

儀器設備技術手冊與 訓練教材

高解析 Orbitrap 質譜儀 串聯液相層析 (LC-MS)

撰寫人:楊雅琪

2022年10月31日

表目錄	4
圖目錄	5
中英文對照表	6
1 高解析度軌道阱質譜儀 (Q Exactive [™] Plus)	7
1.1 儀器原理與儀器內部結構 (資料參考質譜分析技術原理與應用一書與儀器操作手冊)	7
1.2 儀器規格與功能	13
1.2.1 掃描模式	14
2 奈升流速液相層析儀 (UltiMate [™] 3000 RSLCnano, Thermo Scientific)	15
2.1 儀器原理	15
2.2 儀器規格及結構	17
2.3 配製流動相與置換流動相於層析儀	21
3.服務項目介紹與儀器方法設定	22
3.1 微升流速方法-分子量测定	22
3.2 微升流速方法-小分子暨代謝體分析	23
3.3 奈升流速方法-蛋白體分析	24
4 機台操作與軟體介紹	25
4.1 Tune 軟體介紹(控制質譜儀)	25
4.2 Xcalibur 軟體介紹(控制層析儀)	26
4.3 建立儀器分析方法	28
4.4 層析流動相置換(Purge)	34
4.5 建立上機清單	36
4.6 儀器開關機	38
4.7 質譜儀之質量校正	41
5 案例分享	42

5.1 分子量測定	
5.2 小分子暨代謝體分析	43
5.3 蛋白體分析	44
5.4 蛋白質體資料庫(Mascot)比對	45
6參考資料 (實驗室備有書籍,歡迎於實驗室內翻閱,恕不外借)	46
7 注意事項	47
8 委測、自行操作之紀錄單	

表一	、九	種掃打	苗模式	介紹與描述	走	•••••	•••••	••••••	15
表二	、幫	浦機	系統規	格	•••••	•••••	•••••	•••••	20
表三	、分	子量》	則定項	目之層析(条件	•••••	•••••	•••••	······22
表四	、分	子量》	則定項	目之質譜(条件	•••••	•••••	•••••	······22
表五	小	分子暨	暨代谢	體分析項	目之層析條件	ŧ	•••••	•••••	······23
表六	小	分子	暨代谢	體分析項	目之質譜條作	ŧ		•••••	······23
表七	、蛋	白體分	分析項	目之質譜(条件		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		24

圖目錄

圖一、Q Exactive™ Plus 外觀
圖二、Q Exactive [™] Plus 內部結構
圖三、加熱式電噴灑游離源外觀與奈米級電噴灑游離源外觀
圖四、電灑游離法示意圖
圖五、四極桿示意圖與剖面圖11
圖六、軌道阱示意圖12
圖七、A、B/u、Cu在不同流速下對板高的影響示意圖15
圖八、碳 18 層析管柱之填充材示意圖······16
圖九、UltiMate [™] 3000 RSLCnano 外觀與組成
圖十、幫浦機與管柱烘箱機內部結構18
圖十一、自動取樣系統機內部結構19
圖十二、樣本盤內部結構與位置編號19
圖十三、蛋白體分析項目之層析條件與十向閥設定24
圖十四、分子量量測比對結果42
圖十五、小分子暨代謝體分析之層析圖與質譜圖43
圖十六、蛋白體分析之層析圖與質譜圖44
圖十七、Mascot 建立比對方法之介面45
圖十八、Albu_bovin (牛血清白蛋白)序列及覆蓋率45
圖十九、牛血清白蛋白樣本的比對結果46

中英文對照表

準確質量	Accurate Mass
C 型阱	C-Trap
數據依賴擷取	Data-Dependent Acquisition , DDA
非數據依賴擷取	Data-Independent Acquisition , DIA
電灑游離法	Electrospray Ionization, ESI
精確質量	Exact Mass
排除清單	Exclusion list
高解析質譜	High Resolution Mass Spectrometry , HRMS
較高能量碰撞解離室	Higher-Energy Collisional Dissociation Cell, HCD Cell
收入清單	Inclusion list
液相層析質譜	Liquid Chromatography Mass Spectrometry , LC-MS
質量分析器	Mass Analyzer
質量解析度	Mass Resolution
質譜圖	Mass Spectrum
代謝體學	Metabolomics
質量準確度	Mass Accuracy
質荷比	Mass-to-Charge Ratio, m/z
中性丟失清單	Neutral loss list
軌道阱	Orbitrap
前驅物離子	Precursor Ion
產物離子	Product Ion
蛋白體學	Proteomics
四極桿	Quadrupole
選擇離子監測	Selected Ion Monitoring , SIM
總離子層析圖	Total Ion Chromatogram , TIC

1 高解析度軌道阱質譜儀 (Q Exactive[™] Plus)

質譜儀是一個分析質量的儀器,可以鑑定分子結構與定量分析。由於質譜儀具有高靈敏度、 分析範圍廣、分析速度快、與層析儀相容性高等優點,是一應用範圍相當廣的分析儀,像是在 化學、醫藥、生技、環境等研究領域扮演了重要的角色。

成大核心設施中心備有一台高解析度四極桿軌道阱混成式高解析質譜儀(外觀如圖一),型 號是 Thermo Scientific Q ExactiveTM Plus Hybrid Quadrupole-OrbitrapTM Mass Spectrometer,以優 異的性能滿足使用者的需求。此儀器由美國賽默飛世爾科技股份有限公司生產,其公司在台灣 有設立海外服務據點,各部門分工完善,儀器維修、應用諮詢、耗材購買等需求,都可以直接 與原廠或原廠授權之經銷商聯繫。

本章節將介紹此儀器原理、儀器組成及結構及儀器應用。



圖一、Q ExactiveTM Plus 外觀。

1.1 儀器原理與儀器內部結構 (資料參考質譜分析技術原理與應用一書與儀器操作手冊)

質量分析器的歷史發展可以回朔到十九世紀初,物理學家 J.J Thomson 以陰極射線管量測 了電子質荷比(*m*/*z*);1953 年, W. Paul 提出了四極桿(Quadrupole)質量分析器,藉由掃描直流 與交流電場得到離子質譜。軌道阱於 2000 年由 A. Makarov 提出,其只需要直流電即可捕捉離 子,並提供了高解析度的質譜分析能力。

儀器原理將依序介紹QExactive™ Plus 所備有的內部結構(圖二),分別說明游離源(電灑游 離法與奈電灑游離法)、四極桿、較高能量碰撞室與軌道阱。



圖二、Q Exactive[™] Plus 內部結構。

1.1.1 游離源

游離源初步將分析樣品(氣、液、固相)游離,將樣本溶液中的帶電荷離子在大氣壓下經 由電灑的過程轉換為氣相離子,再導入質譜儀中進行分析。成大備有兩種游離源(圖三),為加 熱式電噴灑游離源,加熱溫度可達450℃,此游離源適用於小分子暨代謝體分析;另一種為奈 電噴灑游離源,此游離源適用於蛋白體分析。



圖三、加熱式電噴灑游離源外觀與奈米級電噴灑游離源外觀。

電噴灑游離法:美國學者約翰·芬恩 (John B. Fenn) 於 1984 年首度發表了以電灑的方式 將化合物離子化方法,目的在於提供一個能和液相層析結合的質譜界面。原理為樣本注入此毛 細管後,當施予電極電位差時,電位差的牽引力大於樣本的表面張力時,電灑現象就此產生, 此時噴嘴的液面會形成圓錐體,稱之為泰勒錐,其尖端會釋放出相應電荷之液滴。當溶劑不斷 揮發,造成液滴體積縮小,使液滴表面的電荷密度增加,當到達一定程度時即造成液滴分裂, 分裂成更小的帶電荷微液滴,將此連續液滴分裂的反應過程稱為庫倫分裂。最後溶劑蒸發完全 後會生成氣態離子,便可送至質譜儀的質量分析系統偵測,示意圖如圖四。



圖四、電灑游離法示意圖。

奈電噴灑游離源:隨著電灑法技術趨於成熟,研究者們發現質譜訊號僅與分析物濃度呈 正相關,但與溶液流速無關,將意味著少量的樣本能使用低流速即可維持分析物在溶液 的濃度,進而獲得強度相當的訊號,也是電灑法特有的濃度敏感現象。相較於傳統電灑 法,奈電噴灑游離法能產生更小的液滴,透過對液體施加高電壓,使庫侖大於表面張力, 即產生高電荷的微小液滴,因此所需進行的庫倫分裂次數減少即可轉換為氣態離子。 1.1.2 四極桿:

由四支圓柱形的電極棒所組成,以四方形之對角線形成雙曲線之排列,電極棒的中央形成一個 靜電場,示意如圖五所示。其優點為可以進行快速的離子掃描監測,利於不同質量範圍間的轉 換,然而其缺點則是質量解析度低。

四極桿外觀



四極桿剖面圖



圖五、四極桿示意圖與剖面圖。

1.1.3 較高能量碰撞室:

此種新型碰撞方式所提供的碰撞能量最高可達 250 電子伏特,可藉由此種新型碰撞方式以產 生較多的碎片離子。 1.1.4 軌道阱:

由一個紡錘形中心電極與一對鐘形外電極包圍所組成(圖六)。軌道阱質量分析器內使用直流電 場將離子局限於空間內,並運用快速傅立葉轉換將時域訊號轉換為頻域訊號,再經換算成離子 質荷比訊號。質量分析器內的離子以高速進行長時間的軌跡圍繞中心電極運行,並沿中心電極 進行諧波振盪,兩個檢測電極在離子發生簡諧波振盪時記錄離子的圖像電流。離子的質荷比 (m/q,m為質量;q為電量)與簡諧波頻率 ω和儀器常數 k 有關,公式說明如下:

Z 軸電場與力的關係:

$$F_z=m^*(d^2z/dt^2)=-qkz$$

 $\omega=\sqrt{(q/m)k}$

可以發現 (1) 的頻率僅與離子質荷比有關,而與離子動能和位置無關,因此可以當作質量分析 用,進而得到高解析度的完整質譜。

了解軌道阱質量分析器原理後,要如何引導離子進到軌道阱分析是一大課題。在圖二說明 了 Q-Exactive 內部結構,當離子進到 C 型阱後,會將所有離子導入軌道阱做質量分析,C 型 阱能將有效地將離子聚集至約1毫米的入口,所以能讓軌道阱維持高真空度(約10⁻⁹~10⁻¹⁰ Torr), 減少離子之間的碰撞並維持在軌道上。



