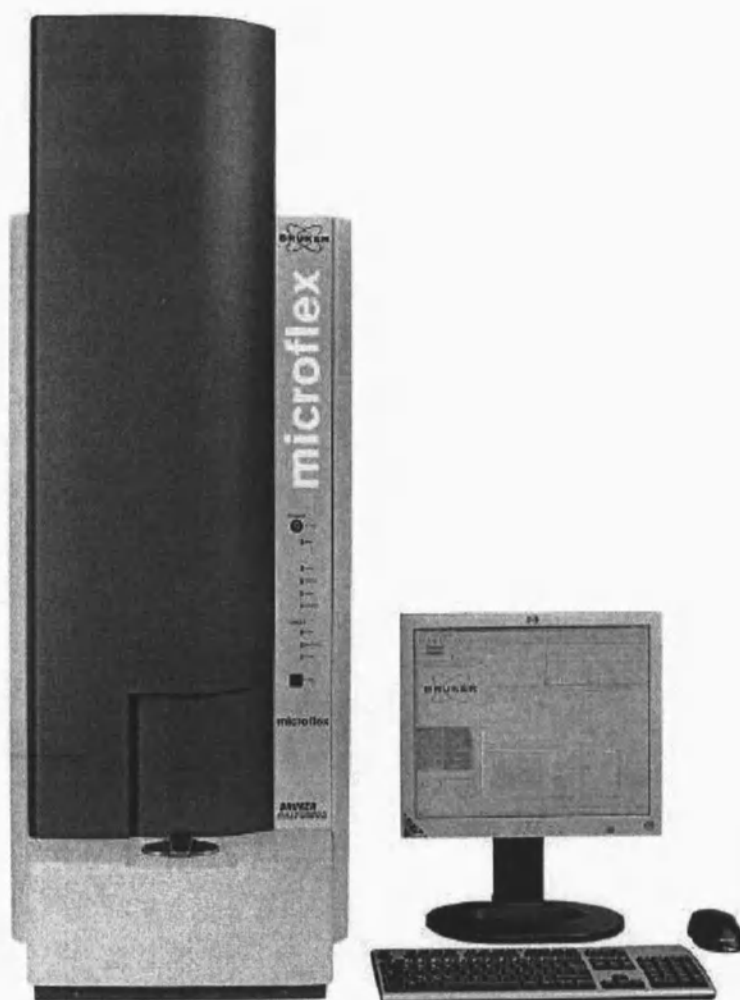




TM
microflex

Руководство пользователя



©Copyright 2004

Bruker Daltonik GmbH

Все права защищены

BRUKER
DALTONICS®

Воспроизведение, адаптация или перевод без предварительного получения письменного разрешения запрещены, за исключением случаев, предусмотренных законом об авторских правах.

История документа

Первое издание: март 2004

Напечатано в Германии

Обязательства

Информация, изложенная в данном документе, может изменяться без дополнительного уведомления клиентов.

Bruker Daltonik GmbH не дает какой-либо гарантии относительно данного материала, включая и подразумеваемые гарантии на товарное состояние и пригодность к определенным целям.

Bruker Daltonik GmbH не несет ответственности за ошибки, содержащиеся в данном документе, или же соответствующие вызванные им убытки в связи с доставкой, качеством и использованием этого материала.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Bruker Daltonik GmbH не несет ответственности за используемое программное обеспечение или оборудование, поставляемое другими компаниями.

Названия компаний и их продукции, упомянутые здесь, могут являться торговыми марками или их собственниками.

Информация о безопасности

Класс безопасности

microflex, оборудованный закрывающейся защитной крышкой, является прибором класса опасности **Class I Laser**. При открытии защитной крышки его можно классифицировать как прибор класса опасности **Class III B Laser**. Он был сконструирован и протестирован в соответствии с Требованиями по Безопасности к электрическому оборудованию для измерений, контроля и лабораторного использования, изложенными в Публикации IEC 1010-1 (Степень Загрязнения 2).

Уровень шумов

70 децибел (в позиции оператора), нормальное функционирование в соответствии с ISO 7779: 1988

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Подключение прибора к источнику питания, не оборудованному контактами защитного заземления, может привести к поражению оператора током и повреждению прибора.

Кроме того, к поражению током и повреждению прибора может привести нарушение защитного проводника внутри или снаружи прибора, или разъединение клеммы защитного заземления.

Перед каким-либо обслуживанием прибора, требующим его вскрытия, необходимо отсоединить прибор от источника питания!

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Все соединения прибора должны быть правильно созданы. Используйте только те провода и кабели, которые получили вместе с прибором, либо рекомендованные производителем.

Идентификация

Каждый прибор имеет свой серийный номер. Этот номер расположен в нижней части прибора. При обращении в Bruker Daltonik GmbH укажите полный серийный номер и номер модели Вашего прибора. Запишите здесь серийный номер Вашего прибора, чтобы впоследствии Вы могли быстро к нему обратиться:

Номера деталей

В данном руководстве номера деталей указаны в скобках после названия каждой детали. Некоторые детали и вспомогательные материалы не пронумерованы и не могут быть поставлены Bruker Daltonik GmbH. Большинство таких деталей можно получить в компаниях по материально-техническому обслуживанию лабораторий.

Серийный номер руководства: # **226920**

Техническая поддержка

В случае возникновения каких-либо проблем с Вашим прибором, пожалуйста, обращайтесь по следующим адресам:

Bruker Daltonik GmbH	Bruker Daltonics Inc.
Permoserstr. 15	40 Manning Road
04318 Leipzig	Billerica, MA 01821
Германия	США
Тел.: +49 (341) 2431 395	Тел.: 978 663 3660 Сервис-центр: 978 663 3660 x 1445
Факс: +49 (341) 2431 343	
E-mail: maldi.support@bdal.de E-mail (программная поддержка): maldi.sw.support@bdal.de	Service-Support@bdal.com
Sales: Phone: +1 (978) 663 3660 Fax: +1 (978) 667 5993 E-mail: ms-sales@bdal.com	
Internet: http://www.bdal.de/	Internet: http://www.bdal.com/

либо к Вашему местному представителю компании Bruker.

