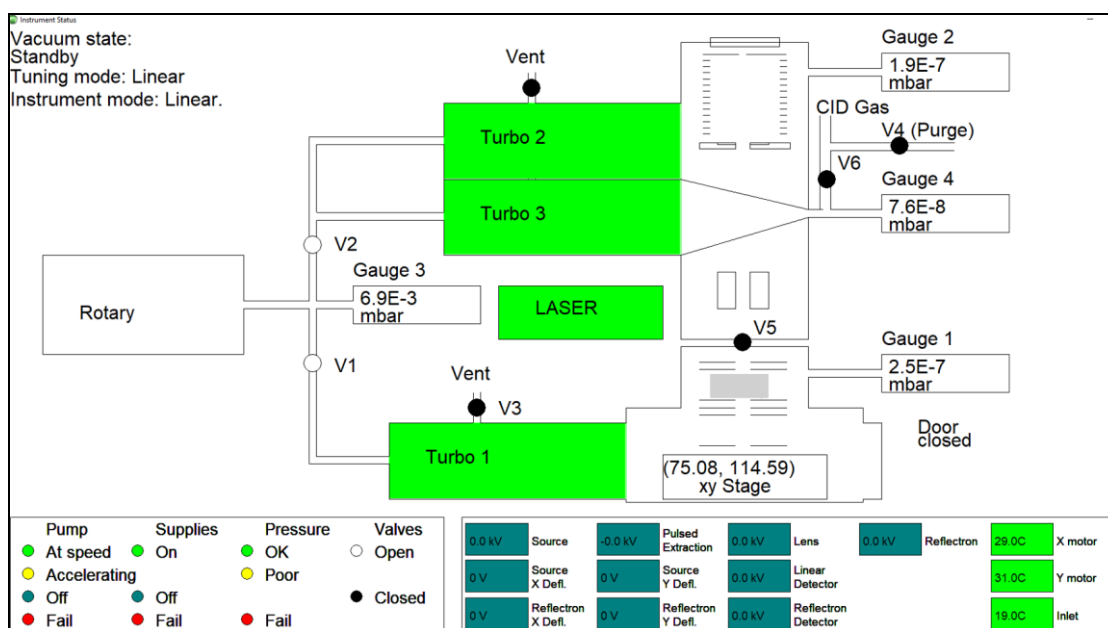


图 6-7

注：正常真空度(非运行模式)：

样品仓：2.5*10⁻⁷ mbar (Gauge 1)

反射镜：7.7*10⁻⁸ mbar (Gauge 2)

飞行管：1.9*10⁻⁷ mbar (Gauge 3)

仪器运行的最低真空度要求 10⁻⁷ mbar，严禁真空不符合要求，擅自运行设备，由于用户样品或者擅自操作导致设备故障，所有责任由用户课题组承担。

6.3 测试

务必仪器负责人确认仪器状态正常，进行测试，MALDI-TOF 使用的基本思路为：

- (1) 制样（含干燥）---开样品仓（须等待）---放样---关样品仓---等待真空恢复；
- (2) 加电压（须等待）---设置采集方法---运行标准品 1---校正设备---运行临近样品---（设置采集方法）---运行标准品 2---校正设备---运行临近样品.....结束仪器待机（如用 CID 模式，需关闭 CID）；
- (3) 如需取样品靶板：开样品仓（须等待）---放样---关样品仓；
- (4) 处理数据及导出；
- (5) 记录真空状态并进行使用登记。

6.3.4.1. 放样

- (1) 开舱门：选择 Acquisition 窗口---Exp. Tech---点击 Open Door，弹出对话框提醒，点击 Yes.等待打开仓门进度结束，直至弹出靶板；