1.2 儀器規格與功能

(1)真空系統為渦輪幫浦(turbo pump)及旋轉幫浦(rotary pump),真空度可達 ≦
 1x10⁻⁹mbar。

(2)離子傳輸元件:

A.具有 S-LENS 設計,有效提高傳輸效率。

B.包括可獨立加熱式離子毛細管。

- (3)四極桿分析器:可提供優異的前驅物離子隔離寬度(isolation window),最小值為 0.4 原子 質量單位 (unified atomic mass unit, u)。
- (4) 偵測器:

A.質量範圍設定 50~6,000 m/z, 範圍不可超過 15 倍, 且最小值不可大於 2500 m/z。

B.掃描速率≦12 赫茲。

C.質量分辨率最高可達 280,000 的解析度。

D.正負掃描模式切換小於1 秒鐘。

E.質量外校誤差小於 3 ppm。

1.2.1 掃描模式

表一、九種掃描模式介紹與描述。(擷取至 Thermo Q Exactive plus 操作手	-冊)
--	-----

方法	Description	描述
Eull MS_SIM	參考手冊第3-20頁	該實驗包含完整質譜掃描或選擇離子監測掃描 (不
Full MS_SIM		含較高能量碰撞解離碎片)。
	參考手冊第3-20頁	此全離子碎片實驗將獲得較寬的分離範圍(isolation
AIF		window)內的二次質譜碎片掃描。 此方法須設置質
		荷比範圍來定義四極桿及偵測器的掃描範圍。
	參考手冊第3-20頁	這個實驗包括一個完整的質譜掃描(沒有碰撞能
		量),接著是一個全離子碎片掃描(應用了碰撞能
Full MS / AIF		量)。 第二次掃描事件的離子進入較高能量碰撞解
		離室,第一次掃描事件的離子不進入。(本中心機
		台無法使用此方法)
	參考手冊第3-20頁	該實驗包括完整的質譜掃描(無碰撞能量),接著
Full MS / $dd-MS^2$		是一組應用碰撞能量的數據依賴掃描。 第二個掃描
(TopN)		事件的離子進入較高能量碰撞解離室,第一個掃描
		事件的離子不進入。
	參考手冊第3-20頁	該實驗根據收入清單的獲取單離子監測掃描,因此
		這是強制性且處於激活狀態。 收入清單無需任何自
Targeted-SIM		動排序,將從第一行進行到最後一行。當收入清單
		具有重疊的隔離範圍時,不會在同一掃描事件中重
		複執行。
	參考手冊第3-20頁	此平行反應監測實驗依據收入清單進行二次質譜掃
PRM		描,且從第一行依序掃描到最後一行,無需任何自
		動排序。
Targeted-SIM /	參考手冊第3-20頁	該實驗根據收入清單進行的目標選擇離子監測掃描
dd-MS ²		,接著是一組數據依賴模式的二次質譜掃描。
Full MS / AIF / NL dd-MS ²	參考手冊第3-20頁	該實驗包含一完整的質譜掃描,接著是全離子碎片
		掃描。 當在全質譜掃描中的一個訊號和後續 全離
		子碎片掃描中的一個訊號之間有使用者定義質荷比
		丢失的差值時,將在全質譜掃描的母離子上觸發數
		據依賴模式進行二次質譜掃描。中性丟失清單對於
		此實驗是強制性的。
	參考手冊第3-20頁	此非數據依賴實驗涵蓋了收入清單的掃描範圍與較
DIA		高能量碰撞解離事件,將從收入清單的第一行執行
		到最後一行,無需任何自動排序。

2 奈升流速液相層析儀 (UltiMate[™] 3000 RSLCnano, Thermo Scientific)

成大核心設施中心備有兩台奈升流速液相層析儀,型號是 Thermo Scientific UltiMate™ 3000 RSLCnano。此液相層析系統超越了傳統高效液相層析儀,並以優異的性能和靈活性滿足 所有層析性能的挑戰。此儀器由美國賽默飛世爾科技股份有限公司生產,其公司在台灣有設立 海外服務據點,各部門分工完善,儀器維修、應用諮詢、耗材購買等需求,都可以直接與原廠 聯繫。

本章節會先列出此儀器原理、儀器組成及結構、及應用介紹。

2.1 儀器原理

層析的基本原理利用與萃取的概念相似,透過流動相不停地經過滯留在管柱中的固定相。 在層析中,會以波峰與波峰間的解析度與波峰的寬度來衡量管柱分離效率。當兩個波峰相互離 得越遠,解析度越高;當波峰寬度越窄,分離效率越好。當管柱無填充固定相時,波峰增寬效 應主要來自於擴散作用。然而若進一步評估當混合分析物在有填充固定相顆粒的層析管柱內做 分離時,則需考慮固定相顆粒所帶來的增寬效應板高(Plate Height)表示管柱效率,將以下列 范第姆特方程式(van Deemter Equation)來描述影響板高的因素(圖七):



H = A + B/u + Cu

圖七、A、B/u、Cu在不同流速下對板高的影響示意圖。

板高會受到 A 多重路徑(multiple path)、B/u 縱向擴散(longitudinal diffusion)與 Cu 質量傳遞 (mass transfer)所影響。

A 多重路徑:當同一時間進入管柱的分析物在管柱中會隨機選擇不同長度的流通路徑,也 會因為行進的路徑不同,而導致在不同時間到達偵測器端,進而導致波峰的變寬,並與流速大 小無關。當填充顆粒越小、填充得均勻性越佳時,多重路徑的程度差距就會減少,因此可以有 效降低波峰增寬效應。

B/u 縱向擴散:分析物的波峰區帶中心為高濃度區,會逐漸往兩側低濃度區擴散,造成波峰的增寬效應。若提高流動相的流速會使越分析物停留在管柱中的時間越短,縱向擴散效應會越小。

Cu 質量傳遞:不同分析物在層析管柱進行分離是依流動相與固定相之間的作用力所達成。 各種分析物區應在固定相與流動相達成動態平衡,事實上分析勿是會不斷在兩相間傳遞,當同 一種分析物區帶中的大部分物質已傳遞回流動相,而有剩餘分析物仍留在固定相時,就會造成 同一種分析物區帶不斷的增寬。當流動相流速越高時,此種峰增寬效應越明顯。

目前成大提供逆向層析分析,使用碳 18 的填充材管柱作為固定相(填充材顆粒如圖八)。 當混合物以親水性流動相帶入層析系統時,低極性的化合物會先吸附於固定相上,而無法吸附 的雜質或親水性物質則會與流動相離開層析系統。當流動相以梯度的方式增加有機相比例時, 會依物質與流動相的親和力將物質從管柱沖提到質譜分析。此層析法最適合分子量小於 2000 能溶解在低極性溶劑中的非極性化合物。



圖八、碳18層析管柱之填充材示意圖。

2.2 儀器規格及結構

圖九為成大備有的奈升流速液相層析儀,其組成由上到下為去氣泡機、幫浦機、管柱烘箱 機(含十向閥)、自動進樣系統機。



圖九、UltiMate[™] 3000 RSLCnano 外觀與組成。

幫浦機從左而右分別為密封式清洗系統(Rear seal wash system)、奈升幫浦系統(nano pump system)區與微升幫浦系統(micro pump system),如圖十。管柱烘箱機內部組成含有兩邊管線裝設支架(tubing guides)與一個十向閥,後方有一循環式風扇,如圖十。



圖十、幫浦機與管柱烘箱機內部結構。

自動進樣系統機的組成包含了3個部分,從左邊至右分別為取樣系統、六向閥、樣本盤(如 圖十一)。取樣系統為精密的設備,經由電腦設定方法後,取樣系統能依照使用者的設定進樣 體積,使取樣系統到指定的盤位上吸取樣本。六向閥的功用是將吸取到的樣本傳送到層析系統 的中繼站,因此未經允許勿隨意調整管線。樣本盤是一個圓形軸盤,軸處有標示三個顏色,分 別為紅色、綠色、藍色,表示為三個盤架,盤架上皆有標示其英文,須依顏色放置。每個盤架 可放置40個樣本,因此最多能一次分析120個樣本,示意圖如圖十二。



圖十一、自動取樣系統機內部結構。



圖十二、樣本盤內部結構與位置編號。

表二列出了幫浦機內部各系統之規格,與成大現行使用的管柱與流動相規格。

表二、幫浦機系統規格。

功能	規格		
(a)密封式清洗系統			
溶劑	50% Methanol		
(b)奈升幫浦系統(蛋白	質體分析使用)		
最高可耐受壓力	860 bar (約13000 psi)		
最高流速	1.5 μL/min		
最低流速	0.05 µL/min		
現行使用管柱規格	Trap column: C18, 75 μm x 2cm, 3 μm Analytical column: C18, 75 μm x 25cm, 2 μm		
現行使用流動相	Micro pump: 2% ACN+0.1% FA, Flow rate:4 µL/min Nano pump: (A)ddH2O+0.1%FA, Flow rate:0.3 µL/min (B)80%ACN+0.1%FA, Flow rate:0.3 µL/min		
(c)微升幫浦系統(小分子暨代謝體分析使用)			
最高可耐受壓力	620 bar (約9000 psi)		
最高流速	2500 µL/min		
最低流速	1 μL/min		
現行使用管柱規格	C18 column: 2.1mm x 100 mm, 1.7 um		
現行使用流動相	Micro pump: (A)2%ACN+0.1%FA, Flow rate:300 ul/min (B)100%ACN+0.1%FA, Flow rate:300 ul/min		

2.3 配製流動相與置換流動相於層析儀

所需材料: LC 級乙腈適量、質譜級乙腈適量、二次水適量、甲酸適量、1 公升血清瓶、250 毫升血清瓶、1 公升玻璃量筒、250 毫升玻璃量筒、微量滴管(5 毫升、1 毫升)。

(1)100%二次水含 0.1%甲酸(蛋白體分析, nano pump (A)):使用玻璃量筒定量 250 毫升的 二次水,並倒入 250 毫升血清瓶。再使用微量滴管添加 250 微升甲酸,即完成 100%二次 水含 0.1%甲酸之配置。

(2)2%乙腈含 0.1%甲酸(小分子暨代謝體分析, micro pump (A)):使用玻璃量筒定量 980 毫升的二次水,定使用 5 毫升微量滴管添加 20 毫升乙腈。將配置好的 2%乙腈倒入 1 公升血清瓶,再使用微量滴管添加 1 毫升甲酸,即完成 2%乙腈含 0.1%甲酸之配置。