Оглавление

1 МАСС-СПЕКТРОМЕТР MICROFLEX.....	5
1.1 Вес и габариты системы microflex	6
1.2 Техника безопасности.....	6
1.2.1 Знаки безопасности.....	7
1.2.2 Текстовые обозначения и символы.....	8
1.2.3 Меры предосторожности при управлении прибором	8
1.2.4 Нормативы.....	9
1.2.5 Техника безопасности при использовании электрических систем	10
1.3 Требования по условиям окружающей среды	12
2 УСТАНОВКА И НАЛАДКА	12
2.1 Технические и электрические требования.....	12
2.2 Распаковка.....	13
2.3 Входы и выходы масс-спектрометра microflex	13
2.4 Наладка	13
3 ВЕРСИЯ ПРИБОРА	15
3.1 Схема масс-спектрометра	15
3.1.1 Блок управления	15
3.1.2 Задняя панель	16
3.1.3 Вакуумная система.....	19
3.1.3.1 Ионный источник microSCOUT.....	19
3.1.3.1.1 Импульсная экстракция ионов	21
3.1.3.1.2 Планшеты мишени.....	23
3.1.3.1.3 Селектор родительских ионов	24
3.1.4 Рефлектор	26
3.1.5 Детектор.....	27
3.1.6 Цифровой преобразователь	29
3.1.7 Лазерная система.....	29
3.1.8 Камера	29
3.2 Конфигурация ПК	29
3.3 Возможность удаленного сервисного обслуживания.....	30
4 ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	32
4.1 Включение/выключение прибора	32
4.2 Проверка готовности прибора к работе	32
4.3 Установка планшета мишени	32

4.4 Удаление планшета мишени	33
4.5 Управление при выполнении анализов	33
5 ТЕКУЩЕЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ ПРИБОРА	33
СОСТАВ ИЗДЕЛИЯ.....	34
АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	37

1 МАСС-СПЕКТРОМЕТР MICROFLEX

microflex – это настольный рефлекторный времяпролетный масс-спектрометр (см. Рис. 1-1) с ионизацией **MALDI**¹, с источником ионов microSCOUT компании Bruker, а также вертикальной трубой дрейфа ионов, рефлекторами (опционально) и детекторами на основе двойных пластин с микроканалами. Прибор предназначен для автоматизированной идентификации и характеристики белков, детектирования биомаркеров, контроля качества олигонуклеотидов, и SNP-генотипирования.

¹ **MALDI** (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) – Лазерная десорбция/ионизация при содействии матрицы

1.1 Вес и габариты системы microflex



Рисунок 1-1 Вес и габариты масс-спектрометра microflex

1.2 Техника безопасности

Указания по технике безопасности при использовании масс-спектрометра microflex включают:

- знаки безопасности;
- текстовые обозначения и символы (раздел 1.2.2);
- меры предосторожности (раздел 1.2.3);
- технику безопасности при использовании электрических систем (раздел 1.2.5).

1.2.1 Знаки безопасности

Вы можете обнаружить на компонентах масс-спектрометра или рядом с ними следующие знаки:

Таблица 1-1 Знаки безопасности

Знак	Описание
	Знак указывает, что управление или обслуживание прибора может привести к его повреждению, если не соблюдать необходимые меры. Может обозначать любой тип угрозы. Если Вы видите такой знак, следует обратиться к страницам по технике безопасности данной инструкции, чтобы получить необходимые указания.
	При несоблюдении техники безопасности существует опасность электрического шока в связи с высоким напряжением.
	Возможность наличия лазерного излучения. При закрытой защитной крышке microflex является прибором класса опасности Class I Laser . При открытой защитной крышке он становится прибором класса Class III B Laser .
	Обозначает, что данный контакт либо получает, либо поставляет переменный ток или напряжение.
	Указывает на необходимость подсоединения защитного конца заземления до создания каких-либо других электрических соединений
	Обозначает положение <u>OFF</u> главного выключателя питания прибора.
	Обозначает положение <u>ON</u> главного выключателя питания прибора.

1.2.2 Текстовые обозначения и символы

Следующие текстовые обозначения и символы используются для того, чтобы сообщить о необходимости соблюдения некоторых требований по безопасности:

Указывает на важность информации, содержащейся в методике или описании.

Указывает на операцию, которая может привести к повреждению прибора при несоблюдении мер безопасности.

Предупреждение:



**Высокое
напряжение:**



Указывает на операцию, выполнение которой может привести к телесным повреждениям при несоблюдении мер безопасности.

Указывает на операцию, выполнение которой может привести к телесным повреждениям при несоблюдении мер безопасности.

1.2.3 Меры предосторожности при управлении прибором

Для Вашей безопасности и предотвращения порчи оборудования, ознакомьтесь со следующими указаниями.

Перед использованием прибора прочитайте все обозначения по технике безопасности, изложенные в начале данного руководства.

Носите подходящую защитную одежду, включая защитные очки и перчатки, при приготовлении образцов и растворов, используемых при работе на данном приборе.

При работе с растворителями соблюдайте требования методики по безопасности и рекомендации производителя.

Очистите внешние поверхности прибора мягкой тканью, смоченной слабым детергентом и водным раствором. Не используйте абразивные материалы и растворители.

Будьте осторожны при поднятии прибора, поскольку масс-спектрометр microflex весит 125 кг, что может привести к повреждению спины. Носите подходящую одежду и используйте специальные приспособления при перенесении или передвижении прибора.

В масс-спектрометре microflex используется пульсирующий ультрафиолетовый лазер класса опасности Class III B (150 мкДж при 337 нм). Используйте подходящую защиту для зрения и

никогда не смотрите прямо на лазерный луч, если какие-либо защитные поверхности сняты. В рабочем режиме лазерный луч направлен на мишень с пробами в аналитической камере. Блокираторы, обеспечивающие целостность аналитической камеры и вакуум в ней, также обеспечивают, чтобы лазерный свет не выходил через загрузочный порт мишени. Если вакуум нарушается и система позволяет, чтобы загрузочный порт открылся, то лазер нельзя зажечь.

Осторожно: При поставке и транспортировке прибора важно, чтобы мишень находилась в позиции OUT. Несоблюдение этого требования может привести к повреждению прибора.

Осторожно: Не ограничивайте вентиляцию в задней части прибора, и выброс воздуха в верхней части масс-спектрометра.