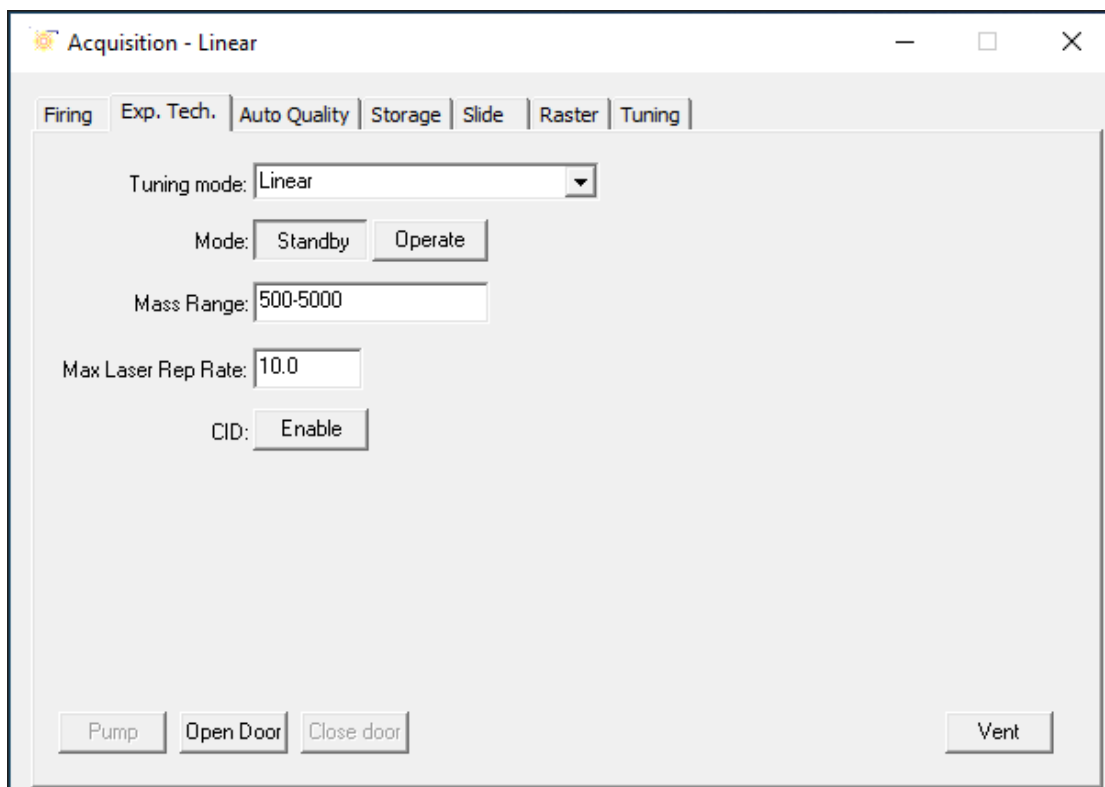


图 6-8

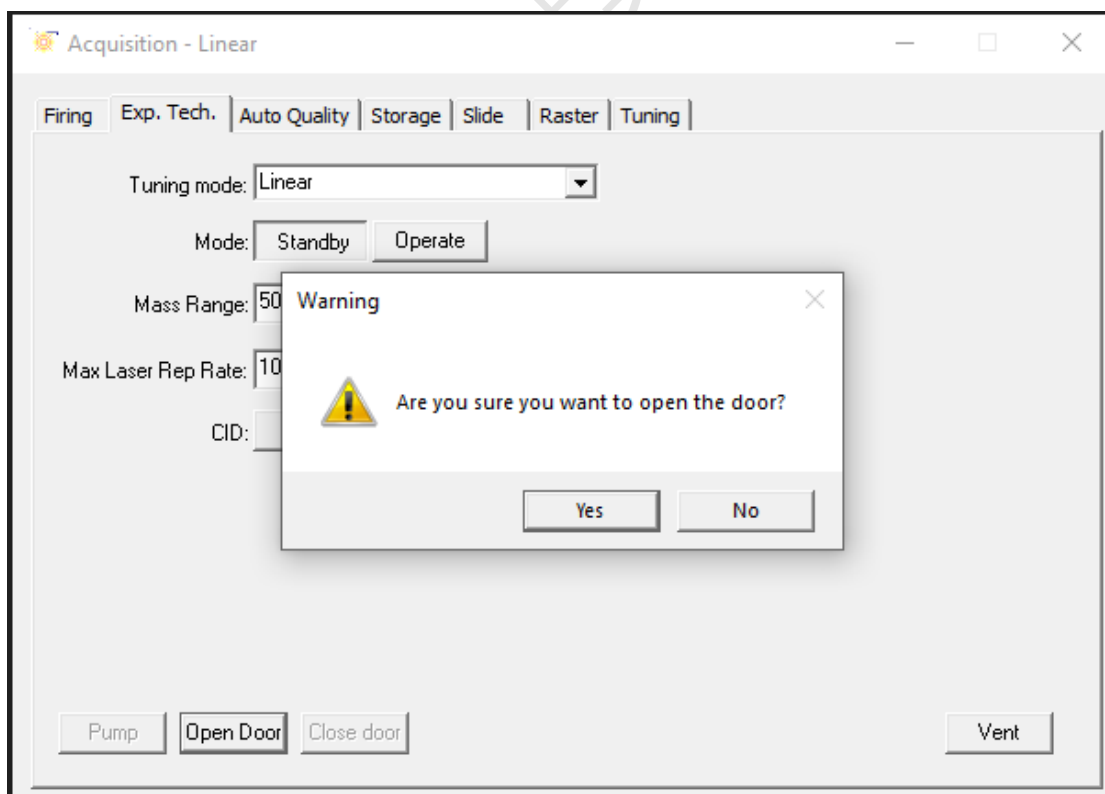


图 6-9

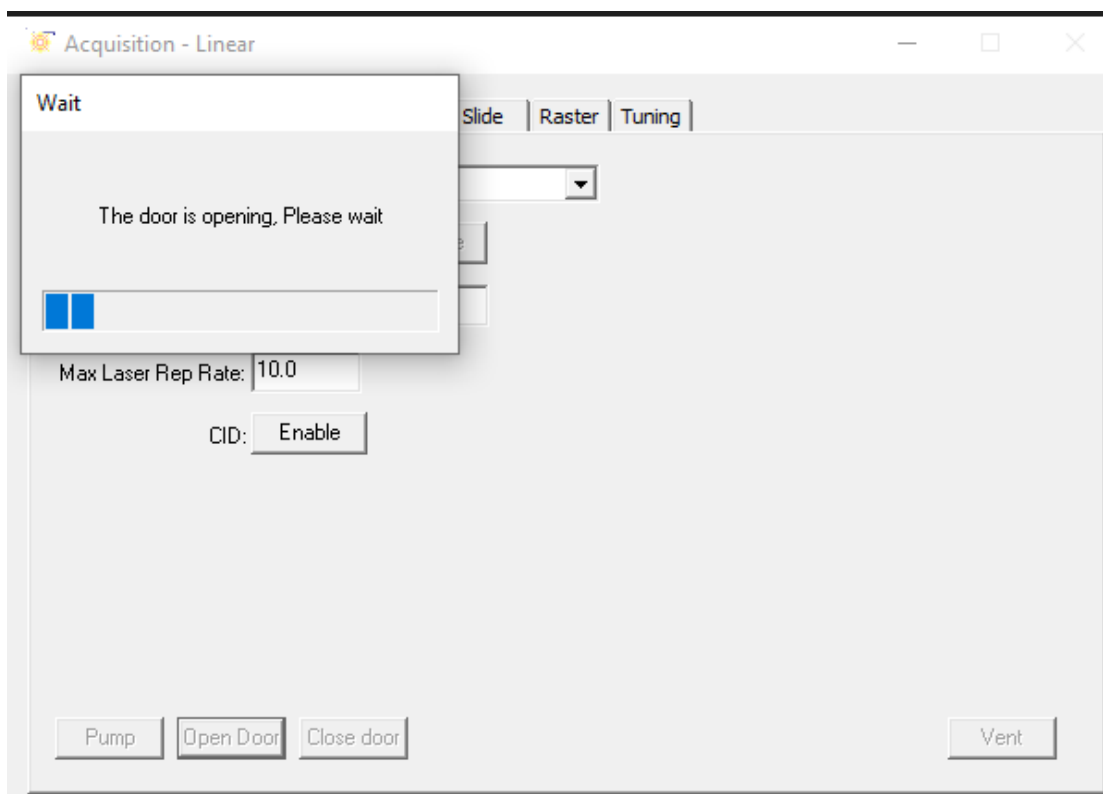


图 6-10

(2) 放靶板：如图 6-11 操作，戴手套移除靶板，握两侧或边缘。放入靶板时，斜角在右上方为正，将靶板边缘插入狭缝槽水平轻轻推入至另一宽边与样品托平齐即可。

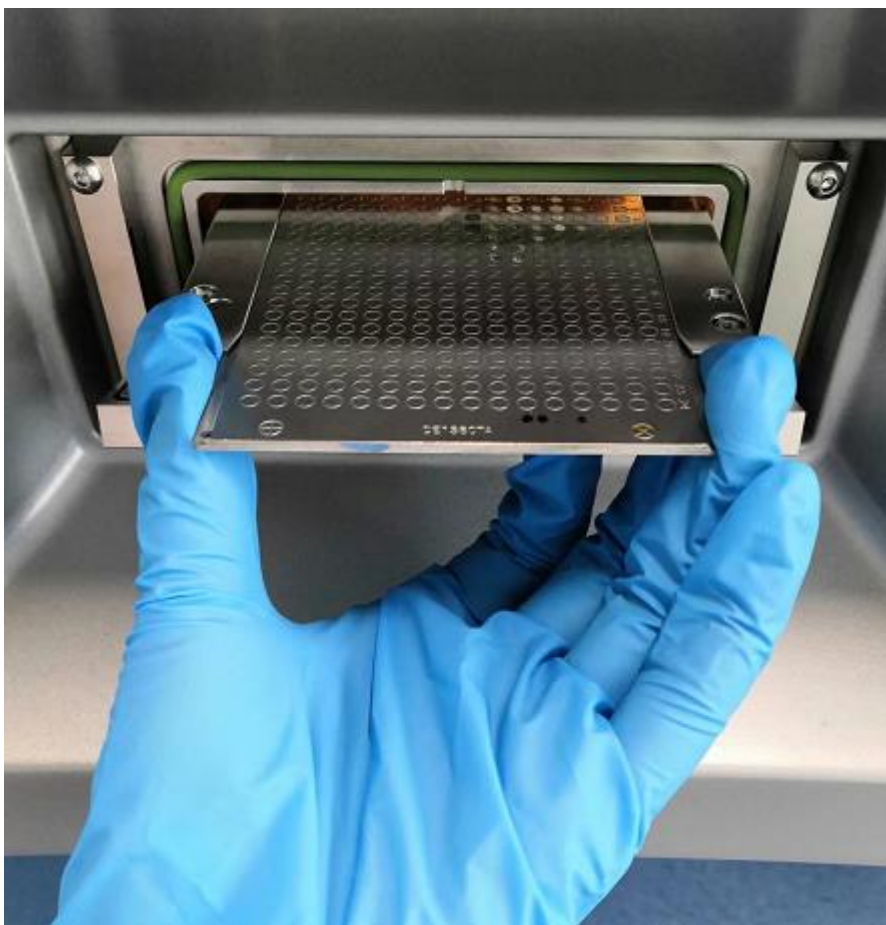


图 6-11

(3) 关仓门: 选择 Acquisition 窗口---Exp. Tech---点击 Close Door, 等待样品仓门关闭, 二维移动平台静止, 加电压前, 务必等待真空恢复。

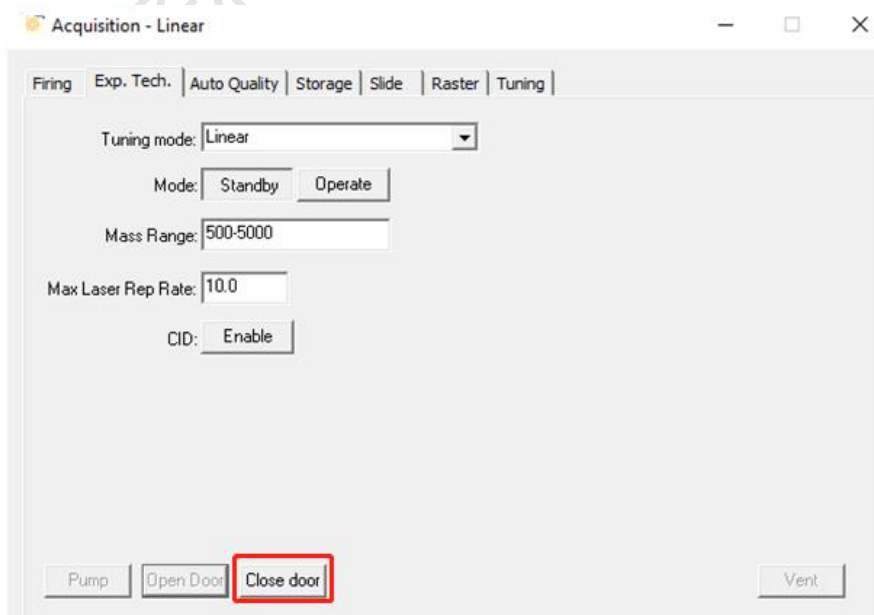


图 6-12

6.3.4.2. 运行标准品(Reflectron)并校正仪器

6.3.4.2.1. 标品选择

从理论上, 标准品分子量范围须包含待测样品分子量, 常用标品为

- (1) 八种多肽混合物 (TOF-Mix, 分子量范围为: 757 Da-3657 Da)
- (2) 常见蛋白

6.3.4.2.2. 采集方法编辑

(1) Acquisition---firing

- ① 不要勾选 auto quality, 即不使用自动过滤功能;
- ② *Power: 常规样品 65-90 之间, 能量过大可能导致样品无信号;
DNA 可自行优化, 可能在 90-120 之间, 不建议设置为最大值 (180);
- ③ *Profiles: 60-100, 单个样品图谱叠加次数, 如果样品信号差, 可适当增加;
- ④ *Shots: 通常设备 2 或者 5, 单张谱图激光曝光点数;
- ⑤ *Ion gate (Da): 选择 blank, 设置允许进入质谱的最小质荷比离子

注: 由于 MALDI-TOF 需要使用基质, 且基质通常为一些小分子, 所以 Ion gate 一般建议设置;

- ⑥ Pulsed Extraction optimized at (Da) (很重要): 最佳引出电压

设置原则: 单一多肽或蛋白样品, 设置为目标物分子量; 宽质荷比范围的样品, 设置为最大分子量的 2/3;