(3)80%乙腈含 0.1%甲酸(蛋白體分析, nano pump (B)):將 250 毫升玻璃量筒內加入 200 毫升的質譜級乙腈,以二次水定量至 250 毫升刻度。將配置好的 80%乙腈倒入 250 毫升血清瓶,再使用微量滴管添加 250 微升甲酸,即完成 80%乙腈含 0.1%甲酸之配置。

(4)100%乙腈含 0.1%甲酸 (小分子暨代謝體分析, micro pump (B)):使用玻璃量筒定量 1000 毫升的乙腈,並倒入 1 公升血清瓶,再使用微量滴管添加 1 毫升甲酸,即完成 100%乙腈 含 0.1%甲酸之配置。

(5)將配置好的溶液以封口蠟膜包覆瓶口後,放置於超音波震盪機震盪 10 分鐘以去除氣泡。

(6)將溶劑換到層析儀之相對管線上,磁石不可露出於水面。

(7)將 Loading pump 閥逆時針轉兩圈,於幫浦設定介面按 purge,會以流速 2 ml/min 置換 幫浦內的溶液,過程共六分鐘,結束後將閥鎖緊。

(8)平衡管柱順序:先以95%流動相B、50%流動相B,最後再5%流動相B,每個過程中觀 察管柱壓力,其壓力波動小於5%,即可調整梯度繼續管柱的平衡。

21

3.服務項目介紹與儀器方法設定

3.1 微升流速方法-分子量测定

本實驗室建立的分子量測定之層析方法如表三,液相層析儀內微升幫浦系統依方法設定之 配比吸取流動相,再以每分鐘 400 微升的流速將樣本沖提至質譜儀進行分子量測定(質譜儀參 數設定如表四)。

表三、分子量測定項目之層析條件。

時間(分鐘)	(A)2%乙腈含0.1%甲酸(%)	(B)100%乙腈含0.1%甲酸(%)
0	0%	100%
2	0%	100%

流速:400微升/分鐘

表四、分子量測定項目之質譜條件。

Full MS	
Polarity	Positive/Negative
Resolution	70,000
AGC target	3e6
Maximum IT	200 ms
Scan range	50 to 750 or 100 to 1000

3.2 微升流速方法-小分子暨代謝體分析

本實驗室建立的小分子暨代謝體測定之層析方法如表五,液相層析儀內微升幫浦系統依方 法設定之配比吸取流動相,再以每分鐘 300 微升的流速將樣本於管柱進行層析,最後將沖提物 送至質譜儀進行分析(質譜儀參數設定如表六)。

表五、小分子暨代謝體分析項目之層析條件。

時間(分鐘)	(A)2%乙腈含0.1%甲酸(%)	(B) 100%乙腈含0.1%甲酸(%)
0	95%	5%
2	95%	5%
22	0%	100%
24	0%	100%
24.1	95%	5%
25	95%	5%

流速:300微升/分鐘

表六、小分子暨代謝體分析項目之質譜條件。

Full MS/dd-MS ² (TopN)	
Polarity	Positive/Negative
Default charge state	2
Full MS	
Resolution	70,000
AGC target	3e6
Maximum IT	100 ms
Scan range	50 to 750 or 100 to 1000
dd-MS ²	
Resolution	17,500
AGC target	1e5
Maximum IT	50 ms
Loop count (Top N)	10
Isolation window	2 <i>m/z</i>
(N)CE	NCE:30
dd settings	
Dynamic exclusion	10 s
Exclude isotopes	On

3.3 奈升流速方法-蛋白體分析

本實驗室建立的蛋白體測定之層析方法如圖十三,液相層析儀內分別有奈升幫浦系統與微 升幫浦系統依方法設定之配比吸取流動相,再依流速將樣本於管柱進行層析,最後將沖提物送 至質譜儀進行分析(質譜儀參數設定如表七)。



1向位

圖十三、蛋白體分析項目之層析條件與十向閥設定。

表七、蛋白體分析項目之質譜條件。

Full MS/dd-MS ² (TopN)	
Polarity	Positive
Default charge state	2
Full MS	
Resolution	70,000
AGC target	3e6
Maximum IT	200 ms
Scan range	200 to 2000
dd-MS ²	
Resolution	17,500
AGC target	1e5
Maximum IT	50 ms
Loop count (Top N)	10
Isolation window	1.6 <i>m/z</i>
(N)CE	NCE:35
dd settings	
Charge exclusion	Unassigned, 1, 8, >8
Dynamic exclusion	10 s
Exclude isotopes	On

4 機台操作與軟體介紹

4.1 Tune 軟體介紹(控制質譜儀)

(1)介面



(2)選擇 Tune file

				🎜 select the file name	of the new tune file				×	
					This PC > Local Disk (C:) > Xcalibur > methods	T T	une file	路徑	Q	
				Organize - New	folder				0	
					A Name D	at modified	Туре	Size	-	
🎜 Thermo Q Exactive PI	us — HESI_200uL_POS_100_1000 — Performance - Affected: HMR Mode Calibration (ne	:g) - HN	1R eFT Paran	🖈 Quick access	backup 1	/1 /2022 10-40 AM	File folder			
File Windows Report	s Help			Desktop 🔋	AHFP_20171227.mstune 1	2/ 7/2017 3:11 PM	MSTUNE File	4 KB		
Load Tune File				👆 Downloads 🛪	Busprione_20171228.mstune 1	2/ 8/2017 9:53 AM	MSTUNE File	4 KB		
Load Tune Hie				😫 Documents 🤞	CHO_A-2.mstune 8	/4 2021 3:29 PM	MSTUNE File	4 KB		
Save Tune File as				📰 Pictures 🛛 🛪	Default_AHFP.mstune 1.	2/ 4/2017 9:30 PM	MSTUNE File	4 KB		
Export system set	ings		L Snor	DESKTOP-T11 🛪	Default_nativemAb.mstune 1.	2/ <mark>4/2017 9:31 PM</mark>	MSTUNE File	4 KB		
T		_		Q Exactive Plus	HESI_200uL_NEG_50_750.mstune 1.	2/ 0/2021 7:07 PM	MSTUNE File	4 KB		E
rerminate			I 🔟 🥳	20220714JingYe	HESI_200uL_NEG_100_1000.mstune 4	/8 <mark>2022 7:08 PM</mark>	MSTUNE File	4 KB		
Max Scan paramet	ers	2	Scan: #32	data	HESI_200uL_NEG_146_2200 .mstune 1	1/ 5/2021 5:53 PM	MSTUNE File	4 KB		
History		-11	Type: FT?	data	HESI_200uL_NEG_200_3000.mstune 1.	2/0/2021 7:19 PM	MSTUNE File	4 KB		E
Scan type	Full MS	-11		Mathed	HESI_200uL_POS_100_500_NSYU.mstune 3	/1 /2022 12:36 PM	MSTUNE File	4 KB		
Scan range	100.0 to 1,000.0 m/z	_ 11	100	Method	HESI_200uL_POS_100_1000.mstune 4	/8 2022 7:09 PM	MSTUNE File	4 KB		
Fragmentation	None		1 1	💻 This PC	HESI_200uL_POS_146_2200.mstune 1	1/ 5/2021 4:10 PM	MSTUNE File	4 KB		
Resolution	70,000			3D Objects	HESI_200uL_POS_200_3000.mstune	0/ /2021 3:52 PM	MSTUNE File	4 KB		
Polarity	Positive		80	Desktop	HESI_600uL_POS_200_s000.mstune	2/ 8/2021 1:41 PM	MSTUNE File	4 KB		
Microscans	1		?	Documents	HESI_Installation (3).mstune 9	/2 /2021 6:56 PM	MSTUNE File	4 KB		
Lock masses	Off		ě	Downloads	HESI_Installation MS2.mstune	1/1/2021 11:30 AM	MSTUNE FILE	4 ND		
AGC target	1e6		ă.	h Murie	HESI Installation metune	2/ 4/2017 0-47 PM	MSTUNE File	4 KB		
Maximum inject time	50	- 11	P 60	Distant	HFSI Installation NEG (2) instune 1	1/ 5/2021 1:53 PM	MSTUNE File	4 KB		
	During Charles	- 11	Abt.	Pictures	Nano Source.mstune	2/ 8/2017 2:59 PM	MSTUNE File	4 KB		t.
Apply	Help Hot link	- 88	ě	Videos	Nano Source 20180213.mstune 4	/2 /2018 11:24 AM	MSTUNE File	4 KB		
D.d		-	1 40	Local Disk (C:)	Nano Source_20180424.mstune 4	/2 /2018 11:14 AM	MSTUNE File	4 KB		L
MESI source		* E	ar I	🚛 Local Disk (D:)	NSI.mstune 1	1/ 5/2021 5:24 PM	MSTUNE File	4 KB		L
	actu	Jal	1	Expansion (G:)	NSI_300nL_POS_400_2000.mstune 1	1/ /2021 5:58 PM	MSTUNE File	4 KB		[
Sheath gas flow rate	35 0	-88	20	Expansion (G:)	NSI_20211125.mstune 1	1/ 5/2021 5:24 PM	MSTUNE File	4 KB		
Aux gas flow rate	10 0	-88	20	data	NSI_20220118.mstune 1.	/1 /2022 2:51 PM	MSTUNE File	4 KB		
Sweep gas flow rate	0 0	-01		OF 202205	ZipChip default tune.mstune 1.	/2 /2018 11:01 AM	MSTUNE File	4 KB		
Spray voltage (kV)	4.00 0.01	-01		05 202205						
Spray current (µA)	0.00		0							
Capillary temp. (*C)	320 320	-11		QE_20220506(@	避理人滴bhung	fila				
S-lens RF level	60.0	_88		QE_DATA_20220	世界 百週时 une	me				
Aux gas heater temp (C) 0 6		Mess	Start_Here_Mac.	· •					Ł
Source Auto-Default	5		Priority	F	ile name: HESI_200uL_POS_100_1000		✓ MS tune file	es (*.mstune)	\sim	ŀ
Apply Help		- 11	ŏ				Open	Cancel		
нер Help			Ø						- 1	
~			II. (~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~	. 09-21-45 002. I	nforming instrument shout a stonned device of time A					