Для обеспечения правильного функционирования проверяйте вентиляционный воздушный фильтр в задней части прибора каждые три месяца и заменяйте, при необходимости, в соответствии с инструкциями по обслуживанию прибора, изложенными в главе 5.

1.2.4 Нормативы

Прежде чем переходить к последующим главам, прочитайте данный раздел.

Классификация прибора

Соединенные Штаты:

Данный прибор классифицируется как цифровое устройство, используемое исключительно в качестве промышленной, коммерческой, или медицинской контрольно-испытательной аппаратуры. Оно не подлежит обязательному соблюдению технических стандартов, специфицируемых в Части 15 Правил и Норм FCC, на основании Раздела 15.103 (с).

Европа:

Вся информация, касающаяся стандартов EMC, содержится в Декларации о Соответствии, и эти стандарты будут изменяться по мере внесения новых требований Европейским Союзом.

Масс-спектрометр microflex предназначен для использования в промышленном и местном масштабе. В некоторых ситуациях радиочастотные ограничения EN 55011, группа 11, класс A, ISM, могут не соблюдаться, если оборудование используется во внутренней низковольтной распределительной электросети, типичной для обычных зданий.

Соблюдение законодательных требований

Данный прибор удовлетворяет следующим требованиям:

EN55011, 1991, группа 1, класс A

EN61000-3-2, 2001, раздел 2, класс A

EN61000-3-3, 1995, раздел 3, с A1(2001)

EN61326(2002)

- EN61000-4-2, ESD
- EN61000-4-3, Radiated
- EN61000-4-4, EFT
- EN61000-4-5, Surge
- EN61000-4-6, Conducted
- EN61000-4-11, Dips and Dropouts

EN61010-1:03.94 и поправка 1:07.95

EN 60825- 1:1994, радиационная безопасность лазерной продукции

Зарегистрировано как:

21 CFR 1040.10 и 1040.11 – лазерная продукция CDRH.

1.2.5 Техника безопасности при использовании электрических систем

Соображения по технике безопасности при использовании электрических систем состоят из следующих разделов:

Общая безопасность: Перед установкой или работой на масс-спектрометре microflex, ознакомьтесь с последующей информацией, касающейся различных факторов риска. Убедитесь, что весь персонал, имеющий отношение к установке и работе на приборе, ознакомлен с общими правилами по технике безопасности в лаборатории, а также с правилами по технике безопасности при работе с масс-спектрометром microflex. Перед установкой и использованием прибора проконсультируйтесь у Вашего инженера по технике безопасности, специалиста по гигиене, специалиста по охране окружающей среды, или руководителя службы по технике безопасности.

Масс-спектрометр microflex должен быть расположен устойчиво, далеко от нагревательных либо охлаждающих устройств, воздухопроводов, и на него не должен попадать прямой солнечный свет. Его место должно быть чистым, свободным от пыли, дыма, и едких веществ.

Убедитесь, что для всех компонентов системы есть адекватный и стабильный источник электропитания.

Убедитесь, что шнур электропитания подходит для использования в Вашей лаборатории, и что он соответствует требованиям агентства по технике безопасности Вашей страны.

Предупреждение:



Некоторые элементы масс-спектрометра microflex находятся под высоким напряжением (до 20 кВ).

Предупреждение:



НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ прибор, если с него сняты какие-либо его части или покрытия.

Предупреждение:



НЕ ПЫТАЙТЕСЬ наладивать, заменять части, или чинить данный прибор. Доверяйте обслуживание прибора только представителю сервисной службы Bruker Daltonics или другому авторизованному и должным образом обученному специалисту.

Предупреждение:



Если существует вероятность того, что электрическая защита масс-спектрометра повредилась:

1. Выключите масс-спектрометр microflex.
2. Выньте двухжильный провод из электрической розетки.
3. Защитите прибор от включения неавторизованным персоналом.

Предупреждение:



Масс-спектрометр microflex и анализы методом MALDI-TOF требуют очень высоких напряжений. В нормальных условиях работы доступ пользователя к внутренним компонентам прибора НЕ требуется. НИКОГДА не работайте с масс-спектрометром microflex при снятых защитных панелях, так как это подвергает пользователя риску сильного электрического шока и вредному невидимому излучению ультрафиолетового лазера.

Осторожно: Используйте только те предохранители, которые предназначены для эксплуатации при требуемом уровне тока и напряжения, и обозначены в соответствующем руководстве.

Осторожно: Используйте прибор в соответствии с инструкциями, изложенными в данном руководстве. Иначе возможно нарушение защитных функций прибора.

Предупреждение:

Осторожно:



Подключайте прибор к выходу электропитания переменного тока, имеющему защитное заземление. Чтобы убедиться в удовлетворительном и безопасном функционировании прибора, Важно, чтобы защитный заземляющий провод (зеленый / желтый) был присоединен действительно к «земле». Любое нарушение заземления может привести к нарушению защитных функций прибора.

1.3 Требования по условиям окружающей среды

Масс-спектрометр microflex предназначен для использования внутри помещений и корректно функционирует при соблюдении следующих условий:

Таблица 1-2 Условия окружающей среды

	Условия работы прибора	Условия хранения прибора
Температура	10 - 30°C	-20 - 60°C
Относительная влажность воздуха	15-85% в отсутствие конденсации	15-85% в отсутствие конденсации

2 УСТАНОВКА И НАЛАДКА

Глава по установке и наладке прибора содержит следующие разделы:

Технические и электрические требования (раздел 2.1).

Распаковка (раздел 2.2).

Наладка (раздел 2.4).

2.1 Технические и электрические требования

Необходимо обеспечить выполнение следующих требований:

Переменный ток от 100 до 230 В/ 3-1.5 А / 50–60 Гц. Задняя панель прибора оснащена входом IEC320–C14 (см. Рис. 3-3). В комплект поставки прибора входит трехметровый сетевой шнур IEC320 и штепсель, подходящий для использования в Вашей стране.

Масс-спектрометр microflex занимает площадь на столе, приблизительно равную 51 см x 68 см (20" x 27"). Поверхность должна надежно выдерживать 125 кг (или 275 фунтов) веса прибора.