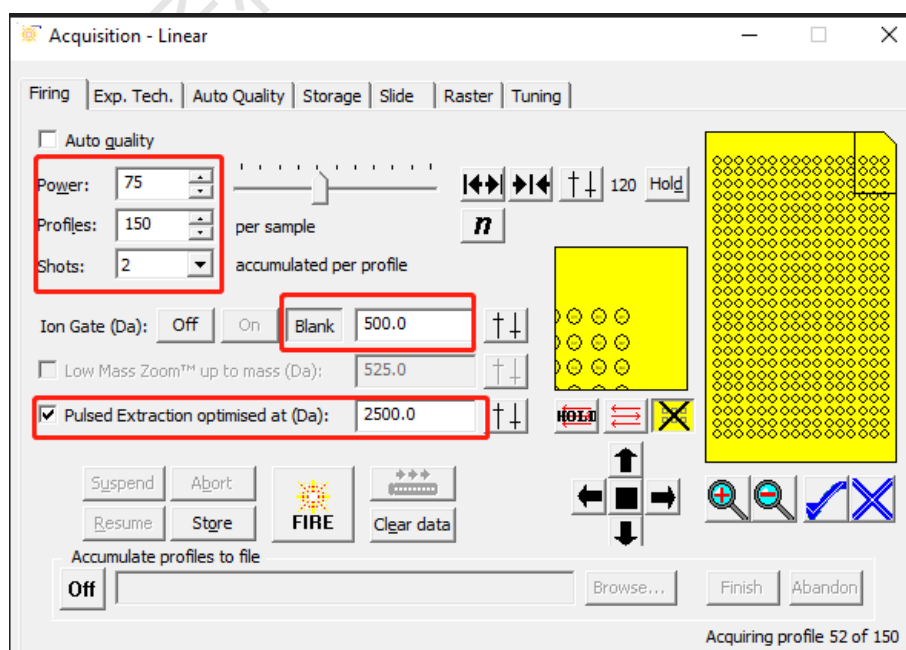


图 6-13

- ⑦ 设置样品位置：右键—Goto location...,输入样品位置 A1-P24，回车确认或者点击OK；

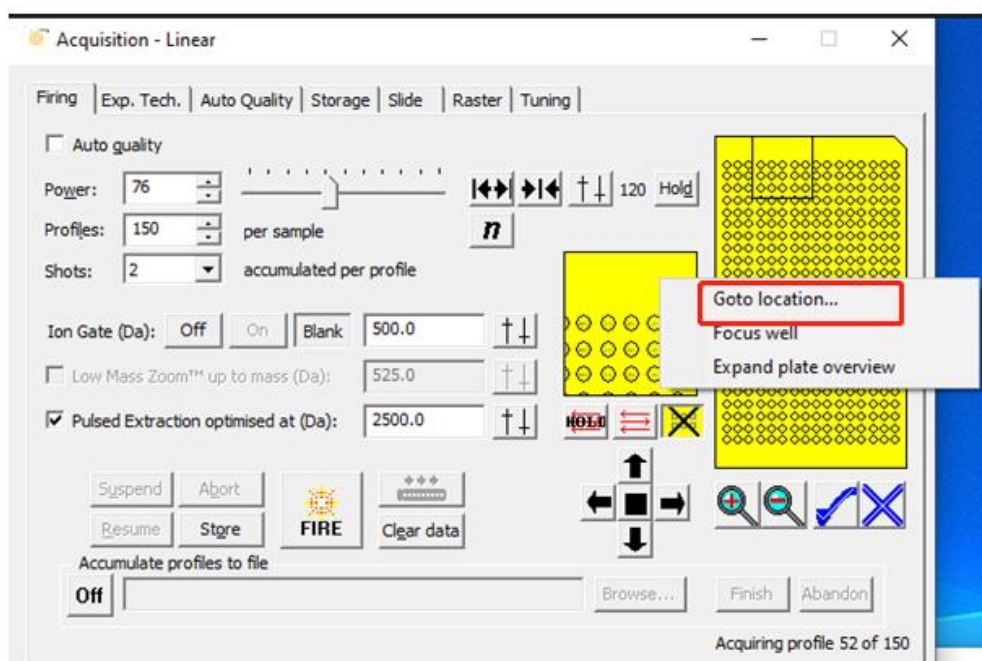


图 6-14

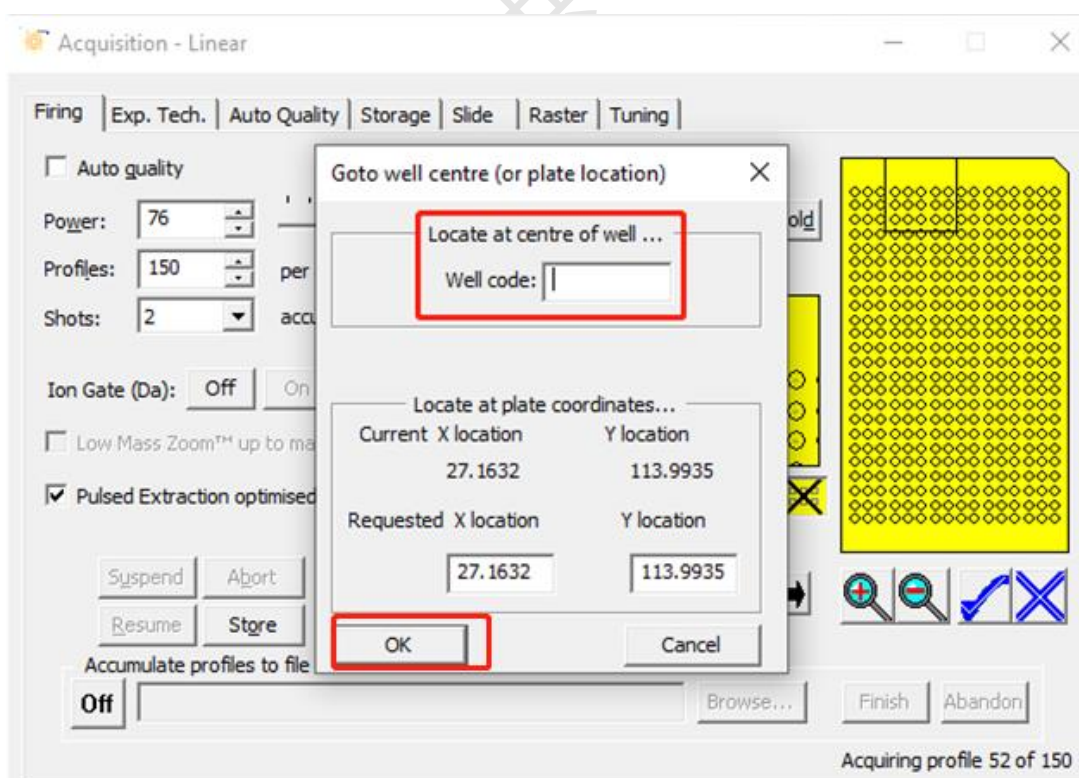


图 6-15

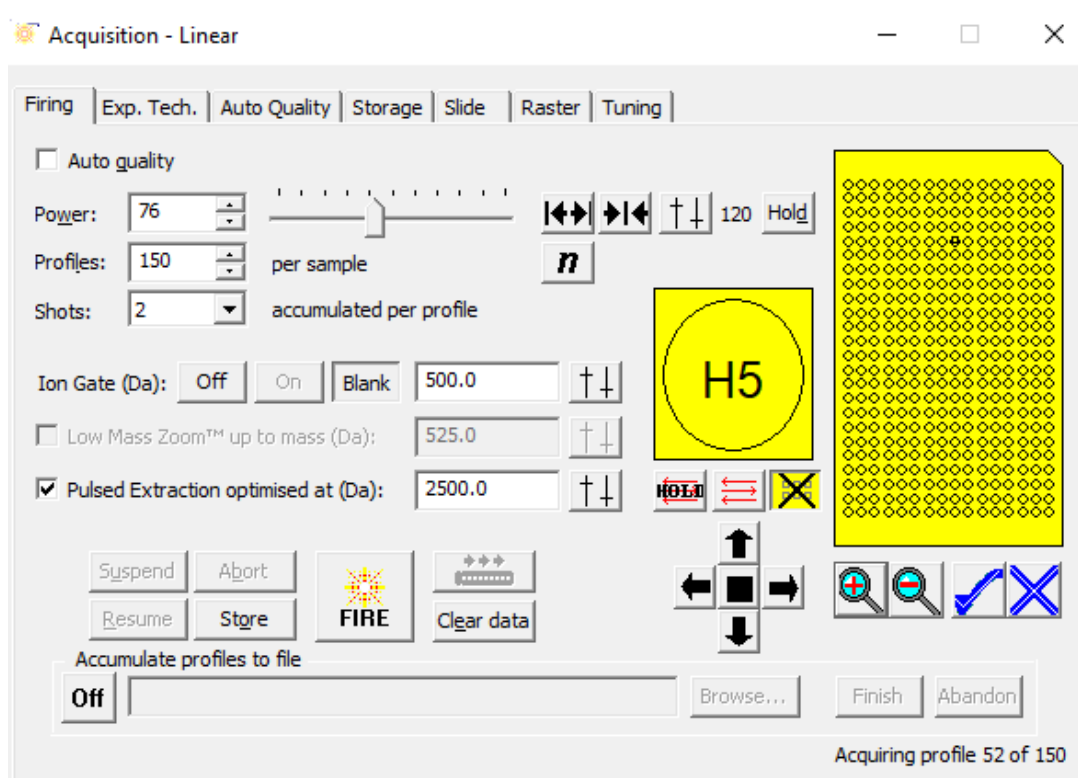


图 6-16

- ⑧ FIRE: 开激光, 采集数据 (方法设置结束, 采集数据时打开)
- ⑨ 其他点击 Enable sample rastering (采样时光斑自动移动)

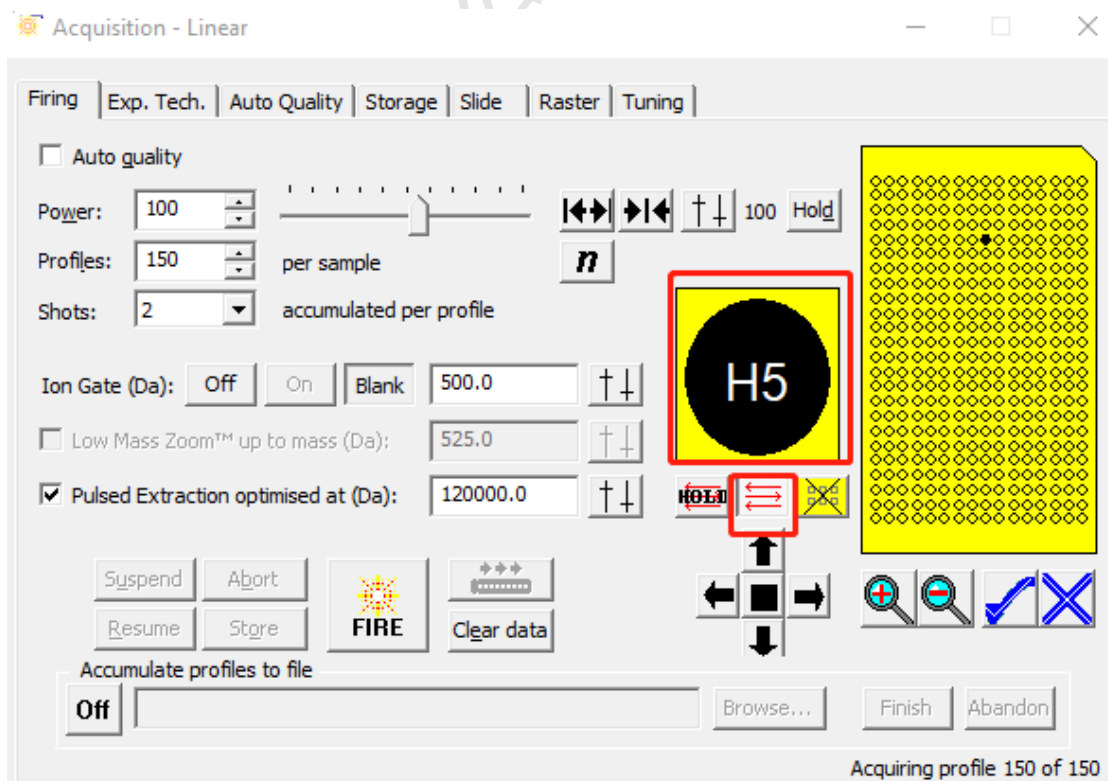


图 6-17

(2) Acquisition-Exp. Tech.

Tuning mode: Linear (分子量大于 10000 Da) 或者 Reflectron (分子量在 10000 以内)
(为正离子模式)。如采集负离子, 请选择后缀含_neg 的选项

Mode: Standby 待机 (不加载电压); Operate 运行 (加载电压)

Mass Range: 扫描质荷比范围 (请根据需要合理设定, 范围太宽, 软件处理数据会很慢)

Max laser Rep Rate(最大激光重复频率): 5-10

CID: 不进行串级分析, 请勿点击 Enable.

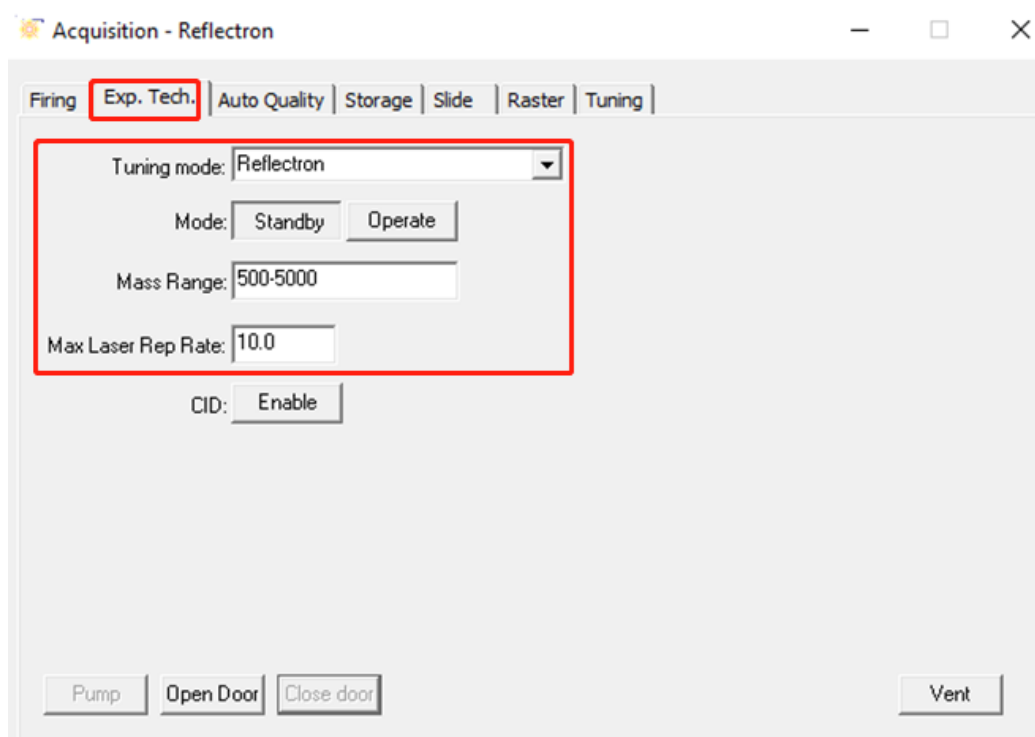


图 6-18

Vent: 严禁点击 Vent 破真空键, 违者将进行处分!!!