4.2 Xcalibur 軟體介紹(控制層析儀)









(3)控制自動進樣系統之介面。

Direct Control

Home Sampler	洗針設	Audit	▲ 様本盤位	
Home Sampler Module Status Connected Ready Add ie Connect Connect Connect More Options Wellness Service Qualification. Relays/Inputs Inject Pos. BE7 Vol. 5.000 [ul] Inject Stop Inject	>/C ≟ Start Up Pr 3 3 Was 100.0 100.0 Image: Start Up Pr 3 Was 100.0 Image: Start Up Image: Start Up Pr 3 Was 100.0 Image: Start Up Image: Start Up Pr 3 Image: Start Up Image: Start Up Pr 3 Image: Start Up Image: Start Up Imag		「Tray Control Red Segment Tray Type 40_Vials 「Tray To Front Vials To Front Vials To Front Vials To Front Vials To Front Vials To Front Vials To Front Tray Type 40_Vials 「Tray Type 40_Vials 「Tray To Front Vials To Front Vials To Front Vials To Front Vials To Front Vials To Front Vials To Front	休 4 强 通 经 政 Temperature Control Temp. Control Nominal Temp. Temp. Ready Delta 1.01°C1 ÷ Actual Temp. Ready 10.01°C1 4
Audit Trail	Time	Retention	Davier	Managa
Audit Trail Date 1 (1) 7/18/2022	Time 10:26:30 AM +08:00	Retention Time	Device	Message User DESKTOP-KVG48J2\admin (admin)
Audit Trail Date 1 1 7/18/2022 2 1 7/18/2022	Time 10:26:30 AM +08:00 10:26:30 AM +08:00	Retention Time	Device	Message User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin)
Audit Trail Date 1 1 7/18/2022 2 1 7/18/2022 3 1 7/18/2022	Time 10:26:30 AM +08:00 10:26:30 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00	Retention Time	Device	Message User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin)
Audit Trail Date 1 7/18/2022 2	Time 10:26:30 AM +08:00 10:26:30 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00	Retention Time	Device	Message User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin)
Audit Trail Date 1 1 7/18/2022 2 1 7/18/2022 3 1 7/18/2022 4 1 7/18/2022 4 7/18/2022 5 1 7/18/2022 4 7/18/2022 4 7/18/2022 5 1 7/18/2022 5 1 7/18/2022 7 7/18/202 7	Time 10:26:30 AM +08:00 10:26:30 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:06:47 AM +08:00	Ketention Time	Device	Message User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) The system time or time zone settings
Audit Trail Date 1 (i) 7/18/2022 2 (i) 7/18/2022 3 (i) 7/18/2022 4 (i) 7/18/2022 5 (i) 7/18/2022 5 (i) 7/18/2022 5 (i) 7/18/2022 6 (i) 7/18/2022 7/18/202 7/18/202 7/18/202 7/18/202 7/18/202 7/18/202	Time 10:26:30 AM +08:00 10:26:30 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:06:47 AM +08:00 8:06:49 AM +08:00	Ketention Time Sj	Device ystem	Message User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) The system time or time zone settings The system time or time zone settings
Audit Trail 1 1 7/18/2022 2 1 7/18/2022 3 1 7/18/2022 4 7/18/2022 4 7/18/2022 5 1 7/18/2022 6 7/18/2022 6 7/18/2022 6 7/18/2022 7/18/202 7/18/202 7/18/202 7/18/20 7/18/202 7/18/20 7/18/20 7/18/20 7/18/20 7/18	Time 10:26:30 AM +08:00 10:26:30 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:06:47 AM +08:00 8:06:49 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00	Retention Time Sy Sy	Device /stem /stem	Message User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) The system time or time zone settings The system time or time zone settings
Audit Trail 1 Date 1 7/18/2022 2 7/18/2022 3 7/18/2022 4 7/18/2022 5 7/18/2022 6 7/18/2022 7 7/16/2022 7 7/16/2022	Time 10:26:30 AM +08:00 10:26:30 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:06:47 AM +08:00 8:06:49 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00	Retention Time Sy Sy C(Device /stem /stem olumnOven	Message User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) User DESKTOP-KVG48J2ladmin (admin) The system time or time zone settings The system time or time zone settings Inject valve has switched to 'Load'
Audit Trail I Date 1 1 7/18/2022 2 1 7/18/2022 3 1 7/18/2022 4 1 7/18/2022 5 1 7/18/2022 6 1 7/17/2022 7 1 7/16/2022 8 S 7/16/2022	Time 10:26:30 AM +08:00 10:26:30 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:06:47 AM +08:00 8:06:49 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00	Retention Time Sy Sy Cr	Device /stem /stem olumnOven	Message User DESKTOP-KVG48J2\admin (admin) The system time or time zone settings Inject valve has switched to 'Load' End of Standby.
Audit Trai Date 1 1 7/18/2022 2 1 7/18/2022 3 1 7/18/2022 4 1 7/18/2022 4 1 7/18/2022 5 1 7/18/2022 6 1 7/18/2022 7 1 7/16/2022 8 5 7/16/2022 9 7/16/2022	Time 10:26:30 AM +08:00 10:25:30 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:06:47 AM +08:00 8:06:49 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00	Retention Time Sy Sy C(0.000	Device /stem /stem olumnOven	Message User DESKTOP-KVG48J2\admin (admin) The system time or time zone settings The system time or time zone settings Inject valve has switched to 'Load' End of Standby. Entered stage "End"
Audit Trail I Date 1 1 7/18/2022 2 1 7/18/2022 3 1 7/18/2022 4 1 7/18/2022 5 1 7/18/2022 6 1 7/18/2022 7 1 7/18/2022 8 5 7/16/2022 9 7/16/2022 10 7 7/16/2022	Time 10:26:30 AM +08:00 10:26:30 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:06:47 AM +08:00 8:06:49 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00	Retention Time Sy Sy 0.000 0.000	Device /stem /stem olumnOven	Message User DESKTOP-KVG48J2/admin (admin) The system time or time zone settings The system time or time zone settings Inject valve has switched to 'Load' End of Standby. Entered stage "End" End If
Audit Trail Date 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	Time 10:26:30 AM +08:00 10:26:30 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:06:47 AM +08:00 8:06:49 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00	Retention Time Si Si 0.000 0.000 0.000	Device /stem /stem olumnOven umpModule.LoadingPump	Message User DESKTOP-KVG48J2\admin (admin) The system time or time zone settings The system time or time zone settings Inject valve has switched to 'Load' End of Standby. Entered stage "End" End If PumpModule LoadingPump.Flow.Nominal
Audit Trail Date 1 1 7/18/2022 2 1 7/18/2022 3 1 7/18/2022 4 1 7/18/2022 5 1 7/18/2022 6 1 7/18/2022 6 1 7/17/2022 7 1 7/16/2022 8 5 7/16/2022 9 7/16/2022 7/16/2022 10 2 7/16/2022 11 7/16/2022 7/16/2022	Time 10:26:30 AM +08:00 10:26:30 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:06:47 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00	Retention Time Si 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000	Device /stem /stem olumnOven umpModule.LoadingPump	Message User DESKTOP-KVG48J2/admin (admin) Inser DESKTOP-KVG48J2/admin (admin) Inserved to the other of the system time or time zone settings Inject valve has switched to 'Load' End of Standby. Entered stage "End" End If PumpModule_LoadingPump.Flow.Nominal If 1: Yes
Audit Trai 1 0 2 0 3 7/18/2022 3 7/18/2022 4 7/18/2022 5 7/18/2022 6 7/17/2022 7 0 7 7/16/2022 9 7/16/2022 10 7/16/2022 11 7/16/2022 12 7/116/2022 13 7/16/2022	Time 10:26:30 AM +08:00 10:26:30 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:06:47 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00	Retention Time Si 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000	Device /stem /stem olumnOven umpModule.LoadingPump	Message User DESKTOP-KVG48J2/admin (admin) The system time or time zone settings The system time or time zone settings Inject valve has switched to 'Load' End of Standby. Entered stage "End" End If PumpModule.LoadingPump.Flow.Nominal If 1: Yes Entered stage "Final Flow"
Audit Trail Date 1 i) 7/18/2022 i) 7/16/2022 i) 7/16/202 i) 7/16/2022 i) 7/16/2022 i) 7/16/2	Time 10:26:30 AM +08:00 10:26:30 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:25:51 AM +08:00 10:06:47 AM +08:00 9:04:11 AM +08:00 9:	Retention Time Sy 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000	Device ystem ystem olumnOven umpModule.LoadingPump	Message User DESKTOP-KVG48J2'admin (admin) If system time or time zone settings Inject valve has switched to 'Load' End of Standby. Entered stage "End" Entered stage "Final Flow" Wait finished

4.3 建立儀器分析方法

- (1) 開啟 xcalibur 軟體,點選 Instrument setup。
- (2) 輸入一針分析時間與即時監測的參數後,點擊右下角 Next。

I Untitled - Thermo Xcalibur Instrument Setup	- 🗆 X
File SII Xcalibur Help	
General Settings for System. Themos Silfor Silfor 2000 ③ [0 100.100000 000 min] 輸入分析時間	*
2000 ② 10:00.0000.000 min 翰入分析時間 2000 ③ 10:00.10000.000 min 翰入分析時間 2000 ③ 2000 ⑤ 2000 2000 ③ 2000 ⑤ 2000 2000 ⑤ 2000 ⑤ 2000 2000 ⑤ 2000 ⑥ 2000 2000 ⑥ 2000 ⑥ 2000 2000 ⑦ 2000 ⑧ 2000 1 ⑦ 20000 ⑦ 2000 1 ⑦ 200000 ⑦ 20000 1 ⑦ 20000000 ⑦ 20000 1 ⑦ 2000000000 ⑦ 20000000 1 ⑦ 200000000000000 ⑦ 2000000000000000000000000000000000000	
< Back	Next > Cancel Help
jan	

(3) 輸入使用的流動相溶液名稱後,點擊右下角 Next。

Image: Untitled - Thermo Xcalibur Instrument Setup File SII Xcalibur Help Image: Imag		-	
General Settings for LoadingPump (NCS-3500RS).			6
Themo Solvents Solvents Name Solvents %A S01420-2%ACIN-0.1%FA Q %B 100%ACIN-0.1%FA Q %C %C %C	輸入流動相		
Pressure Limits	- Maximum Flow Acceleration Deceleration Up:frinte]① [19999999 µl/min ²] Down:Î① [19999999 µl/min ²]		
Deads	< Back Next >	Cancel	Help