Для обеспечения надлежащей вентиляции и доступа к выключателю, необходимо оставить позади инструмента свободный зазор не менее 20 см.

Несмотря на то, что газовая загрузка системы довольно низка, и вентиляция выхода насоса не требуется, система оборудована выходом для сброса газов и обеспечения вентиляции. Этот выход расположен сзади прибора. Отдельные устройства для их безопасного использования могут требовать вентиляции. В обязанности пользователя входит соблюдать соответствующие требования.

2.2 Распаковка

Упаковочная ведомость к каждому заказу помещается в транспортировочный контейнер с прибором.

Примечание: Гарантия НЕ подразумевает покрытие расходов, связанных с повреждением в связи с неправильным обращением с прибором. Не открывайте транспортировочный контейнер до прибытия представителя компании BRUKER. Открытие контейнера в отсутствие авторизованных лиц аннулирует гарантию прибора. Наши сервисные инженеры произведут наладку прибора в лаборатории заказчика.

Поверхность, на которой будет размещен прибор, должна надежно выдерживать вес прибора 125 кг (или 275 фунтов), а также вес компьютера, монитора и принтера. Поставьте контейнер с прибором и ожидайте представителя компании Bruker, который установит прибор на предназначенную для него поверхность! Чтобы поднять прибор, необходимо усилии по меньшей мере четверых человек.

2.3 Входы и выходы масс-спектрометра microflex

Пожалуйста, обратитесь к разделу 3.1.2.

2.4 Наладка

Для того чтобы произвести наладку прибора:

1. В задней части прибора подсоедините следующие шнуры и кабели в соответствующие гнезда (Рис. 3-3):
 - а. Шнур электропитания.

Предупреждение: Главная розетка должна быть заземлена.

в. 9-штыревой кабель.

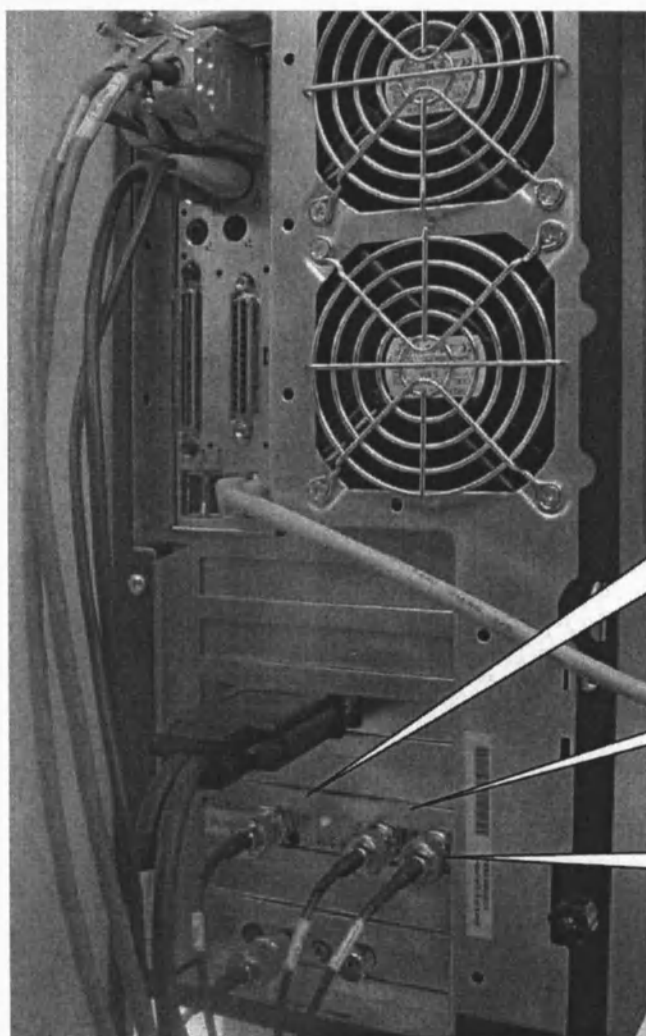
с. Кабель передачи сигналов.

2. Подсоедините другой конец шнура электропитания в подходящую розетку переменного тока.



Осторожно: Прочитайте раздел 1.2 и следуйте всем требованиям по технике безопасности, описанным в нем.

3. Подсоедините соответствующий конец кабеля передачи сигналов к системе сбора данных (Рис. 2-1).



цифровой преобразователь
сигналов запуска

ВХОД СИГНАЛОВ
с линейного детектора

ВХОД СИГНАЛОВ
с рефлекторного детектора

Рисунок 2-1 Соединения в задней части компьютера

4. Подсоедините соответствующий конец 9-штыревого кабеля к порту COM-1 компьютера.
5. Переведите главный переменного-токовый переключатель в положение ON.
6. Убедитесь, что загорелась лампочка индикатора POWER (Рис. 3-2).

После первого запуска может пройти около 12 часов перед тем, как прибор будет готов к работе, при этом загорится лампочка индикатора Ready (Рис. 3-2) .

Внимание: При возникновении каких-либо неполадок с системой загорается лампочка индикатора Error (Рис. 3-2) и система переходит в режим ожидания. Обратитесь за помощью к авторизованному сервисному персоналу.

3 ВЕРСИЯ ПРИБОРА

Масс-спектрометр MALDI-TOF microflex компании Bruker состоит только из двух главных компонентов:

1. Масс-спектрометр и
2. Система сбора и обработки данных (раздел 3.2).

3.1 Схема масс-спектрометра

На Рис. 3-1 представлена общая схема принципа действия масс-спектрометра **microflex**.