(3) Acquisition-Auto quality

通常情况, 无需设置。

(4) Acquisition-Storage

Average: 1

Store profiles: Never

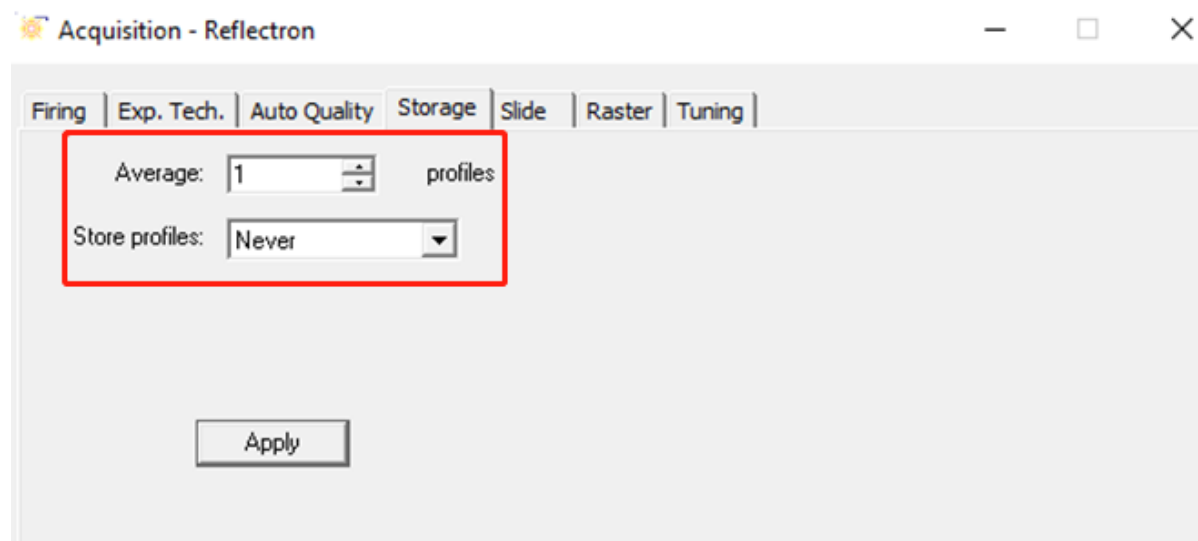


图 6-19

(5) Acquisition-Slide

不用设置且禁止更改，默认使用 DE1580TA 型号靶板。

如更换靶标，需校正靶板位置校正。

(6) Acquisition- Raster

激光光斑移动

Raster Type: Regular Circular

Well Type: Circular well

Diameter: 2000.00 um

Spacing: 100, 150 或者 200 um

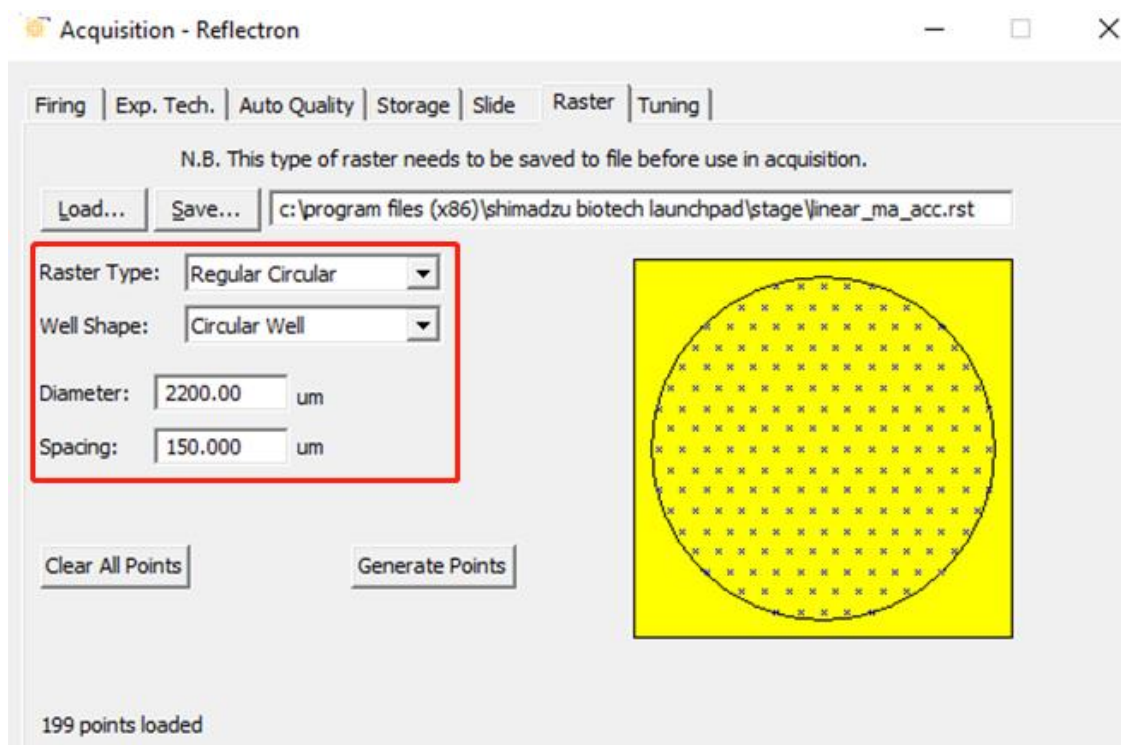


图 6-20

(7) Acquisition- Tune

禁止更改。

6.3.4.2.3. 运行标准品 (Reflectron)

以下以 TOF-mix 为例：

方法设置结束，选择 Acquisition-Mode，**Tuning mode: Reflectron** 点击 **Operate**，等待几分钟，至 **Instrument Status** 电压加载；选择 Acquisition-Firing，选中测试的样品点，点击 **Fire**，仪器开始采集数据。

此时，请观察质谱窗口峰的质量：（1）所需目标峰是否都出现；（2）总离子强度 sum（3000-1000 以内即可，不一定需要所有 Profiles 全部叠加。）

➤ **Suspend 暂停采集**：当谱图质量 OK，回到 Acquisition-Firing，点击 **Suspend** 暂停。

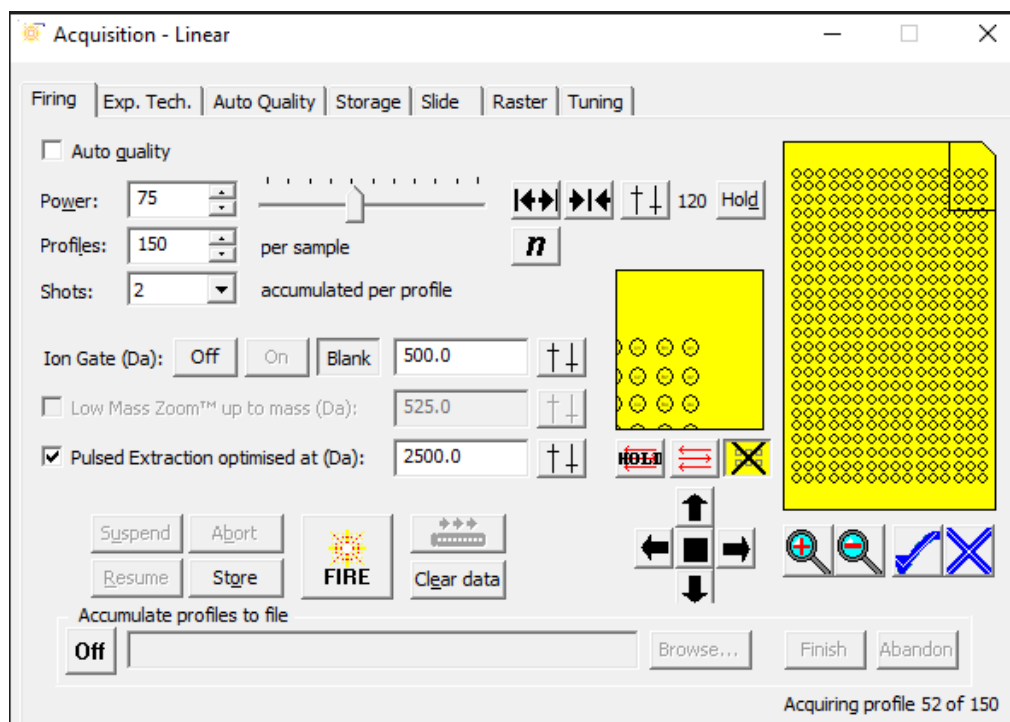


图 6-21

- Store 保存: 需要保存图谱, 回到 Acquisition-Firing, 点击 Store 保存,

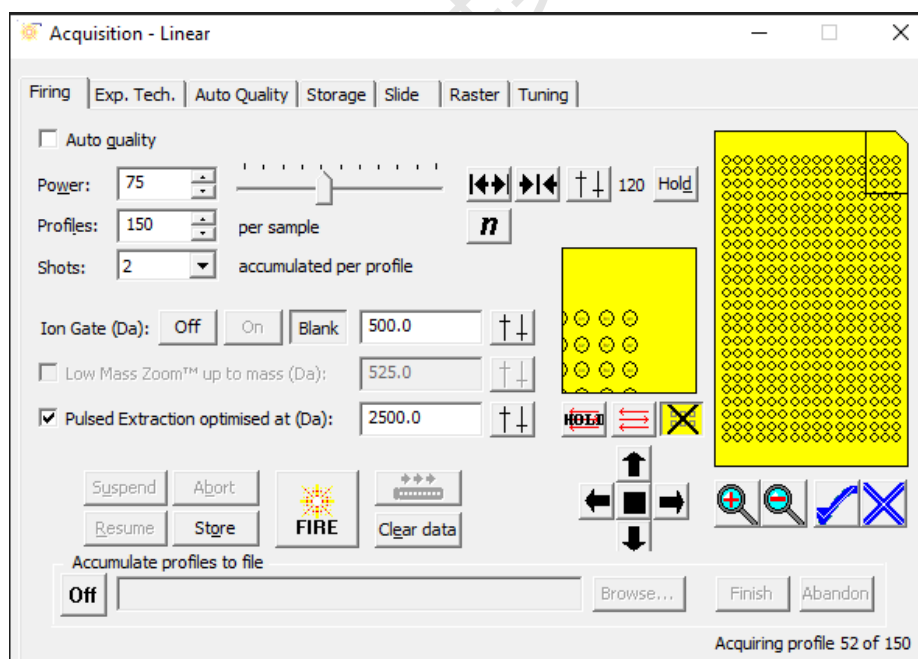


图 6-22

保存路径: D:/Data/PI lab/User---工号/日期文件

请注册 storage 软件。

命名原则: 样品_模式_编号 (编号: 如果每个样品只存一次, 则无需编号) (比如: Tofmix_Reflectron_01)

6.3.4.2.4. 标准谱图处理 (Reflectron)

在 MALDI-MS 质谱窗口, 选择 Processing-Peak Processing..., 打开 Peak Processing 处理窗口。

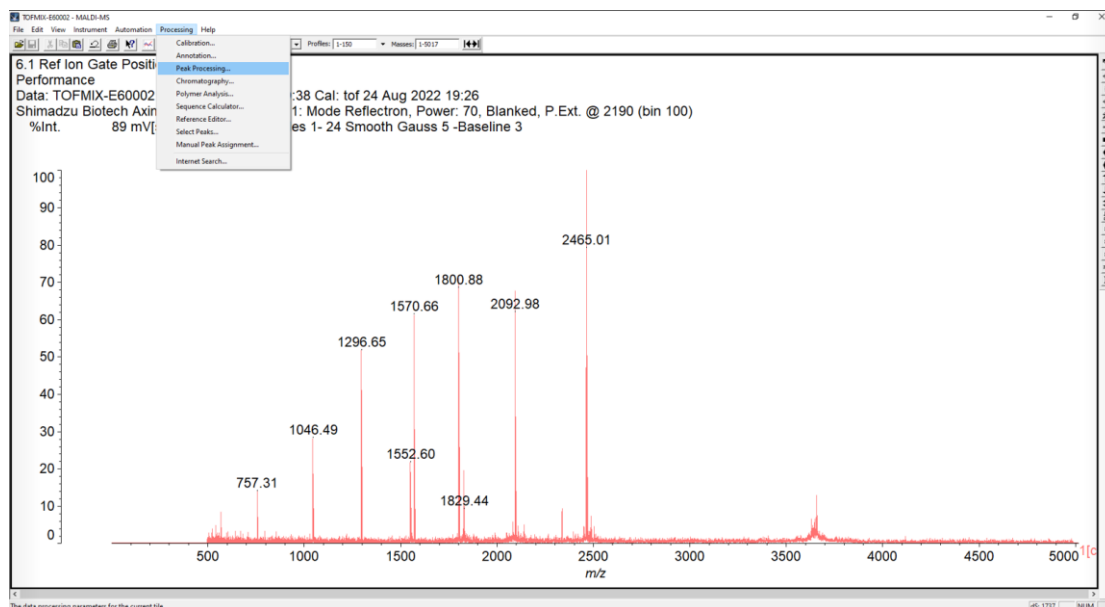


图 6-23

请按以下参数进行设置.