🗰 Untitled - Thermo Xcalibur Instrument Setup File SII Xcalibur Help - 🗆 × 6 Flow Gradi ent for LoadingPump (NCS-3500RS) 100 %A %B %C Flow[µl/min] Thermo Scientific SII for 75-200 Q Exactive Plus • Orbitrap MS 50-1000 25 24.0 8.0 10.0 12.0 14.0 16.0 18.0 20.0 22.0 25.0 No 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 Flow [µl/min] %B %C Curve Time 0.000 0.000 New Rov 0.000 5.000 23.000 24.000 25.000 New Rov 25.000 Equilibration 0.0 Delete 輸入層析梯度 5.0 300.000 Run 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 (注意是填入B相配比) 300.000 300.000 300.000 300.000 300.000 5.0 5.0 100.0 100.0 5.0 Stop Run Remove Equilibration Stage < Back Next > Cancel Help

(4) 輸入時間、流動相梯度及流速後,點擊右下角 Next。

(5) 自動取樣系統的參數不更動,故直接點擊右下角 Next。

Untitled - Thermo Xcalibur Instrument Setup		- 0
Canceral Settings for Sampler Terms Sensorio 10 for D Exactive Plus - Obtras MS - Obtras MS	(vIPS-3000).	· 不更動此頁參數
Vitah Volume: Vitah Speed: Low Dispersion Mode LD Flow: LD Flow:	100.000 () <t< td=""><td></td></t<>	
		< Back Next > Cancel Help

(6) 確認取樣方法,預設方法為 ulPickUp,以三明治式方法夾取樣本。說明:於 R3 位置放置 transfer solvent (2%ACN+0.1%FA),自動進樣系統會先吸取 transfer solvent,再至樣本瓶處吸取樣本,再吸取 transfer solvent,以三明治式方法,將樣本帶入層析系統。設定完成後,點擊右下角 Next。

III Untitled - Thermo Xcalibur Instrument Setup	
File SIIXcalibur Help	
Inject Mode for Sampler (IVIPS-3000).	1
Themeno Linect Mode: uPlok Lip · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
Connected Pump Device: LoadingPump Q Synchronize Bytection With Pump	
U Exactive Plus - Dobine MS Transport Vals (uPickup): R3 VQTor R3 VQ Transport Vals Canachy: 99999 D1 0. 99999	
rangent via Functure Legen: [2:000] 2 [0:00]	
Flush Volume (FullLoopPartial) 5000	
Flush Volume 2: 5 000 Q [0 00010000.000 µ]	
Loop Overfill: 2 000 Q (1 000.10 000)	
< Back Next > Cancel	Help
Ready Control of Contr	

(7) 確認樣本盤的溫度。

Intilled - Thermo Xcalibur Instrument Setup File SII Xcalibur Help		×
Image: Control for Sampler (WPS-3000).		Ĭ
Terms Scientific Sill for C Scientific Sill for C Deschare Fun - Obling MS Safety Limits Lower Limit 40 Q (40450 °C) Upper Limit 450	不更動此頁參數	
	< Back	Next > Cancel Help

(8) 設定管柱烘箱溫度。

Untitled - Thermo Xcalibur Instrument Setup			- 0	×
File Sil Xcalibur Help				
Mindes - Inemo Action/ Instrument Setup For Sitzations Help General Settings for ColumnOven (NCS-3500RSC). Temperature Control Use Temperature Control Use Temperature Control Use Temperature General Settings for ColumnOven (NCS-3500RSC). Temperature Use Temperature Control Use Temperature Good Temperature Todo Temperature Temperature	可依方法調整,預設方法為攝氏40度。 也可以關閉控溫功能。			-
				01000000
		< Back Next >	Cancel Help	
Ready				

(9) 六向閥控制設定。

III Unbited - Thermo Xcalibur Instrument Setup				- 0	×
File SII Xcalibur Help					
					NO SOLO
Valve(s) Time program for ColumnOven (NCS-3500RSC).			_	÷	L
No Time ValveRight Treme at 1 (Tobul Time) T估大法投空,热它吃問及問台(1-9式6-1)				Add	
5000005100 马侬方法設定,設定时間及限时(1-2或0-1)				Remove	
				Sort	
C Exactive Plus					
	< Back	Next >	Cancel	Help	
Ready					

(10) 層析方法設定完成,點擊 finish。

Untitled - Then	no Xcalibur Instrument Setup				– 🗆 🗙
File SII Xcalibur	Hep				
	X Y				
	You now have entered all data required to create an instrument method.				
Thermo Scientific SII for	Press Finish to complete the wizard.				
Q Exactive Plus • Orbitrap MS					
		< Back	Finish	Cancel	Help
Ready					

(11) 接著設定質譜方法,依方法挑選合適的 tune method,於 experiments 處挑選掃描模式 並點擊兩下,於右側設定相關參數。

Tune Files C:\Xcalibur\met	nods\HESI_200uL_N	VEG_100_1000.mstune									Properties Properties of the method
for External Hardware	1	2	3	4	5 time (min)	6		8	9	10	✓ Time Method duration 10.00 min
Scan Groups		2	3	4	5			8	9	10	Method duration Duration of the method
Experiments					time (min)					× 1.00	Properties of Tunefiles General Switch Count 0 Base Tunefile C:\Xcalibur\
E AL MS-SM AF Targeted SIM FRM FRM FRM FRM FRM FRM FRM FR	8						vs 51 manue 51	00 matume 00 matume 00 matume 00 matume 00 matume matume matume 00 matume 00 matume 00 matume		挑主	選合適tune file Base Tunefile Set of tune values to assume at

(12) 選擇掃描模式後,記得於右側確認掃瞄範圍、正負電掃描模式及分析時間。

I Untitled - Then	mo Xcalibur Instrument Setup										- 🗆 ×
	X ?										
	Global Lists Tune Files C:Xcalbur/methods\	HESI_200uL_NEG_100_1000 mstune									Properties Properties of the method Use lock masser best
*Thermo Scientific SII for		i 2	3	4	5 time (min)	6	ż	ŝ	ġ	10	Chrom. peak wi 15 s Time Method duration 10.00 min V Method duration Duration of the method
"G Exactive Plus - Orbitrop MS	Participant Experiments Ceneral Cene			4	time (min)	é	- <u>+</u>	å		10	Properties of Full MS — SIM / General Runtime 0 to 10 min Polarity positive / Full MS — SIM Resolution 70,000 AGC target 3e6 Maximum IT 200 ms Scan range 150 to 2000 m/z ///////////////////////////////////
Ready											NOT SAVED

(13) 完成設定後點選左上角 file>save,即可將方法儲存於預設的資料夾中。

O Global Lists Dock Masses inclusion inclusion inclusion inclusion inclusion	Masses	Properties Properties of the method
CxXxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx	Name Name Date modified Type Deskop Adds 7/18/2022 1023 AM File folder Deskop Adds 7/18/2022 1023 AM File folder	Use lock masses best Chrom, peak width (WH 15 s Time Method duration Duration of the method Properties of PRM General Properties of PRM General Properties of PRM General Properties of PRM Second 17,500 AGC target 2e5 Maximum T 100 ms
AF Sr Add X / dd M3' (Topk) IF Targerd SM PAR PAR PAR PAR PAR PAR PAR PAR	Wetwork File name: Save Save as type: Methods C meth) V Cancel	Food fort mass — (i)(CE / depend (iv)CE - nea: 35

4.4 層析流動相置換(Purge)

(1) 配製流動相,皆使用LC級或更高的純度之有機溶劑與二次水配製,將溶液瓶口使用 鋁箔紙覆蓋後,使用超音波震盪機震盪 20 分鐘以去除氣泡。

(2) 將溶劑換到層析儀之相對管線上,磁石不可露出於水面。

(3) 將 Loading pump 閥逆時針轉兩圈,於幫浦設定介面按 purge,會以流速 2 ml/min 置換幫浦內的溶液,過程共六分鐘,結束後將閥鎖緊。



(3-1)此步驟為蛋白體分析操作。將 nano pump 上兩個閥向左轉到全鬆,並於軟管上接上 針筒盛接廢液。於幫浦設定 Bothblocks 後按 purge,會以高流速置換幫浦內的溶液,過程 共 30 分鐘,結束後將閥鎖緊。





(3-2) 此步驟為蛋白體分析操作。將 nano pump 的管線(nano viper)換成 micro viper,於幫 浦設定選擇 Flowmeter 後按 purge,會置換管路內的溶液,過程共 30 分鐘,結束後將管路 接回。

鬆開nano viper並換上micro viper



(4)平衡管柱順序:先以95%流動相B、50%流動相B,最後再5%流動相B,每個過程中觀 察管柱壓力,其壓力波動小於5%,即可調整梯度繼續管柱的平衡。

4.5 建立上機清單

(1) 開啟 xcalibur 軟體,點選 sequence setup。



		樣本名稱		檔案儲存路徑	儀器分析方法		盤位	進樣	體積
	Sample Type	File Name	Sa	Path	Inst Meth	Pro	Position	Inj Vol	Level
1	Unkno •	SDO_1_POS	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_POS_100_1000_2min		GA1	5.00	•
2	Unkno •	WASH_A1_1	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_POS_100_1000_2min		GA2	5.00	-
3	Unkno •	ENZYME_1_100X_POS	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_POS_100_1000_2min		GB1	5.00	•
4	Unkno •	ENZYME_2_100X_POS	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_POS_100_1000_2min		GB2	5.00	•
5	Unkno •	NM_POS	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220525_CSPN_500_6000		GB3	5.00	•
6	Unkno •	WN_POS	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220525_CSPN_500_6000		GB4	5.00	-
▶ 7	Unkno	N2H6CL2_NEG	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_neg_100_1000_2min		GB5	5.00	-
8	Unkno	NH4CL_NEG	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_neg_100_1000_2min		GB6	5.00	-
9	Unkno •	UNKNOWN_NEG	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_neg_100_1000_2min		GB7	5.00	-
10	Unkno •	1_NEG	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_neg_100_1000_2min		GB8	5.00	-
11	Unkno •	2_NEG	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_neg_100_1000_2min		GC1	5.00	-
12	Unkno •	DIME_10PPM_NEG	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_neg_100_1000_2min		GC2	5.00	-
13	Unkno •	2LPA_DIOL_10PPM_NEG	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_neg_100_1000_2min		GC3	5.00	-
14	Unkno •	NH4CL_NEG_50_500	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_neg_50_500_2min		GB6	5.00	-
15	Unkno •	2LPA_DIOL_10PPM_POS	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_POS_100_1000_2min		GC2	5.00	-
16	Unkno •	DIME_10PPM_POS	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_POS_100_1000_2min		GC3	5.00	-
17	Unkno	WASH_A1_1_neg	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_neg_50_500_2min		GC3	5.00	-
18	Unkno •	SU_1_NEG	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_neg_100_1000_2min		GB8	5.00	-
19	Unkno •	SU_2_NEG	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_neg_100_1000_2min		GC1	5.00	-
20	Unkno •	SU_1_POS	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_POS_100_1000_2min		GB8	5.00	•
21	Unkno •	SU_2_2_POS	1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_POS_100_1000_2min		GC1	5.00	•
									-