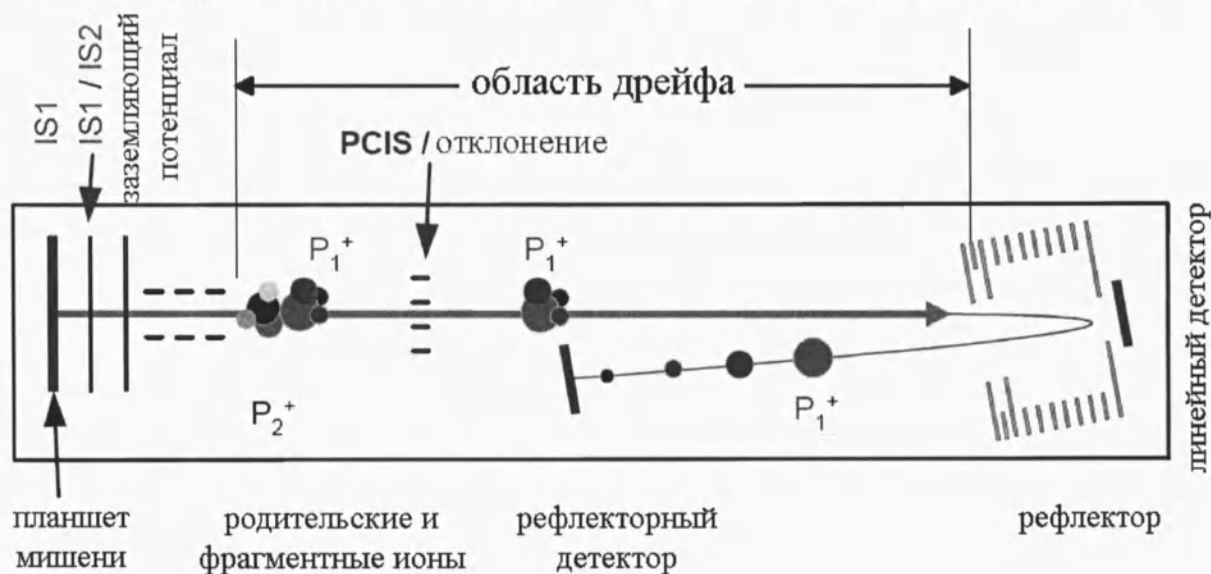
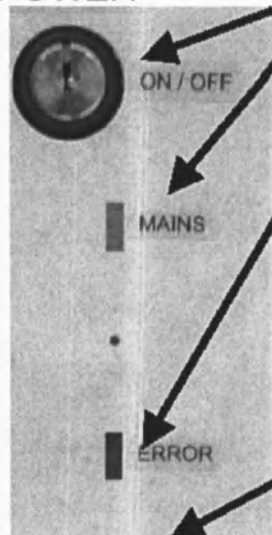


Рисунок 3-1 Схема прибора

3.1.1 Блок управления

Когда прибор готов к работе, горят три зеленые лампочки светодиодных индикаторов **Mains**, **Ready** и **Access** (см. Рис. 3-2).

POWER



WARM-UP

IlepeKJDO'faTem. ON/OFF: IliDI BKJIO'leHHWBbiKJIO'leHH.II npH6op.

IlocTOHHHO ropaT: npH6op BKJIO'leH.

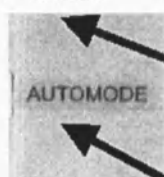
IlocTOHHHO ropaT: HeHenpasHoeTb, Heo6xo, : HMO BMewaTeJibeTBO nOJb30BaTe.IDI HJIH eneUHa.JIHeTano peMOHTy; 6oJiee, I: leTaJibHbie HHeTpyKUHH eM. BO BenJibffiaiOII{HX no, I: leKa3Kax **me** (flexeontroJ™).

MaraeT (a BbllaeTch coo6meaae o6 owa6Ke Target Error): eepBHeHbIH pe:>KHM JIH60 o6HOBJieHHe nopaMMHO-annapaTHOfO o6eene'leHH.II.

IIOCTOJIHHO ropHT: CheTeMa eme He FOTOBa K H3MepeHH.IIM, HanpHMep, He 3aBepweHa npoue.zzypa 3apb3KH, OTKJIO'leHO BbieOKOe Hanp.II: IKeHHe, H T.n., I: IDKe eeJIH Bee napaMeTpbieOOTBeTeTBYIOT TpebyeMbIM, Heo6xo-, I: IHMO nO, I: IOKJ: IaTb HeKOTOpoe BpeM.II. 3TO eoeTO. I: IHe OT06piDKaeTe.II Ha 3Kpaae **me** nopaMMOH flexeontroJIM

MaraeT: npOH30WeJI e6oif, KOTOpbIH MO:>KeT H, I: IOJ: IKeH 6biTb JIHKBH, I: IH-pOBaH Henoepe, : eTBeHHO noJb30BaTeJieM. HanpHMep, 3aKpbITb KpbnnKy 3apb30'IHOfo OTeeKa

READY



IIOCTOJIHHO ropHT: IlpH6op FOTOB K e6opy eneKTpOB, T.e. Bee

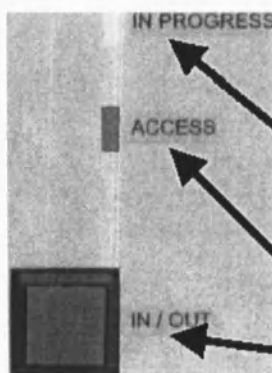
coe, I: IHeHH.II e03, I: IaHbi, BaKYYM, I: IOeTaTO'leH, BbieOKOe Hanp.II: IKeHHe eeTb, HT., I: I.

BbiKJDO'feH: BO BpeM.II npoue.zzypbi3apb3KH.

IIOCTOJIHHO ropHT: , I: aHHbIH eBeTO, I: IHO, I: I ropHT Ha npOT.II: IKeHHH Beepo npoueeeaAutoXeeute™. IlpH 3TOM nnaaweT MHWeHH HeJb3.II H3BJie'lb o6paTHO H3 npH6opaHIDKaTheM eOOTBeTeTBYIOII{eH KHOnKH.

TARGET

ERR -- 1



IlocTOHHHO ropaT: HeHenpasHoeTb, Heo6xo, : HMO BMewaTeJibeTBO nOJb30BaTe.IDI HJIH eneUHa.JIHeTano peMOHTy; 6oJiee, I: leTaJibHbie HHeTpyKUHH eM. BO BenJibffiaiOII{HX no, I: leKa3Kax **me** (flexeontroJ™).

MaraeT (a Bbi)laeTch coo6meaae o6 owa6Ke Target Error): eepBHeHbIH pe:>KHM JIH60 o6HOBJieHHe nopaMMHO-annapaTHOfO o6eene'leHmi.

IIOCTOJIHHO ropHT: Ha npOT.II: IKeHHH Beepo npoueeea 3apb3KH/y, : a.JieHH.II MHWeHH.