- (1) 数据处理 Processing-Peak Processing

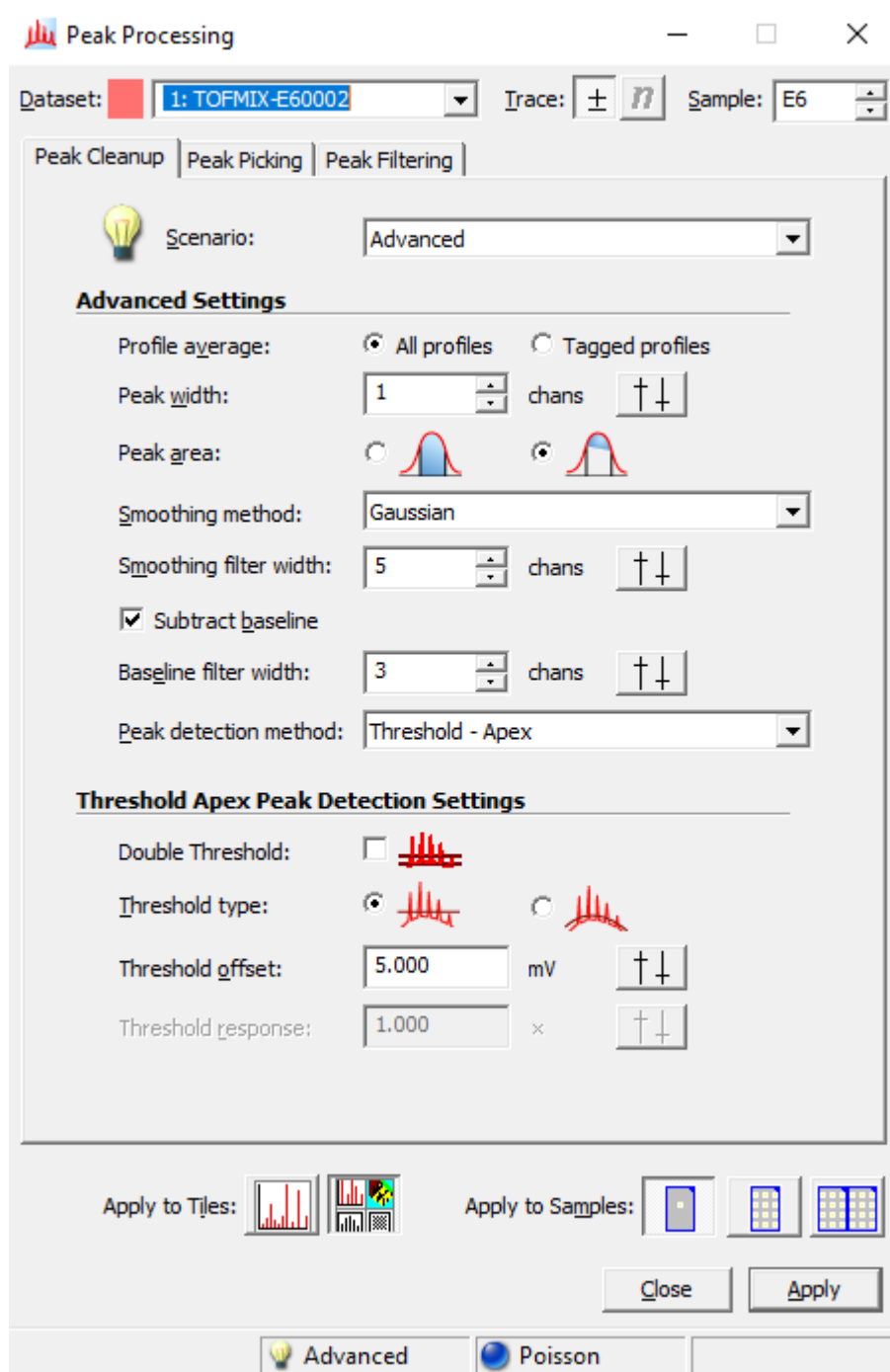


图 6-24

- Peak Cleanup
- ① Scenario: advanced
- ② Profile average: All profiles
- ③ Peak with: 1 chans (数值越大, 标出的峰越少)
- ④ Peak area: any one
- ⑤ Smoothing method: Gaussian

- ⑥ Smoothing filter width: 1-5 (看到单个同位素质谱峰)
- ⑦ 勾选 Subtract baseline
- ⑧ Baseline filter width: 3 chans
- ⑨ Peak detection method: 选择 threshold-Apex
- ⑩ Threshold Apex Peak Detection Settings
- ⑪ 不勾选 Double Threshold
- ⑫ Threshold offset: 勾选第一个, 使用固定电压值作为阈值
- ⑬ Threshold offset: 可设为 3-5 设置固定阈值, 过大峰不显示.

(2) 数据处理 Processing-Peak Picking

勾选 Use peak picking, 其他默认

分子科学公共实验平台

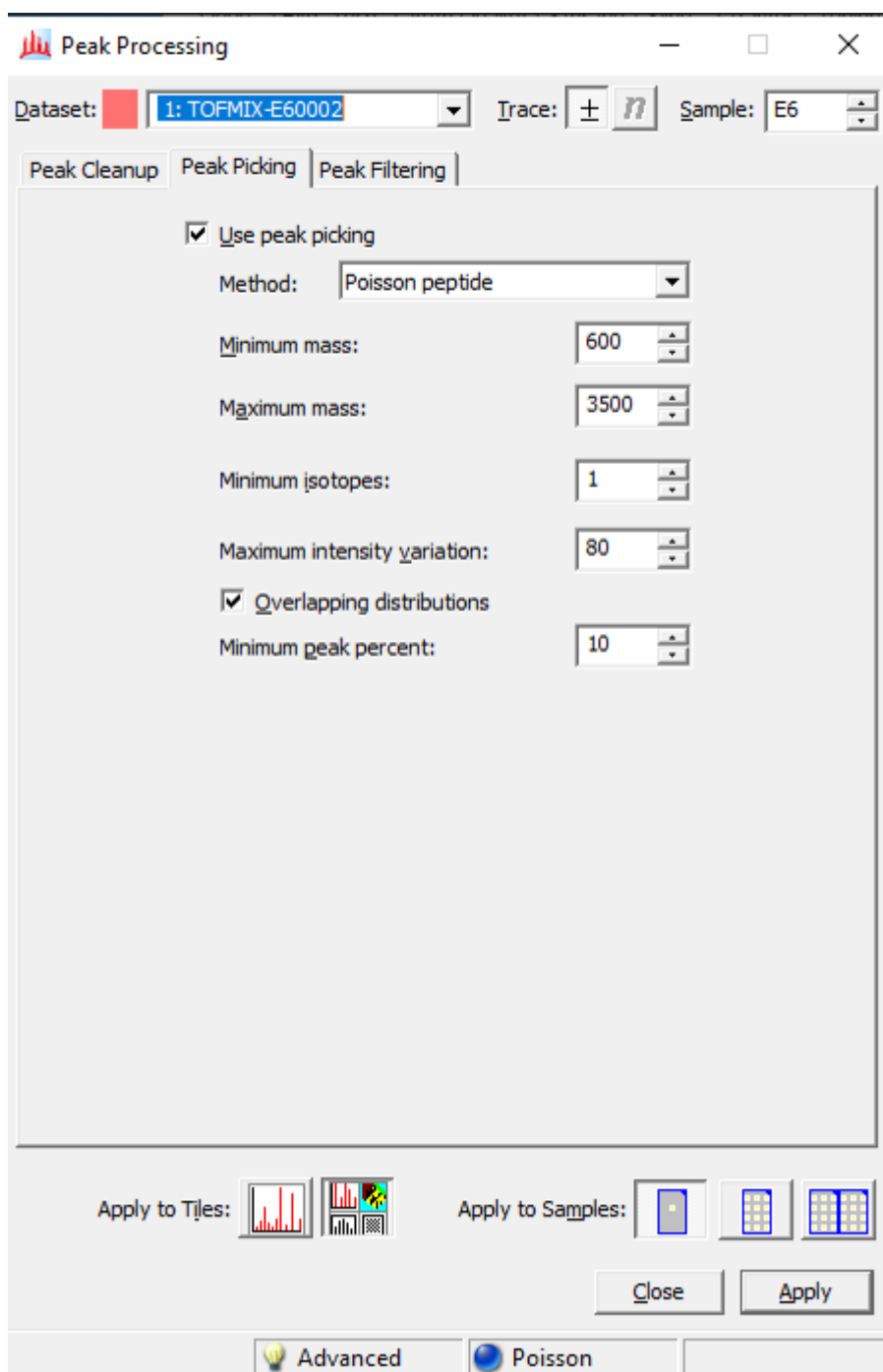


图 6-25

(3) 数据处理 Processing-Peak Filtering

不勾选 Use peak filtering

以上所有设置结束, 点击 Apply.



图 6-26

6.3.4.2.5. 标准谱图校正 (Reflectron---isotope calibration)

在 MALDI-MS 质谱窗口, 选择 Processing-Calibration, 打开 Calibration 校正窗口, 进行校正, 相关操作如下:

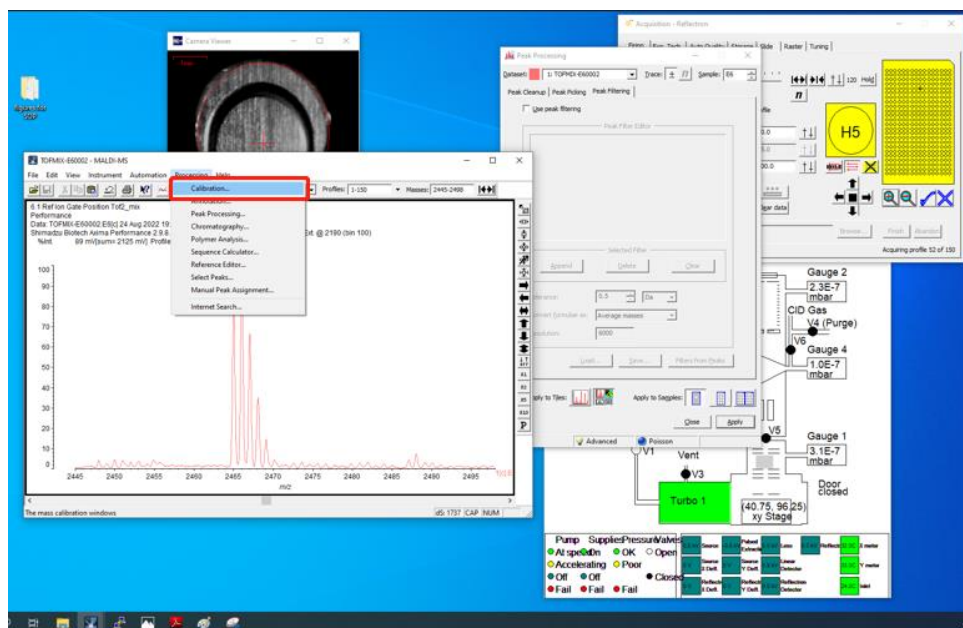


图 6-27

- (1) 点击 list reference..., 选择 TOF2_mixture.pos_ref 校正文件, 点击 Open, 导入 TOF-MIX 标准品列表;