(2) 於 File name 輸入樣本名稱; Path 設定檔案儲存路徑(預先於路徑開好資料夾); Inst Meth 設定儀器分析方法的路徑; Position 輸入盤位上的編號; Inj vol 輸入注射體積。

quisition Queue	5	ample Type File Name	Sa.	Path	Inst Meth		Pro Position	Inj Vol	Level	Sample Wt	Sample V
Squittibo Device mager by to Denviload avec mea avec mea avec mea avec mea bing Onc. Somethe State Xealboar File: Method & State Xealboar Sarentife State Xealboar Without Charlow Without Cha	■ ■ ■ ■ ■ □	wince is pool / file Name Ninkma. \$ 500 / JPOS winkma. \$ 802 / NHE _ 1 00X / DOS ninkma. NIX / POS ninkma. NIX / SUS /	Sa. 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	Date Description DifLeard 202207/202207_VACHIN Browse DifLeard 202207/202207_VACHIN Clear Cells DifLeard 202207/202207_VACHIN Clear Cells DifLeard 202207/202207_VACHIN Description DifLeard 202207/202207_VACHIN Description DifLeard 202207/202207_VACHIN Description DifLeard 202207/202207_VACHIN Description DifLeard 202207/202207_VACHIN22220704_MMVDDATA DifLeard 202207/202207_VACHIN22220704_MVMDDATA DifLeard 20207/202207_VACHIN22220704_MVMDDATA DifLeard 20207/202207_VACHIN22220704_MVMDDATA DifLeard 20207/202207_VACHIN22220704_MVMDDATA DifLeard 20207/202207_VACHIN22220704_MVMDDATA DifLeard 20207/202207_VACHIN22220704_MVMDDATA DifLeard 20207/202207_VACHIN22220704_MVMDDATA DifLeard 20207/202207_VACHIN22220704_MVMDDATA DifLeard 20207/202207_VACHIN2220704_MVMDDATA DifLeard 20207/202207_VACHIN22220704_MVMDDATA DifLeard 20207/202207_VACHIN2220704_MVMDDATA DifLeard 20207/202207_VACHIN22220704_MVMDDATA DifLeard 20207/202207_VACHIN2220704_MVMDDATA DifLeard 20207/202207_VACHIN22220704_MVMDDATA DifLeard 20207/202207_VACHIN2220704_MVMDATA	Mai 202207/202207 JU2C07 JU2C01	0704, MWMETHOD.20220616, POS, 100, 1000, 2min er Objects ktop suments vinloads sic sic eos	Pic_ Popicon GA1 X	500 500 500 500 500 500 500 500 500 500	Level	Sample W1 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000	Sample
	16 U 17 U 18 U 19 U 20 U 21 U 21 U 2	hkno = UIME_U0PML/POS hkno = VASI_A1_neg hkno = SU_1/HE hkno = SU_2/HE hkno = SU_2/HE hkno = SU_2/POS		Di Dani do 2020 "Di 2022" Juni (Hi 2022) "Di 4 MIN DATA Di Dani do 2020 "Di 2022" Juni (Hi 2022) "Di 4 Di Dani do 2020 "Di 2022" Juni (Hi 2022) "Di 4 Di Dani do 2020 "Di 2022" Juni (Hi 2022) "Di 4 Di Dani di 2020 "Di 2022" Juni (Hi 2022) "Di 4 MIN Data Di Dani 2020 "Di 2022" Juni (Hi 2022) "Di 4 MIN Data Di Dani 2020 "Di 2022" Juni (Hi 2022) "Di 4 MIN Data	Di/Daska2022 >	al Disk (Cc) al Disk (Cc) 202204_before 202205 202205 202206 202207 202207_LiaoLab 202207_LiaoLab 202207_LiaoLab 20220704_IMW 20220704_IMW 20220705_pingtong 20220703_ping 20220703_yuu 20220713_yuu 20220714_dan		500 500 500 500 500 500		0.000 0.000 0.000 0.000 0.000	
	×					> 20220714_dan > 20220714_wnag > 20220718_test			Leu-		

(3) 設定完畢後,點選 File>>save xx 資料夾>>輸入清單名稱>>save。

(4) 將欲分析的樣本圈選後,按 (Run sequence)按鈕>>質譜設定為 standby>>ok

(5) 電腦會開始控制質譜儀開始分析。

Acquisition Queue		Sample Type	File Name					Pro					
in Manager	> 1	Unkno	SDO_1_POS	1 1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YA	ACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_POS_100_1000_2	min .	GA1	5.00	•	0.000	0.0
Ready to Download Sequence:	> 2	Unkno	WASH_A1_1	1 1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YA	ACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_POS_100_1000_2	min	GA2	5.00	•	0.000	0.0
Sample Name:	> 3	Unkno	ENZYME_1_100X_POS	1 1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YA	ACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_POS_100_1000_2	2min	GB1	5.00	•	0.000	0.0
Position:	> 4	Unkno	ENZYME_2_100X_POS	1 1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YA	ACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_POS_100_1000_2	?min	GB2	5.00	•	0.000	0.0
Raw File:	▶ 5	Unkno	NM_POS	1 1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YA	ACHI\20220704_MW\METHOD\20220525_CSPN_500_6000		GB3	5.00	•	0.000	0.0
termo Scientific SII for Xcalibur	> 6	Unkno	WN_POS	1 1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YA	ACHI\20220704_MW\METHOD\20220525_CSPN_500_6000		GB4	5.00	-	0.000	0.0
Ready to Download	> 7	Unkno	N2H6CL2_NEG	1 1	D:\Data\202207\202207_YACHI\20220704_MW\DATA	D:\Data\202207\202207_YA	ACHI\20220704_MW\METHOD\20220616_neg_100_1000_2	min	GB5	5.00	-	0.000	0.0
Ready to Download	> 8	Unkno	NH4CL_NEG	🔀 Run Seque	nce		× 00_2	min	GB6	5.00	-	0.000	0.0
	> 9	Unkno •	UNKNOWN_NEG	Acquisition O	ptions		00_2	min	GB7	5.00	•	0.000	0.0
	> 10	Unkno	1_NEG		Instrument	Start Instrument	User admin 00_2	min	GB8	5.00	-	0.000	0.0
	> 11	Unkno	2_NEG		Thermo Scientific SII for Ycalibur		Run Rows 1 To 5 00_2	min	GC1	5.00	-	0.000	0.0
	> 12	Unkno •	DIME_10PPM_NEG		O Exactive Plus - Orbitrap MS		00_2	min	GC2	5.00	•	0.000	0.0
	≥ 13	Unkno •	· 2LPA_DIOL_10PPM_NEG				Priority Sequence 00_2	min	GC3	5.00	•	0.000	0.0
	▶ 14	Unkno	NH4CL_NEG_50_500	Start Whe	in Ready	Change Instruments	Processing Actions _2mi	n	GB6	5.00	-	0.000	0.0
	> 15	Unkno •	2LPA_DIOL_10PPM_POS	- Instrument Method			Quan 100_2	lmin	GC2	5.00	•	0.000	0.0
	▶ 16 Unkno ▼ DIME_1	DIME_10PPM_POS		Start Up	Browse	Qual 100_2	min	GC3	5.00	•	0.000	0.0	
	> 17	Unkno	WASH_A1_1_neg				_2mi	n	GC3	5.00	-	0.000	0.0
	▶ 18	Unkno •	SU_1_NEG	Shu	it Down	Browse	Programs 00_2	min	GB8	5.00	•	0.000	0.0
	≥ 19	Unkno •	SU_2_NEG	Programs			Create Quan Summary 00_2	min	GC1	5.00	•	0.000	0.0
	≥ 20	Unkno •	SU_1_POS	Pre Aco	auisition	Browse	00_2	2min	GB8	5.00	•	0.000	0.0
	> 21	Unkno •	SU_2_2_POS				100_2	min	GC1	5.00	•	0.000	0.0
			·	Post Acq	quisition	Browse					•		
				Run Synchr	onously 🗹 Pre Acquisition 🗹 Post Acquis	ition							
				After Sequer	nce Set System O On	Off							

4.6 儀器開關機

質譜儀開機:

(1)於質譜左側開闢處,開啟總開闢(mainpower)。

(2)等待15分鐘後,開啟電子開闢(electronics)。



(3)於 Tune 軟體中, Vacuum/Bakeout 中 bakeout time 輸入 12 (hr),並按下 bake out,質譜儀 會開始抽真空,完畢 bake out 需 3 小時的冷卻,預估每次開機將花費約 15 小時的抽真空 時間。

Vacuum / Bakeout	
Vacuum / Bakeout	
Fore vacuum (mbar) 1.53E+00 🥥 UHV (mbar) 1.10E-10 🥥	
Bakeout time (h) 12 🔄 Enter standby after Bakeout 🗹	最少所需時間為12小時,再外加3小時 冷卻時間,故抽真空需15小時以上。
0.0% Bake out Stop Help	

奈升流速層析儀開機:

(1)將電源線插入插座,插上4條連線設備,最後於層析儀後方開啟電源。



(2)於電腦桌面開啟 Instrument Configuration 軟體,選擇相應層析儀代碼,並按 Done。

	Thermo Foundation Instrument Configuration		×
	Device Types : All	點選層析儀	
開啟軟體 Instrument Configurate	Available Devices: Themo Scientific SII for Xcalbur Sifter Xcalbur Sifter Xcalbur Configue Device Sifter Xcalbur Sifter Xcalbur	Configured Devices: Themo Scientific SII for Xcalibur X	
	Add >>	<< Remove Configure	
	Done	Help	