IlocTOHHHO ropaT: EeJIH WTaTHB B KOHe'IOH no3HYHH BHTPH HJIH BHe npa6opa

BbiKJDO'feH: BO BpeM.II npoueeea3apb3KHfy, : a.JieHH.II MHWeHH.

In/Out: HHHUHHpyeT Ha'la.JIO 3apb3KHfy, : a.JieHH.II MHWeHH.

PHCyyTOK 3-2 naHeHb nnaeneHII" e nepex, He&"; 'laCTIII np1116opa

3.1.2 3aAH.fl.fl naHelb

B 3aHe&"; '1 'laCTIII np1116opa (Pille. 3-3) HaXOA"TC" cneAYIOI.I. IIIIe coeAI!!HeHIII":

 **Warning**
To reduce the chance of electric shock, do not touch internal parts. Always use proper safety procedures.

J 1501
SIGNAL

J 1502
COM

POWER
10A

J1503
100-230 VAC
3-1.5A

EXHAUST

VENT INLET



Рисунок 3-3 Соединения в задней части прибора

- Exhaust:** Для быстрого подключения пластиковой трубки внешним диаметром 6 мм. Выходное отверстие для сброса газов из внутренней вакуумной системы. На заводе оснащается звукоглушителем. Загрузка системы газами достаточно невелика, поэтому вентиляция этого выхода не требуется. Однако отдельные приспособления для их безопасного использования могут требовать вентиляции. Обязанностью пользователя является обеспечение надлежащей вентиляции соответствующих устройств.
- Vent inlet:** Для быстрого подключения пластиковой трубки внешним диаметром 6 мм. Входное отверстие внутренней вакуумной системы. Используется только во время сервисных операций!
- Mains inlet:** Прибор оборудован сетевым входом IEC320-C14. Под панелью расположен воздушный фильтр, который необходимо заменять каждые 3 месяца (Рис. 3-4).

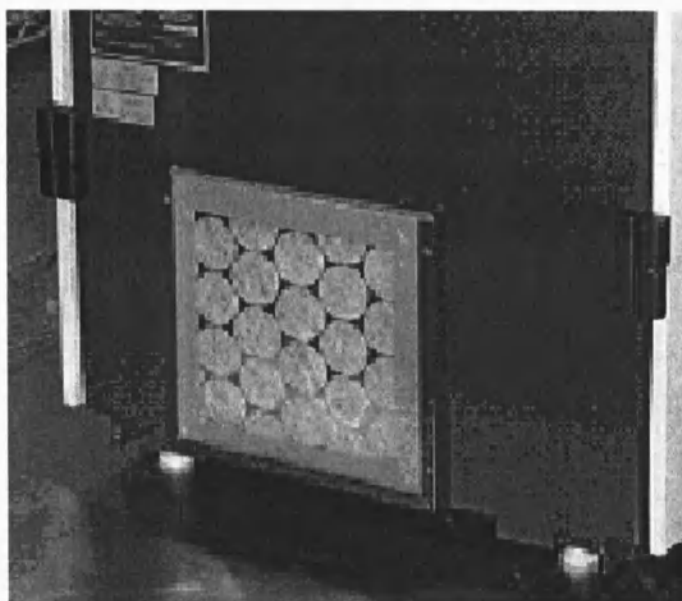


Рисунок 3-4 Положение воздушного фильтра сзади прибора



Некоторые составляющие части данного прибора являются лазерной продукцией класса опасности **class III B**, с лазерным ультрафиолетовым излучением при длине волны **337 нм**. Кожух прибора защищает пользователя от непрямого излучения невидимого света. Работа с прибором при открытом кожухе может привести к поражению пользователя вредоносным лазерным излучением и последующей

слепоте.

Никогда не смотрите на лазерный луч. Всегда перед открытием боковых панелей одевайте защитные очки. Убедитесь, что окружающие Вас люди не могут подвергнуться воздействию лазерного излучения. Избегайте внесения в лазерный луч отражающих свет предметов (отвертки, часы, кольца), поскольку как отраженный видимый, так и невидимый свет может попасть Вам в глаза и нанести непоправимый ущерб здоровью!

3.1.3 Вакуумная система

Вакуумная система прибора состоит из двух отсеков низкого вакуума и одной области высокого вакуума. Вакуумная камера и выход турбомолекулярного насоса соединены между собой и с вакуумной частью форвакуумного насоса (диафрагмовый насос) Т-образным разделителем. В зависимости от текущего состояния системы, например, при загрузке мишени внутрь прибора (Рис. 3-6), каждая из двух линий низкого вакуума может быть отдельно перекрыта клапанами, контролируемые с компьютера. Вход турбомолекулярного насоса напрямую соединен с областью высокого вакуума, поддерживаемого в ионном источнике и трубе дрейфа. Прибор работает при давлении, обеспечивающем высокий вакуум, т.е. около $2 \cdot 10^{-6}$ мбар. Давление низкого вакуума составляет от 1 атмосферы приблизительно до 2 мбар.