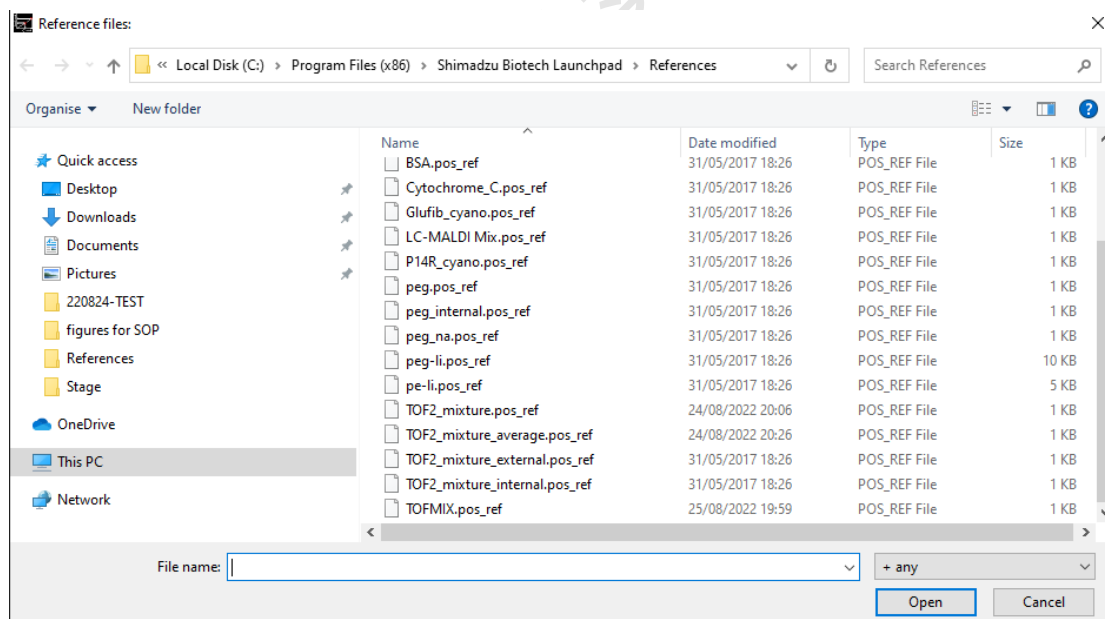


图 6-28

注: 请对照样品同位素峰质荷比信息 (见附件 1), 如为同位素峰, 须重新订正, list reference 列表中, Abundance 为 I

可根据自己实际采集的谱图, 选择删除或者添加标品质谱峰 (见 (4))

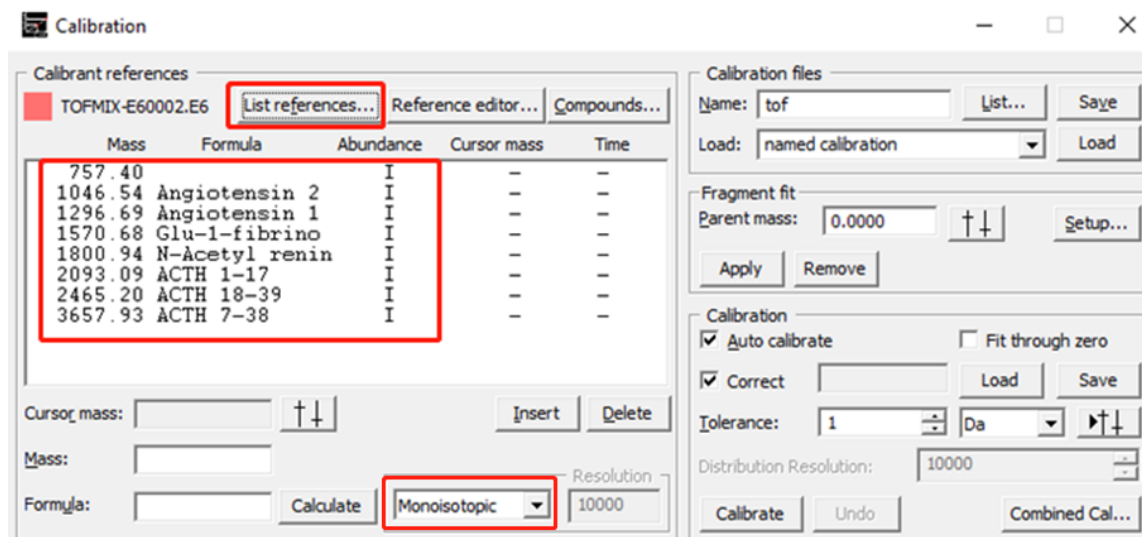


图 6-29

- (2) Calculate, 下来选择 Monoisotopic;
- (3) 右侧 Tolerance 先设置为 1 Da, 点击 Calibrate, 校正通过后, 设置 tolerance 为 100 mDa, 再次校正。

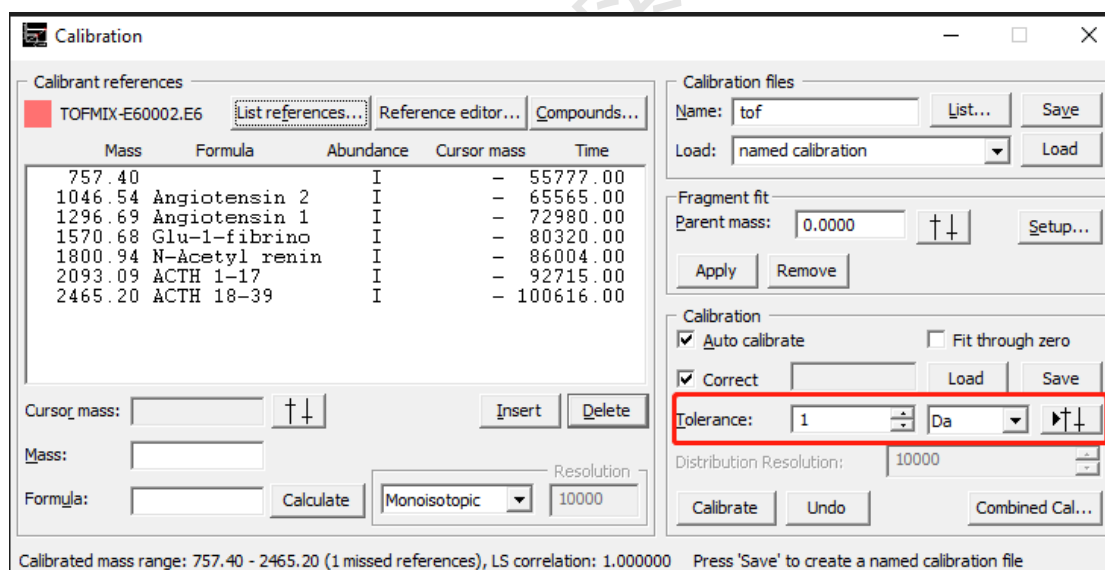


图 6-30

校正通过, 则 Time 列有对应的时间信息, 校正结束后, 点击 Save 保存。

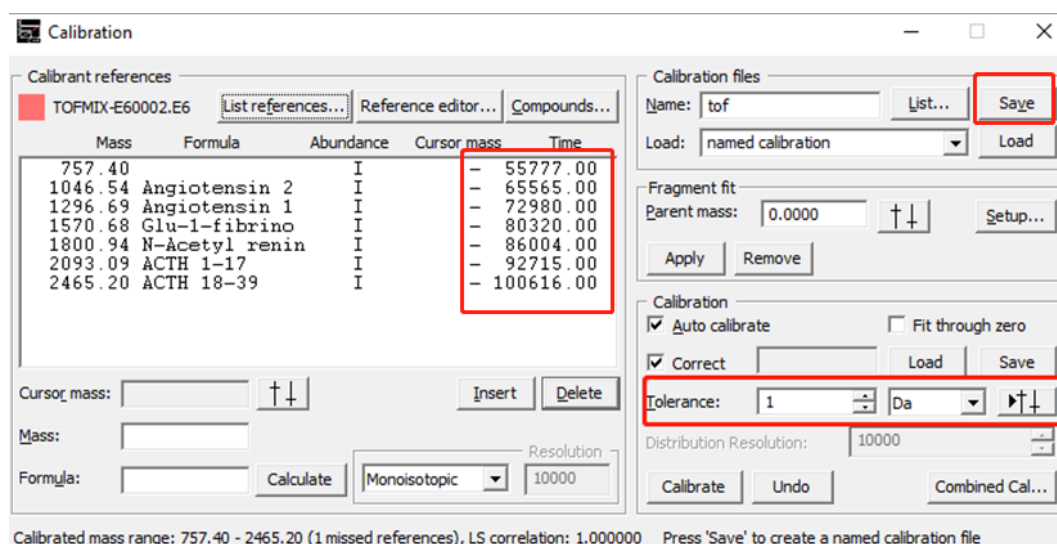


图 6-31

(4) 标准谱峰 list 的删除或添加

- 删除: 选中该组分---Delete
- 添加: 输入 Mass, Formula, 选择 Monoisotopic, 设置好, 点击 Insert.

6.3.4.3. 样品测试 (Reflectron)

注: 样品测试需与前一个标准品测试方法一致(除 m/z 可进行适度调整外), Goto 到具体样品点位置外, 其他图谱采集过程参见 6.3.2.2-6.3.2.3。

选择 Acquisition-Firing, 点击 Fire, 仪器开始采集数据, 参见 6.3.2.

- Suspend 暂停采集: 当谱图质量 OK, 回到 Acquisition-Firing, 点击 Suspend 暂停。
- Store 保存: 需要保存图谱, 回到 Acquisition-Firing, 点击 Store 保存。

6.3.4.4. 运行标准品 (Linear)并校正仪器

以下以 Cytochrome C 为例:

方法设置结束, 选择 Acquisition-Exp. Tech, Tuning mode: linear, 点击 Operate, 等待几分钟, 至 Instrument Status 电压加载; 选择 Acquisition-Firing, 选中测试的样品点, 点击 Fire, 仪器开始采集数据。

注意: 修改脉冲提取电压 (Pulsed Extraction Optimized) 和质荷比范围 (Mass Range)。

此时, 请观察质谱窗口峰的质量: (1) 所需目标峰是否都出现; (2) 总离子强度 sum (3000-1000 以内即可, 不一定需要所有 profiles 全部叠加。)

- Suspend 暂停采集: 当谱图质量 OK, 回到 Acquisition-Firing, 点击 Suspend 暂停。
- Store 保存: 需要保存图谱, 回到 Acquisition-Firing, 点击 Store 保存,

保存路径: D:/Data/PI lab/User---工号/日期文件

请注册 storage 软件。

命名原则: 样品_模式_编号 (编号: 如果每个样品只存一次, 则无需编号) (比如: Cytochrome C_linear_01)

6.3.4.4.1. 标准谱图处理(Linear)

在 MALDI-MS 质谱窗口, 选择 Processing-Peak Processing..., 打开 Peak Processing 处理窗口。

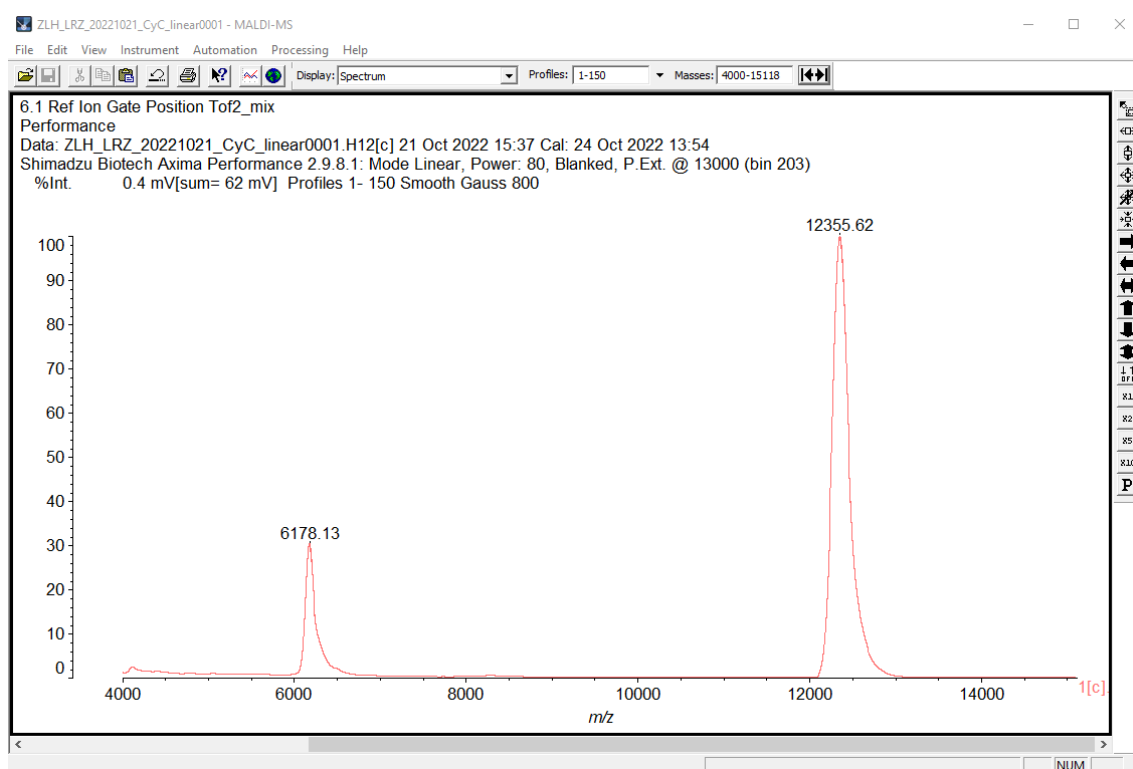


图 6-32

请按以下参数进行设置.