(3) 即可開啟 xcalibur 軟體 Direct control 層析系統,將幫浦與自動進樣系統點選為 connect。



奈升流速層析儀關機:

(1)確認流速接關閉為0後,中斷連線。

(2)中斷自動進樣系統機之連線。

(3)於層析儀後方關閉電源、拔除4條連線設備,最後將電源插座拔除。
質譜儀關機:

(1)將質譜關為 off。

(2)關閉電子開闢。

(3)等待15分鐘後,關閉總開關。

4.7 質譜儀之質量校正

(1)以 500 微升之注射針吸取約 100 微升之校正液,放置於微量注射式幫浦,以每分鐘 10 微升流速進樣,並將質譜儀轉為 on。

(2) 在 Tune 軟體中, Calibrate 欄位有中 calmix calibration 清單並勾選 Mass calibration(pos/neg), 質譜儀將會開始校正質量。

🔶 Calibrate					
🗘 Calibrate	٦				
0.0%					
Calibrate Stop Help					
Calmix Calibration	^				
🔲 🕀 Base Calibration	- 1				
📃 🕀 Isolation Mass and Res. (pos)					
Isolation Mass and Res. (neg)	- 1				
Mass Calibration (pos)	- 1				
Mass Calibration (neg)	- 1				
HMR Mode Calibration (pos)	- 1				
🔲 🗄 HMR Mode Calibration (neg)					
<	>				

原廠校正液編號:

正電 88323 (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88323) 、

負電 88324 (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88324)

5 案例分享

5.1 分子量測定

(1) 預測分子式為 C14H10F3N2,在正電分析下,其精確質荷比為 263.0791,即可計算質量誤差。
 公式: [(實驗質荷比-理論質荷比)/理論質荷比]*10⁶=____ppm



圖十四、分子量量測比對結果。

5.2 小分子暨代謝體分析

(1) 委測者需提供正負電模式、質荷比範圍、掃描模式等條件。

(2) 由於本實驗室尚未提供處理數據的服務,故僅提供分析檔案。

(3) 此為在正電模式下,以數據依賴擷取方法掃描質荷比範圍 100-1000 m/z 之層析圖與質譜



圖十五、小分子暨代謝體分析之層析圖與質譜圖。

5.3 蛋白體分析

(1) 委測者需提供質荷比範圍、起始蛋白量。

(2) 此為在正電模式下,以數據依賴擷取方法掃描質荷比範圍 200-2000m/z 之層析圖與質譜圖。



圖十六、蛋白體分析之層析圖與質譜圖。

5.4 蛋白質體資料庫(Mascot)比對

(1) 委測者需提供水解酵素名稱。

預設比對參數:

Il Searches User name mascot_user_full_name> User email mascot_user_email> Search title (taskname> (cparameters>), submitted from Daemon on docalhost> Taxonomy All entries Databases SwissProt Select Databases Protein mass Decoy Enzyme T Select Modifications Max. missed ok Monoisotopic Average C Peptide tol. ± 10 ppm	P AUTO V hit s kDa Trypsin V sd cleavages 2 V
User name (mascot_user_email>) Search title (taskname> (cparameters>), submitted from Daemon on docalhost>) Taxonomy All entries Databases Select Databases SwissProt Select Databases Decoy Image: Carbanidomethyl (C) Fixed Carbamidomethyl (C)	P AUTO hit s kDi Trypsin vdcleavages 2 v
Search title daskname> (qparameters), submitted from Daemon on docalhost> Taxonomy All entries Databases SwissProt Select Databases Protein mass Decoy Enzyme T Select Modifications Max. missed ch Monoisotopic Average Peptide tol. ± 10 ppm	P AUTO V hit s kD Trypsin V ed cleavages 2 V
Taxonomy All entries Report top Databases SwissProt Select Databases Protein mass Decoy Image: Comparison of Comparison o	P AUTO hit s kD Trypsin dcleavages 2
Databases SwissProt Select Databases Protein mass Decoy Image: Comparison of the second	s kD
Fixed Carbamidomethyl (C)	Trypsin
Select Modifications Max.missed cl. Monoisotopic Average Peptide tol. ± 10 ppm<	ed cleavages 2
Fixed Carbamidomethyl (C)	ed cleavages 2 💌
Fixed Carbamidomethyl (C)	
Fixed Carbamidomethyl (C)	ge 2+ 3+ and 4+ -
Fixed Carbamidomethyl (C)	5- 12+, 5+ and 4+
Fixed Carbamidomethyl (C)	
THORNOODS 1	
Variable Deamidated (NQ) modifications Ovidation (M)	
SWG-	
SIMS Ions search 🔽 Data format Mascot generic 👻 Instrument ESI-TRAP	

圖十七、Mascot 建立比對方法之介面。

比對結果:於 Mascot 上比對到共 32 種蛋白質,第一名為 Albu_bovin (牛血清白蛋白),分數為 12788,蛋白質序列覆蓋率達 74% (圖十八)。

Protein sequence coverage: 74%

Matched peptides shown in **bold red**.

1	MKWVTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRRDTHKSE	IAHRFKD LGE	EHFKGLVLIA
51	FSQYLQQCPF	DEHVKLVNEL	TEFARTCVAD	ESHAGCERSL	HTLFGDELCK
101	VASLRETYGD	MADCCERQEP	ERNECFLSHK	DDSPDLPKLK	PDPNTLCDEF
151	KADEKKFWGK	YLYEIARRHP	YFYAPELLYY	ANKYNGVFQE	CCQAEDRGAC
201	LLPK IETMRE	KVLASSARQR	LRCASIQKFG	ERALKAWSVA	RLSQKFPKAE
251	FVEVTKLVTD	LTKVHKECCH	GDLLECADDR	ADLARYICDN	QDTISSKLKE
301	CCDKPLLEKS	HCIAEVERDA	IPENLPPLTA	DFAEDKDVCK	NYQEAK DAFL
351	GSFLYEYSRR	HPEYAVSVLL	RLAKEYEATL	EECCARDDPH	ACYSTVFDKL
401	KHLVDEPQNL	IK QNCDQFEK	LGEYGFQNAL	IVRYTRKVPQ	VSTPTLVEVS
451	RSLGKVGTRC	CTRPESERMP	CTEDYLSLIL	NRLCVLHERT	PVSEKVTKCC
501	TESLVNRRPC	FSALTPDETY	VPK AFDEK LF	TFHADICTLP	DTERQIKROT
551	ALVELLKHKP	KATEEQLK TV	MENFVAFVDK	CCAADDREAC	FAVEGPKLVV
601	STQTALA				

圖十八、Albu_bovin (牛血清白蛋白)序列及覆蓋率。

† <u>Family</u>	м	<u>DB</u>	Accession	<u>Score</u>	<u>Mass</u>	<u>Matches</u>	<u>Match(sig)</u>	<u>Sequences</u>	<u>Seq(sig)</u>	L
1	1	SwissProt	ՃALBU_BOVIN	12788	71244	783	783	57	57	
1	2	SwissProt	⊿ALBU_SHEEP	5765	71139	453	453	27	27	
1	3	SwissProt	⊿ALBU_HUMAN	5286	71317	266	266	38	38	
2	1	SwissProt	⊿APOA1_GORGO	387	30759	19	19	10	10	
<u>3</u>	1	SwissProt	dIGG1_HUMAN	331	49925	30	30	7	7	
<u>3</u>	2	SwissProt	dIGHG2_HUMAN	279	36505	21	21	6	6	
<u>3</u>	3	SwissProt	ddighg3_human	235	42287	23	23	6	6	
<u>4</u>	1	SwissProt	INTERIGATION INTERIOR INTERIORI INTERI RARI R	208	79294	14	14	11	11	
<u>5</u>	1	SwissProt	d'IGKC_HUMAN	202	11929	9	9	5	5	
<u>6</u>	1	SwissProt	INTRYP_PIG	185	25078	13	13	2	2	
Z	1	SwissProt	⊿"HPT_HUMAN	161	45861	5	5	3	3	
<u>8</u>	1	SwissProt	dIGHA1_GORGO	154	38587	8	8	5	5	
9	1	SwissProt	⊠A1AG_BOVIN	152	23453	4	4	3	3	
<u>10</u>	1	SwissProt	IZCO3_HUMAN	141	188569	9	9	5	5	
<u>11</u>	1	SwissProt	ďAPOC3_BOVIN	141	10685	2	2	1	1	
<u>12</u>	1	SwissProt	d'HEMO_HUMAN	113	52385	5	5	3	3	
<u>13</u>	1	SwissProt	dCO3_BOVIN	95	188675	2	2	1	1	
<u>14</u>	1	SwissProt	⊿A1AT_HUMAN	81	46878	7	7	4	4	
<u>15</u>	1	SwissProt	Interpretation of the second seco	77	95656	3	3	2	2	
<u>16</u>	1	SwissProt	⊠OXLA_BOTJA	65	4353	2	2	1	1	
<u>17</u>	1	SwissProt	Interpretation of the second seco	65	52106	4	4	2	2	
<u>18</u>	1	SwissProt	⊿A1AG1_HUMAN	61	23725	3	3	1	1	
<u>19</u>	1	SwissProt	d [™] FIBB_HUMAN	52	56577	4	4	2	2	
<u>20</u>	1	SwissProt	⊠NAR4_HUMAN	42	36197	3	3	1	1	
21	1	SwissProt	dHV315_HUMAN	38	13089	1	1	1	1	
22	1	SwissProt	⊿A2MG_HUMAN	28	164613	1	1	1	1	
23	1	SwissProt	dZAR1_ARATH	27	79284	1	1	1	1	
<u>24</u>	1	SwissProt	⊿PSBP_SOLLC	21	27946	1	1	1	1	
<u>25</u>	1	SwissProt	dCRNS1_CHICK	19	101764	1	1	1	1	
<u>26</u>	1	SwissProt	d'IGHM_HUMAN	19	50093	1	1	1	1	
27	1	SwissProt	INTERPITE STATE <td>18</td> <td>15991</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td></td>	18	15991	1	1	1	1	
<u>28</u>	1	SwissProt	☑RNAS1_BISBI	17	14137	1	1	1	1	
<u>29</u>	1	SwissProt	Intermodel Matching Matchi	17	50370	1	1	1	1	
<u>30</u>	1	SwissProt	ICL3_ASPFN	16	32109	1	1	1	1	
<u>31</u>	1	SwissProt	raided state	16	48193	1	1	1	1	
<u>32</u>	1	SwissProt	Incsb2_strcz	14	60408	1	1	1	1	