3.1.3.1 Ионный источник microSCOUT

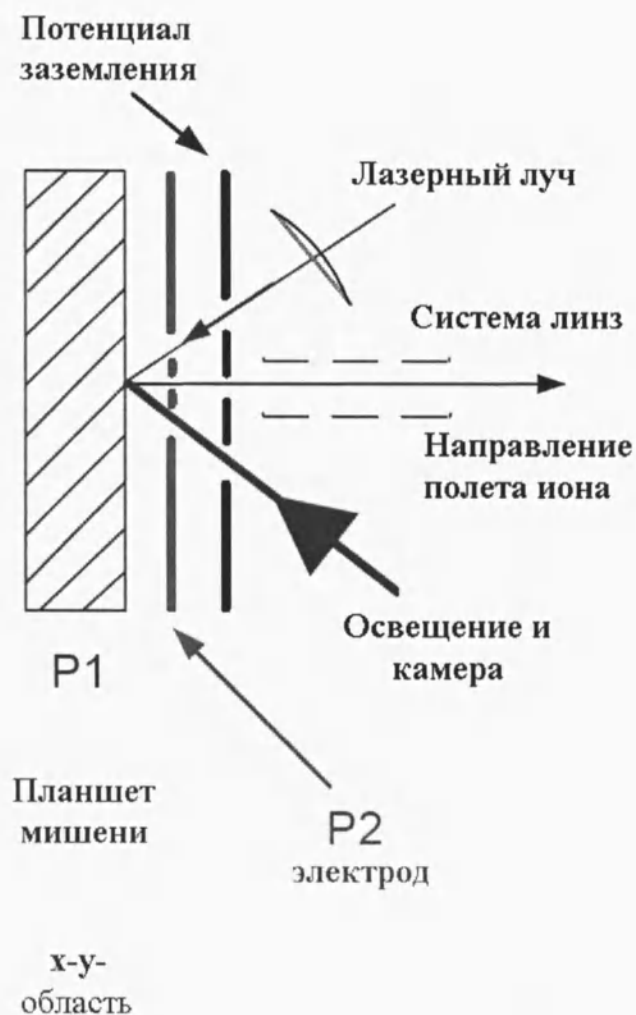


Рисунок 3-5 Схема ионного источника microSCOUT

Ионный источник (Рис. 3-5) – это та часть масс-спектрометра, в которой при использовании MALDI формируются ионы. Он состоит из трех главных компонентов.

1. В x-y-области размещается планшет мишени, транспортируется в ионный источник, и передвигается по x-y-координатам, в соответствии с выбранной позицией для лазерного удара.
2. Вакуумный шлюз доставляет мишень с атмосферного давления в область высокого вакуума.
3. Ионная оптика состоит из положительно или отрицательно заряженной мишени microflex (P1), второй пластины под напряжением (P2) для временной фокусировки, и заземленного ускоряющего электрода. Когда лазер ударяет смесь анализируемого вещества и матрицы, образующиеся ионы спустя некоторое

время ускоряются электрическим полем и фокусируются системой линз до того, как они покинут ионный источник.



Рисунок 3-6 Загрузочный порт, в который помещен планшет Micro SCOUT

3.1.3.1.1 Импульсная экстракция ионов

Возможности масс-спектрометрии MALDI ограничиваются распределением сформировавшихся ионов по энергии, обусловленным процессом ионизации. Поскольку не все ионы десорбируются и ионизируются одновременно и в одном и том же месте, возникают неточности, связанные с их энергией, расположением и временем формирования. Кроме того, электрические силы отталкивания обуславливают изначальное распределение ионов по энергии. Сложение всех этих неточностей, сопровождающих процесс формирования ионов, приводит к тому, что **ионы с одинаковой массой** не обладают одинаковой кинетической энергией после прохождения ускоряющего поля, но покидают ионный источник с определенным разбросом по энергиям, что приводит к тому, что они достигают детектора в немного разное время. Этот эффект приводит к уширению пиков и, следовательно, снижению разрешения.

Импульсная экстракция ионов (**Pulsed Ion Extraction, PIE**) – это способ улучшения разрешения и чувствительности во времяпролетных масс-спектрометрах.

Спустя некоторое время после десорбции ионы экстрагируются (фазы 2 и 3, см. обсуждение ниже). Преимущества данного способа состоят в следующем:

1. Более мягкий процесс ускорения благодаря тому, что ионы не проходят через плотный слой молекул матрицы, и
2. достижение эффекта временной фокусировки при условии приложения корректных параметров.

Три компонента ионного источника участвуют в процессе PIE, а именно:

1. планшет мишени (P1) куда нанесены капли анализируемого вещества,
 2. второй планшет под напряжением (P2), представляющий собой электрод, закрепленный в нескольких миллиметрах напротив позиции образца, и
 3. последующий заземленный ускоряющий электрод (Рис. 3-1, Рис. 3-5).
4. Во время PIE происходит следующий процесс:

Фаза 1:

Планшет мишени P1 с анализируемым веществом всегда соединен с потенциалом IS/1. Вначале такой же потенциал приложен к планшету P2. Таким образом, анализируемое вещества еще не подвергается каким-либо внешним воздействиям до лазерного удара. После лазерного удара наступает

Фаза 2:

когда молекулы и ионы приходят в движение за счет лазерной ионизации/десорбции с типичной скоростью 700 м/с от P1 по направлению к P2. За это время анализируемое вещество ионизируется. Однако ионы по-прежнему не подвергаются воздействию какого-либо электрического потенциала. В этот момент только процесс MALDI определяет их кинетическую энергию, тогда как во время испарения образца у поверхности его частицы взрывообразно разгоняются до этой скорости. На протяжении последующих нескольких сотен наносекунд образец движется по направлению к планшету P2.

Однако не все ионы с самого начала приобретают скорость 700 м/с. Некоторые (самые быстрые) пролетают дальше, чем другие, пролетающие более короткий отрезок пути (наиболее медленные). Без использования PIE это распределение по скоростям приводит к снижению разрешения времяпролетного масс-спектрометра в линейном режиме.

Затем по истечении времени задержки начинается

Фаза 3:

когда значение потенциала планшета P2 пульсирует от IS/1 до IS/2, генерируя электрическое поле, сила которого заставляет все заряженные частицы двигаться по направлению к планшету P2.

Это означает, что быстрые ионы с наиболее высокой энергией, которые смогли подлететь к планшету P2 до переключения напряжения, подвергаются меньшему электрическому потенциалу, чем более медленные ионы, которые находятся ближе к планшету P1. По этой причине более медленные ионы стартуют при более высоком значении потенциала, чем более быстрые. Поэтому более медленные ионы будут быстрее передвигаться в бесполовой области, тогда как более быстрые – будут передвигаться медленнее.

Правильно подобрав потенциал между планшетами P1 и P2, можно добиться того, чтобы ионы с одной и той же массой, но разными исходными скоростями, достигли детектора в один и тот же момент времени!

3.1.3.1.2 Планшеты мишени

Планшеты мишени, используемые в масс-спектрометре microflex, называются **MSP (Micro SCOUT Plates)**. На них 96 лунок (Рис. 3-7) для нанесения пятен пробы. Размер мишени и коэффициент пропорциональности точно соответствуют $\frac{1}{4}$ части титрационного микропланшета. В то же время уменьшенные в размере планшеты Micro SCOUT Plates могут использоваться роботами компании Bruker для автоматизированной пробоподготовки, такими, как MAPII.