- (2) 数据处理 Processing-Peak Processing

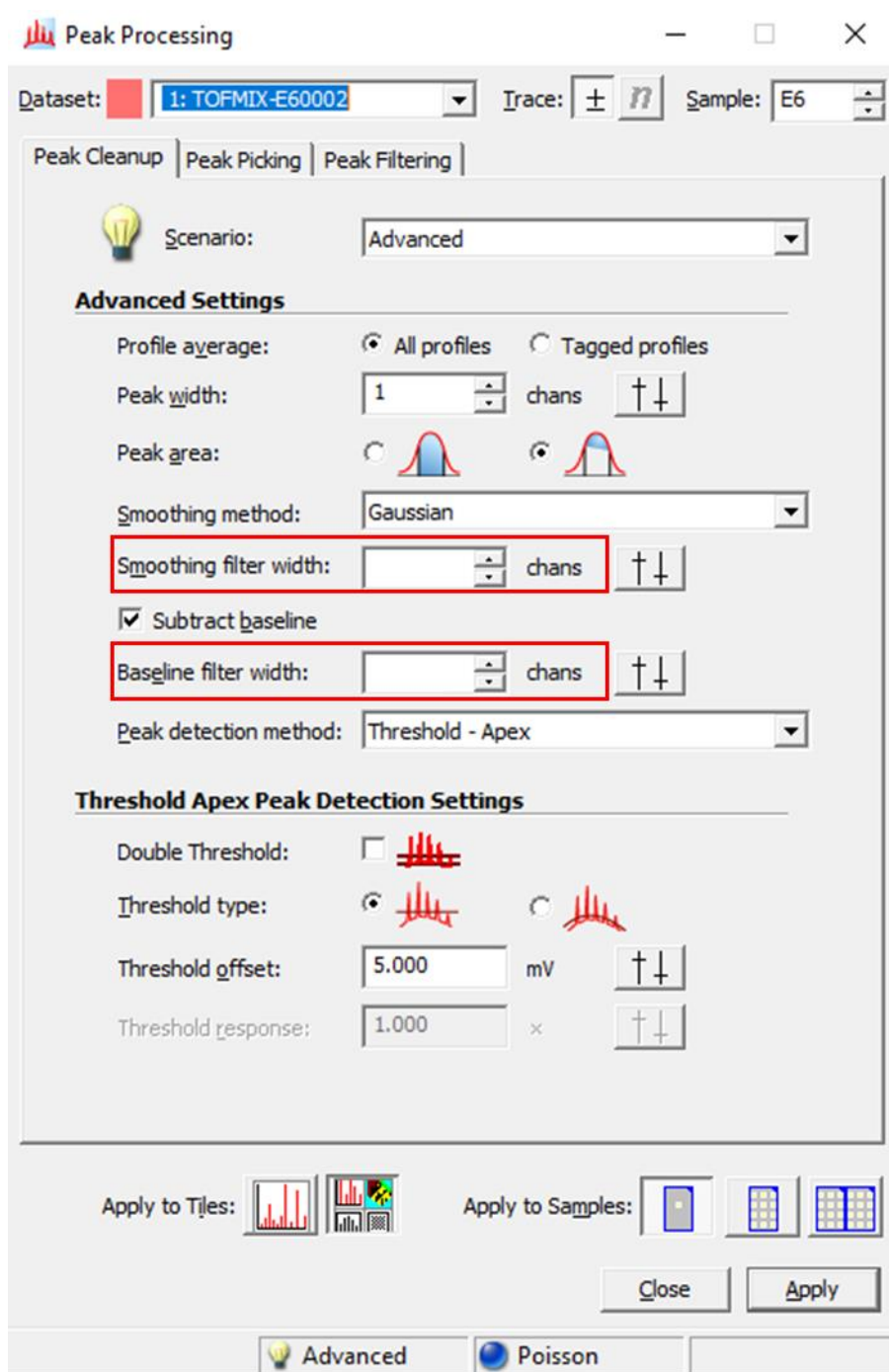


图 6-33

➤ Peak Cleanup

- ① Scenario: advanced
- ② Profile average: All profiles
- ③ Peak with: 1 chans (数值越大, 标出的峰越少)
- ④ Peak area: any one
- ⑤ Smoothing method: Gaussian

- ⑥ Smoothing filter width: 20-100 (单个同位素质谱峰, 宽化到单个峰)
- ⑦ 勾选 Subtract baseline
- ⑧ Baseline filter width: 30-200 chans (单个同位素质谱峰, 宽化到单个峰)
- ⑨ Peak detection method: 选择 threshold-Apex
- ⑩ Threshold Apex Peak Detection Settings
- ⑪ 不勾选 Double Threshold
- ⑫ Threshold offset: 勾选第一个, 使用固定电压值作为阈值
- ⑬ Threshold offset: (单个同位素质谱峰, 宽化到单个峰) 过大峰不显示峰

(2) 数据处理 Processing-Peak Picking

不勾选 Use peak picking, 其他默认

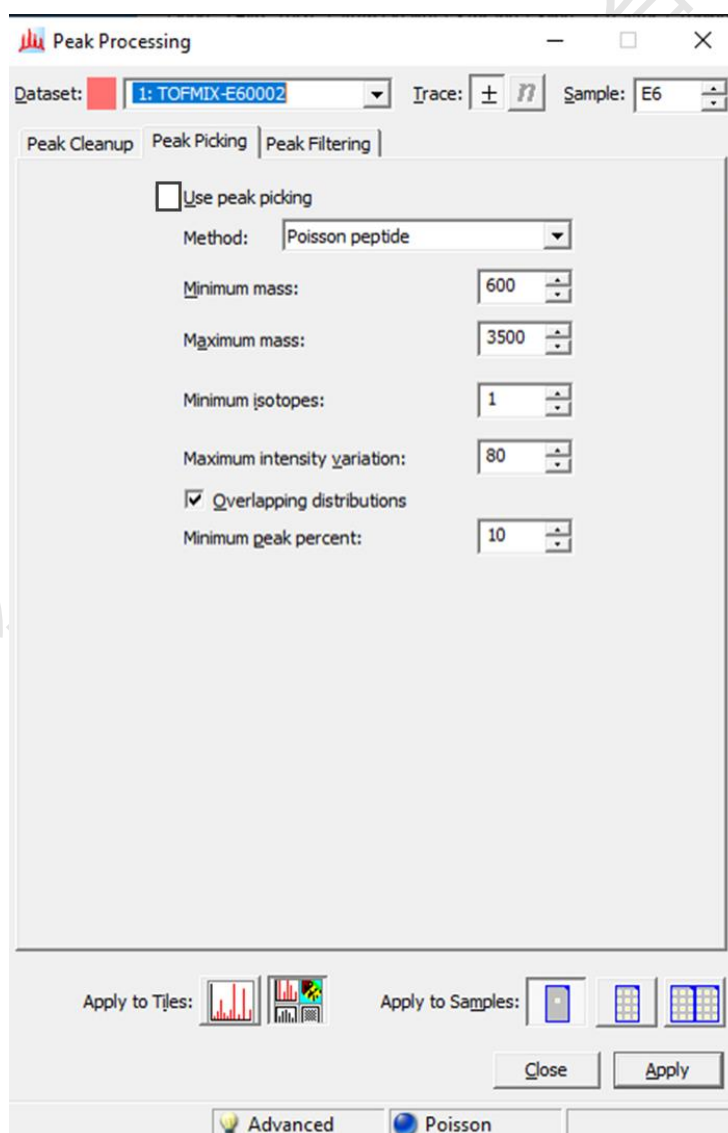


图 6-34

(3) 数据处理 Processing-Peak Filtering

不勾选 Use peak filtering

以上所有设置结束, 点击 Apply.



图 6-35

6.3.4.4.2. 标准品校正(Linear---average calibration)

在 MALDI-MS 质谱窗口, 选择 Processing-Calibration, 打开 Calibration 校正窗口, 进行校正, 相关操作如下:

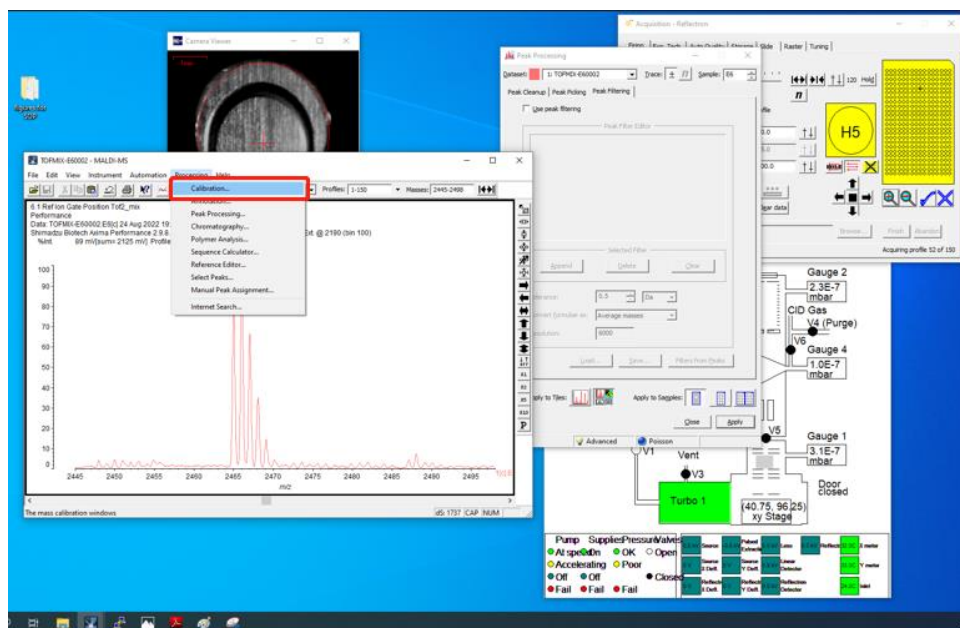


图 6-36

- (5) 点击 list reference..., 选择 Cytochrome_C.pos_ref 校正文件, 点击 Open, 导入 Cytochrome_C 标准品列表;