Export as CSV

圖十九、牛血清白蛋白樣本的比對結果。

比對結果連結:

https://mybox.ncku.edu.tw/navigate/s/42106F04B89243CD9B1C1946D4655659GSY

- (1) 使用牛血清白蛋白樣本比對蛋白質家族清單。
- (2) 使用牛血清白蛋白樣本比對胜肽片段之結果。

6 參考資料(實驗室備有書籍,歡迎於實驗室內翻閱,恕不外借)

質譜分析技術原理與應用(台灣質譜學會編著)

Exactive Series Operating manual (Thermo Fisher Scientific 编著)

Ultimate[™] 3000 RSLCnano Standard Application Guide (Thermo Fisher Scientific 编著)

7注意事項

- (1)未完成自行操作訓練及認證資格的預約者僅接受委託操作方式送測,故請於上班時間送達 樣品。(星期一至星期五:上午八點半至下午五點半,請先來信通知送樣時間。)
- (2)本實驗室不接受濃度大於10mM之非揮發性鹽類、感染性、放射性、強酸強鹼、具腐蝕性的樣品,請將樣本中和、去鹽後,以0.22 μm 過濾膜過濾樣本後再行送測。
- (3) 樣本濃度請控制在 1 mg/mL,或 1 mg 之固態樣本,以利操作員配置不同濃度進行測試 (本實驗室僅接受使用二次去離子水、甲醇、乙腈、異丙醇進行樣本回溶或稀釋,若於稀釋 過程中產生沉澱,將不予上機)。
- (4) 數據會上傳非公開雲端資料夾保留兩週後刪除;本實驗室備份數據六個月後刪除。
- (5) 提供論文發表致謝實驗室或列技術員為共同作者之使用作者,依論文質化成果回饋方案提供回饋獎勵金折抵。(<u>https://ctrmost-cfc.ncku.edu.tw/p/406-1210-193460,r12.php?Lang=zh-tw</u>)
- (6) 如有其他相關樣品前處理或質譜數據處理的問題,煩請送件前先來電或 email 洽詢。
- (7) 本儀器僅提供量測服務,分析數據不得作為營利、法律訴訟之用途。

==自行操作辨法==

- (1) 儀器運作時,如有異常狀況,應隨時通報儀器技術員處理。
- (2) 數據會上傳非公開雲端資料夾保留兩週後刪除;本實驗室備份數據六個月後刪除。

==技術員聯絡資訊==

楊雅琪 技術員 TEL: (06) 275-7575 轉 31360-213, z11103063@ncku.edu.tw

國立成功大學核心設施中心 貴重儀器設備組 CE/LC-MS 核心實驗室

有機小分子 分子量測定分析服務 委測資訊表 ##\$ 章 電子郵件:z11103063@ncku.edu.tw 電話: (06) 275755 轉 31360-213

填表日期:
申
E
E

I						
申請	人姓名			科技部預約編號	(接受委测後填寫	5)
非	-教授姓名			連絡電話		
送测	1單位/条所			Email		
				樣品資訊(可自行增加)		
No.	樣品名稱	分子式	精準分子量	相容溶劑 (ddH2O/ACN/MeOH/IPA)	濃度或重量	備註
1						口去鹽,口使用離子對試劑,口已純化, 口須冷藏,口其他:
2						□去鹽,□使用離子對試劑,□已純化,□須冷藏,□其他:
3						口去鹽,口使用離子對試劑,口已純化, 口須冷藏。口其他:
4						口去鹽,口使用離子對試劑,口已純化, 口須冷藏。口其他:
S						□去鹽,□使用離子對試劑,□已純化,□須冷藏,□其他:
改 (1)	價目(收費將依最 六子量測定(Loop, 1-	新公告為主) -9件)[NT.500/一次	進樣](2)分子量定	[(Loop, 10 件以上) [NT.350/	一次進樣]	
總計	·:	,	樣,	ī		
<u>く く</u> ス	填寫完畢後請寄送3 本核心實驗室僅提6	至技術員信箱,會. 洪以下溶劑選項(dd	主動與您聯繫。 旧20/ACN/MeOH	/IPA),若選擇其他溶劑者	,須請送測者提供	· · 否則不提供服務。
≺	策本濃度建議控制有	在 1 mg/mL ・ 或 1	mg 之固態樣本	,以利操作員配置不同濃度	進行測試。	
< But	请在此申請單背面核	票示待测物之結構:	光。			
< Xigeta	數據會上傳非公開等	雲端資料夾保留兩三	過後刪除;本實 縣	食室備份數據六個月後刪除	o	

*本表請檢附於樣本內。

表格更新日期 2022/04/10

8 委測、自行操作之紀錄單

*本表請檢附於樣本內。

<

數據會上傳非公開雲端資料夾保留兩週後刪除;本實驗室備份數據六個月後刪除。

總計 4 w (1)RPLC-MS/MS(1-9 件)[NT.800/一次進樣] (2)RPLC-MS/MS(10 件以上)[NT.600/一次進樣] 收費價目 (收費將依最新公告為主) UN N 論號 掃描模式 掃描模式 **RPLC** column 申請人姓名 指導教授姓名 送測單位/条所 本核心實驗室僅提供以下溶劑選項(ddH2O/ACN/MeOH/IPA),若選擇其他溶劑者,須請送測者提供,否則不提供服務 填寫完畢後請寄送至技術員信箱、會主動與您聯繫。 個樣本、 口正電 口負電 □Full scan □DDA, top_ 詳細參數請填寫於背面空白處或提供 excel 檔說明。 C18, 1.6 µm, 100*2.1 mm 樣本名稱 **樣本清單**(10個樣本以內建議填寫於下方;10個樣本以上建議整理於EXCEL) 次進樣, (未知請填寫未知) 蒙原 K 9 8 1 编號 Email 6 預設層析方法 10 流動相 連絡電話 科技部預約編號 稀釋相容溶劑 掃瞄範圍 ddH2O/ ACN/ MeOH/ IPA (B) 100%ACN+.1%FA (A)2%ACN+0.1%FA (接受委测後填寫) Da – Da (最多 15 倍差距,最小值為 50 Da) 樣本名稱 (未知濃度請務必填寫) 濃度

聯絡資訊: 楊雅琪 技術員 電子郵件:z11103063@ncku.edu.tw 電話: (06) 2757575 轉 31360-213

有機小分子暨代謝體分析 RPLC-MS/MS 委測資訊表

填表日期:

tr

Ì

貴重儀器設備組 CE/LC-MS 核心實驗室

國立成功大學核心設施中心

43.44	Trap column: C	18, 75 µm x 2cn	ı, 3 μm	时峰影	-		1	* I _ "
	Analytical colu	nn: C18, 75 μm	x 25cm, 2 µm			Nano pump: ddH2O+0.1%	⁷ A, Flov	v rate:0.3 u
		2 -				80%ACN+0.1	%FA, 1	Flow rate:0.
掃描模式	正電			掃瞄範	<u>क</u>	Da – Da (最多 15 倍.	差距, 魚;	法测定分子量例
掃描模式	Full scan	DDA, top		凍乾樣	本回溶	□未指定,使用 ddH2O +	0.1%FA	回溶 🗌
	k	策本清單(10個	樣本以內建議填	高於下之	5;10個樣	▶以上建議整理於 EXCEL)		
※ 今 千 計	蛋白質含量	樣本體積	危險性	42 24	体干部	金 蛋白質含量	様ン	本體積
察 令 合 年	(ug/tube)	(ul,凍乾樣本免填)	(毒性,放射性,感染性)	の田安に	家个石	+ (ug/tube)	(ul, 凍韋	5禄本免填)
1				9				
2				7				
3				8				
4	<u> </u>			9				
5				10				
收費價目 (收費將1	依最新公告為主)							
(1) nanoLC-MS/MS	(60min+20min Wa	ısh, 1-9 件) [NT.:	1500/件] (2) nai	noLC-MS/	/MS (60min-	20min Wash, 10 件以上) [1	VT.1100/	件]
總計:個	樣本,	_夬進樣,	ŕ					
/ 本核心實驗室值	董接受經酵素水解	後的 peptide 積	长本分析,需自行	·除鹽。				
/ 蛋白質含量建罐	義高於 5 ug,蛋白	質上機量建議	陸制在 200ng 以1	内(進樣	量 2ul) ,以	利操作員配置。		

國立成功大學核心設施中心 貴重儀器設備組 CE/LC-MS 核心實驗室

蛋白質體分析 nanoLC-MS/MS 委測資訊表

科技部預約編號

(接受奏测後填寫)

填表日期:

th

.....

E

聯絡資訊: 楊雅琪 技術員 電子郵件:z11103063@ncku.edu.tw 電話: (06) 2757575 轉 31360-213

指導教授姓名

申請人姓名

預設層析方法

Loading pump: 2% ACN+0.1% FA, Flow rate:4 ul/min

Email 連絡電話 送測單位/条所

*樣本資訊表與科技部預約單請檢附於樣品內。

數據會上傳非公開雲端資料夾保留兩週後刪除;本實驗室備份數據六個月後刪除。

ю 4 ω N Р

表格更新日期 2022/04/10

國立成功大學核心設施中心貴重儀器設備組 LC-MS核心實驗室自行操作紀錄表

機台:	填表日期:							
操作人員		身分		大學部	/碍	ほ士/博士/	博後 其他:	
電話與分機		所屬單位						
Email								
預約及使用紀錄								
	日期	時間		總時數	;	夜氣刻度	分析結果	
原定預約時段								
第一針時間							□如期完成	
最後一針時間								
資料夾名稱			<i>年</i> 木	丢針分 f時間		分鐘	小時	
			Ê	†數		針	分鍕 	
層析設定(流速:	μ1/min)							
A pump 流動相(刻度)			B pum 流動木	.p 目(刻度)				
管柱廠牌			連線固]相萃取		□是()	
填充材材質			(管柱)	名稱)		□否		
95%A 壓力			Syring	e pump		□是 [一否	
紀錄:								
請大家遵守以下規範: □確認transfer liquid (盤位R3, ACN) 足夠 □最後一針分析有設定質譜轉為standby。 □離開前有先計算所需流動相體積,於分析結束後流動相刻度不低於磁石高度。								

聯絡資訊: 楊雅琪技術員 電子郵件:z11103063@ncku.edu.tw 電話: (06) 2757575轉31360-213