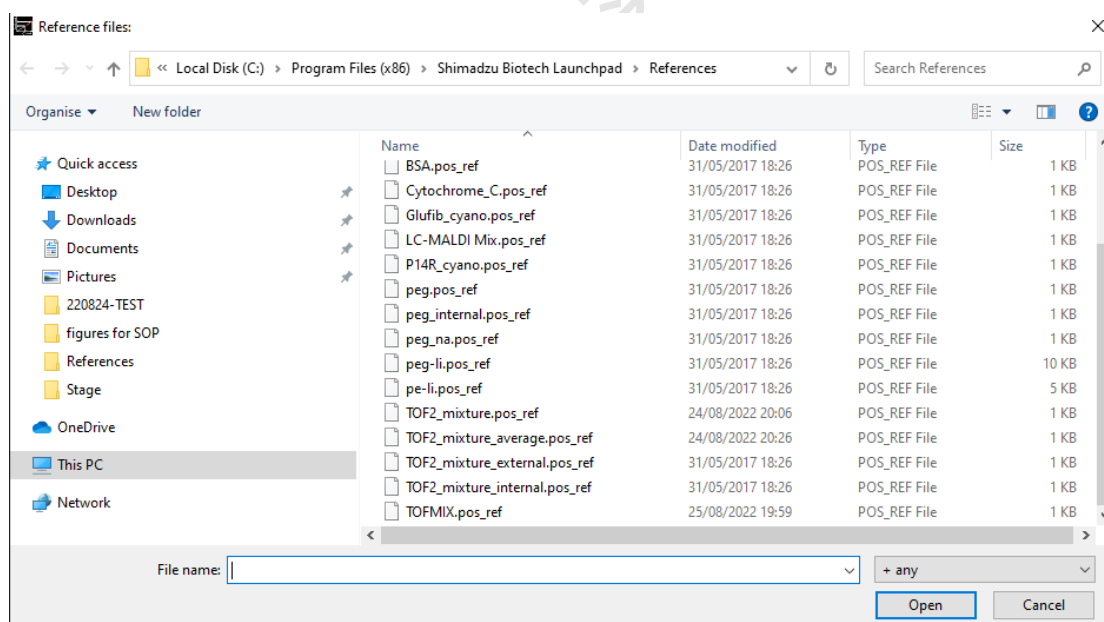


图 6-37

注: 请对照样品同位素峰质荷比信息 (见附表 1), list reference 列表中, Abundance 为 A; 可根据自己实际采集的谱图, 选择删除或者添加标品质谱峰 (见 (4))

- (6) Calculate, 下来选择 average;
- (7) 先根据采集的谱图和标准谱的差异, 设置 Tolerance, 点击 Calibrate, 校正通过后, 设置 tolerance 为 1Da, 100 mDa, 再次校正。

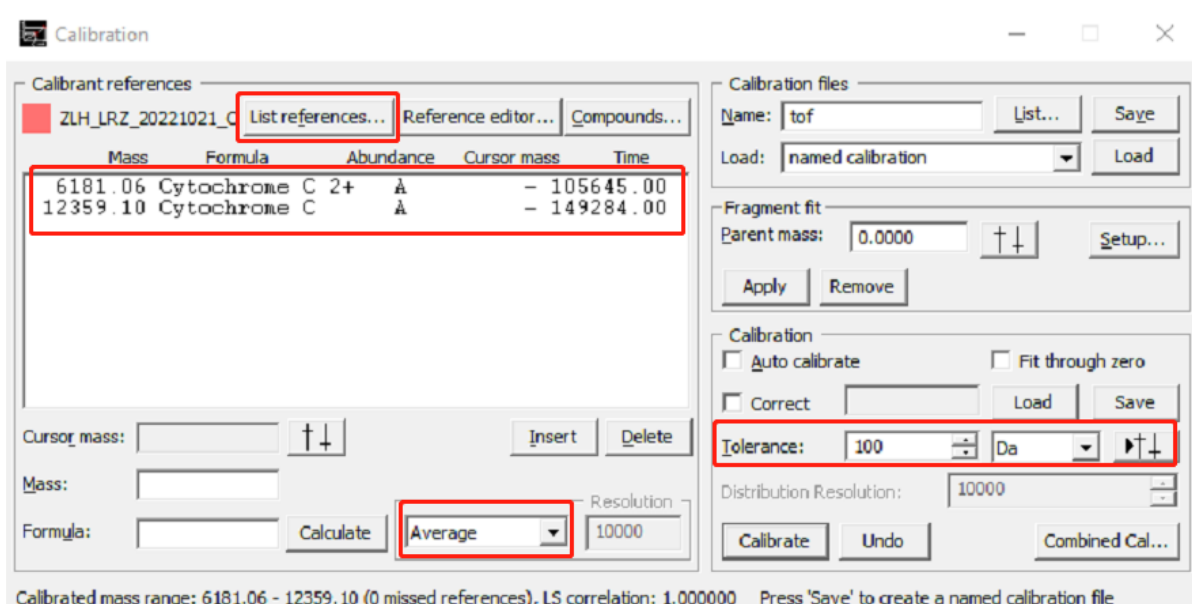


图 6-38

校正通过，则 **Time** 列有对应的时间信息，校正结束后，点击 **Save** 保存。

(8) 标准谱峰 list 的删除或添加

- 删除：选中该组分---Delete
- 添加：输入 Mass, Formula, 选择 Average, 设置好, 点击 Insert.

6.3.4.4.3. 样品测试 (Linear)

注：样品测试需与前一个标准品测试方法一致(除 m/z 可进行适度调整外)，Goto 到具体样品点位置外，其他图谱采集过程参见 6.3.2.2。

选择 Acquisition-Firing，点击 Fire，仪器开始采集数据，参见 6.3.3.

- Suspend 暂停采集：当谱图质量 OK，回到 Acquisition-Firing，点击 Suspend 暂停。
- Store 保存：需要保存图谱，回到 Acquisition-Firing，点击 Store 保存。

6.4 数据导出

File---Export---ASCII：导出原始数据；

File---Print：导出 PDF 文件

6.5 关机

在 Acquisition-Exp. Tech, 点击 Standby, 请确认电压颜色转成墨绿色, 为 Standby 模式设置成功。

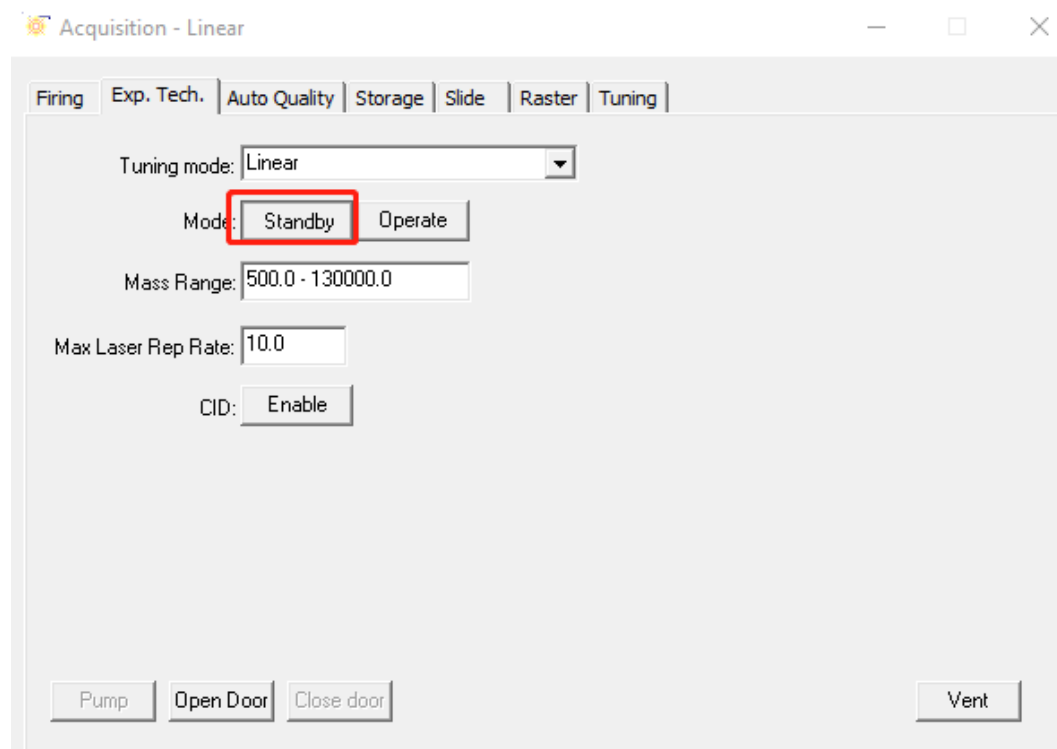


图 6-39

如需取样品, 请按 6.3.1 开样品仓取取出样品靶板。

6.6 实验结束处理

- 退出大仪网系统登录
- 实验结束, 请整理实验桌, 并将自己的测试样品带出实验室。

请注意: 确认仪器 Standby, 真空正常, 并进行登记。一旦开始实验, 默认为使用前仪器状况良好; 使用过程中出现故障须立即联系技术员。

7. 相关/支撑性文件

Q/WU FLHR001 文件编写规范

8. 记录

基质辅助激光脱附-高分辨飞行时间质谱仪使用记录表。

9. 附件

附录一 标准品分子量信息表

附录二 靶板清洗方法

附录一 标准品分子量信息表

标准物质		化学式	电荷 (n)	[M+nH] ⁿ⁺ 单同位素	[M+nH] ⁿ⁺ 平均
OctapepMix	Bradykinin 1-7	C ₃₅ H ₅₃ N ₁₀ O	+1	757.3992	757.8668
	Angiotensin II	C ₅₀ H ₇₂ N ₁₃ O ₁₂	+1	1046.5418	1047.2009
	Angiotensin I	C ₆₂ H ₉₀ N ₁₇ O ₁₄	+1	1296.6848	1297.5014
	Glu1 - Fibrinopeptide B	C ₆₆ H ₉₆ N ₁₉ O ₂₆	+1	1570.6768	1571.5993
	N-acetyl Renin substrate	C ₈₇ H ₁₂₆ N ₂₁ O ₂₁	+1	1800.9432	1802.0849
	ACTH clip [1-17]	C ₉₅ H ₁₄₆ N ₂₉ O ₂₃ S	+1	2093.0862	2094.4501
	ACTH clip [18-39]	C ₁₁₂ H ₁₆₆ N ₂₇ O ₃₆	+1	2465.1983	2466.7087
	ACTH clip [7-38]	C ₁₆₇ H ₂₅₈ N ₄₇ O ₄₆	+1	3657.9289	3660.1722
P14R	C ₇₆ H ₁₁₃ N ₁₈ O ₁₆	+1	1533.8576	1534.8436	
Glu1 - Fibrinopeptide B	C ₆₆ H ₉₆ N ₁₉ O ₂₆	+1	1570.6768	1571.5993	
Cytochrome C	C ₅₆₀ H ₈₇₃ N ₁₄₈ O ₁₅₆ S ₄ Fe	+1	12351.2257	12359.098	
		+2	6177.17	6181.064	
BSA	C ₂₉₃₅ H ₄₅₈₂ N ₇₈₀ O ₈₉₉ S ₃₉	+1	-	66429.926	
		+2	-	33215.466	
		+3	-	22143.980	
CHCA	C ₁₀ H ₈ NO ₃	+1	190.0504	190.1784	
SA	C ₁₁ H ₁₃ O ₅	+1	225.0763	225.2212	
DHB	C ₇ H ₆ O ₄	+1	155.0266	155.1222	

附录二 靶板清洗方法

1) 使用 HPLC 级别的试剂进行清洗, 无尘纸蘸取甲醇擦除固体可见物, 干净烧杯超声 3 次, 每次 10-15 min, 第一次水, 后两次 50%甲醇/水溶液, 每步中间用去离子水冲洗, 最后自然晾干。

注意: 如果靶板清洗后仍有样品峰, 建议执行严格的清洗步骤!

2) 严格清洗:

无尘纸蘸取甲醇擦除固体可见物;

丙酮超声 10-15 分钟, 随后超纯水清洗 3 次;

50%甲醇/水溶液超声 15 分钟, 超声两次, 中间超纯水清洗 3 次;

最后自然晾干, 请勿加热。

分子科学公共实验平台

色质谱实验室仪器使用记录 仪器名: <u>基质辅助激光脱附-高分辨飞行时间质谱 (MALDI-TOF)</u>												
日期 月.日	使用人	课题组	检测模式 (√)			检测方式 (√)		样品数	文件数据存储 文件夹/序列名称	仪器状态		备注
			Linear	Reflectron	基质	送样	自主			正常	报错	
2021.01.01	张三	李四					√	3		√		

**请注意: 使用前先检查谱仪状况, 一切正常方可操作; 一旦开始实验, 默认为使用前谱仪状况良好; 使用过程中出现故障须立即联系技术员; 测试后请及时取回样品。