В этом случае каждый планшет Micro SCOUT Plate помещается на адаптер мишени, который может вместить только один планшет Micro SCOUT Plate. Эти адаптеры оборудованы программируемым полупроводниковым чипом, называемым транспондером. Робот считывает информацию с транспондера и идентифицирует планшет Micro SCOUT Plate внутри адаптера как мишень.

После пробоподготовки адаптер и планшет мишени помещаются в отдельный блок для считывания/записи информации с транспондера **Read/Write Transponder Station** (серийный номер руководства - PN 212 308), следующее за спектрометром, чтобы считать информацию с транспондера. Затем планшет мишени удаляется из адаптера и вводится вручную в спектрометр. Блок транспондера соединен с ПК кабелем RS 232/485.

Использование адаптеров в сочетании с транспондерами также позволяет применять анкерную технологию AnchorChip. Мишени AnchorChip покрыты специальным слоем, улучшающим процесс кристаллизации образцов MALDI. Преимущества данной технологии состоят в следующем:

10 – 100-кратный выигрыш в чувствительности благодаря повышению концентрации анализируемого вещества в пятне.

Улучшение с точки зрения автоматизации благодаря сокращению поиска “сладких пятен”.

Дополнительную информацию можно получить в руководстве по анкерной технологии AnchorChip™ Technology, (серийный номер руководства - PN 215 344).

Встроенные в компьютер ПЗС-видеокамера и карта оцифровки видеоизображений позволяют получить изображение образца с высоким разрешением.

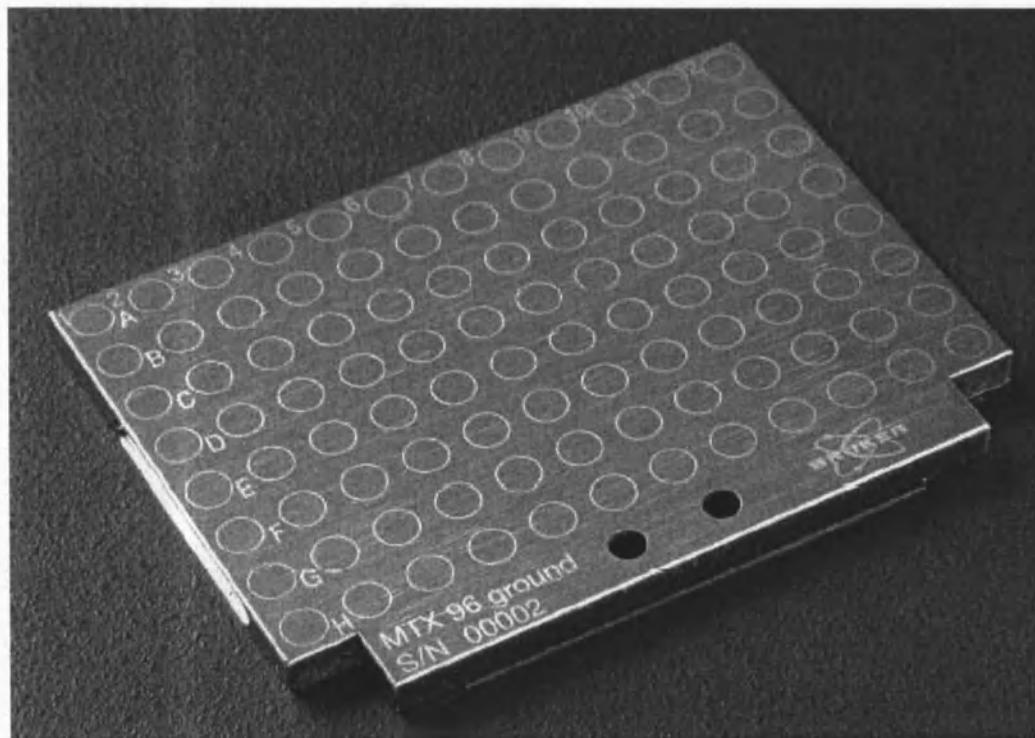


Рисунок 3-7 Изображение 96-луночного планшета Micro SCOUT

3.1.3.1.3 Селектор родительских ионов

Селектор родительских ионов (precursor ion selector, **PCIS**), как показано на Рис. 3-8, работает в качестве фильтра по массам, чтобы отделить данный родительский ион и относящиеся к нему фрагментные ионы от всех остальных ионов, для проведения MS/MS анализа.

Он состоит из дефлекторных (т.е. отклоняющих) пластин, расположенных вертикальным слоем одна под другой. Параллельные электроды подключены к источнику высокого напряжения с противоположной полярностью, в соответствии с принципом Брэдли-Ньюеллсена. Разность потенциалов между пластинами создает электростатическое поле, перпендикулярное направлению полета ионов. Это поле изменяет траекторию всех ионов, попадающих между электродами.

Несмотря на то, что пластины подключены к источнику питания по принципу Брэдли-Ньюеллсена, селектор ионов функционирует как улучшенный селектор родительских ионов Баровского, со всеми его преимуществами этого режима селекции ионов. В тот момент, когда выбранные ионы попадают в отклоняющее поле, оно отключается. Потенциал между пластинами остается равным нулю до того момента, пока все ионы не покинут дефлектор. В

3TOT MOMeHT CHOBA BKI1104aeTCfl OTKIIOHfiiOii.lee nolIe, TOilbKO Y>f{e C npOTIIIBOnOiiO}i{HO
 nOiflpHOCTbiO.TaKOpe}i{l/IM npiiiBOAIIT K KOMneHCa4111111 4aCTIII4HOPO OTKIIOHeHI/ifi, 1/1Me10111ero MeCTO
 npIII nonaAaHI/IIII IIIOHOB B O6IIaCTIII Ha o6ei/IX nepaHIIIX ppaHfiX 3IIeKTPOAOB.Cnoco6 nO3BOIfIeT
 npiII MeHfiTb IIICKI11041/1TelIbHO KOOTKI/le BpeMeHa CelleK4111111 IIIOHOB, 4TO OnfiTb }{e npiiiBOAIIT K
 yny4weHIIIO pa3pewa10111eenoco6Hocr111.

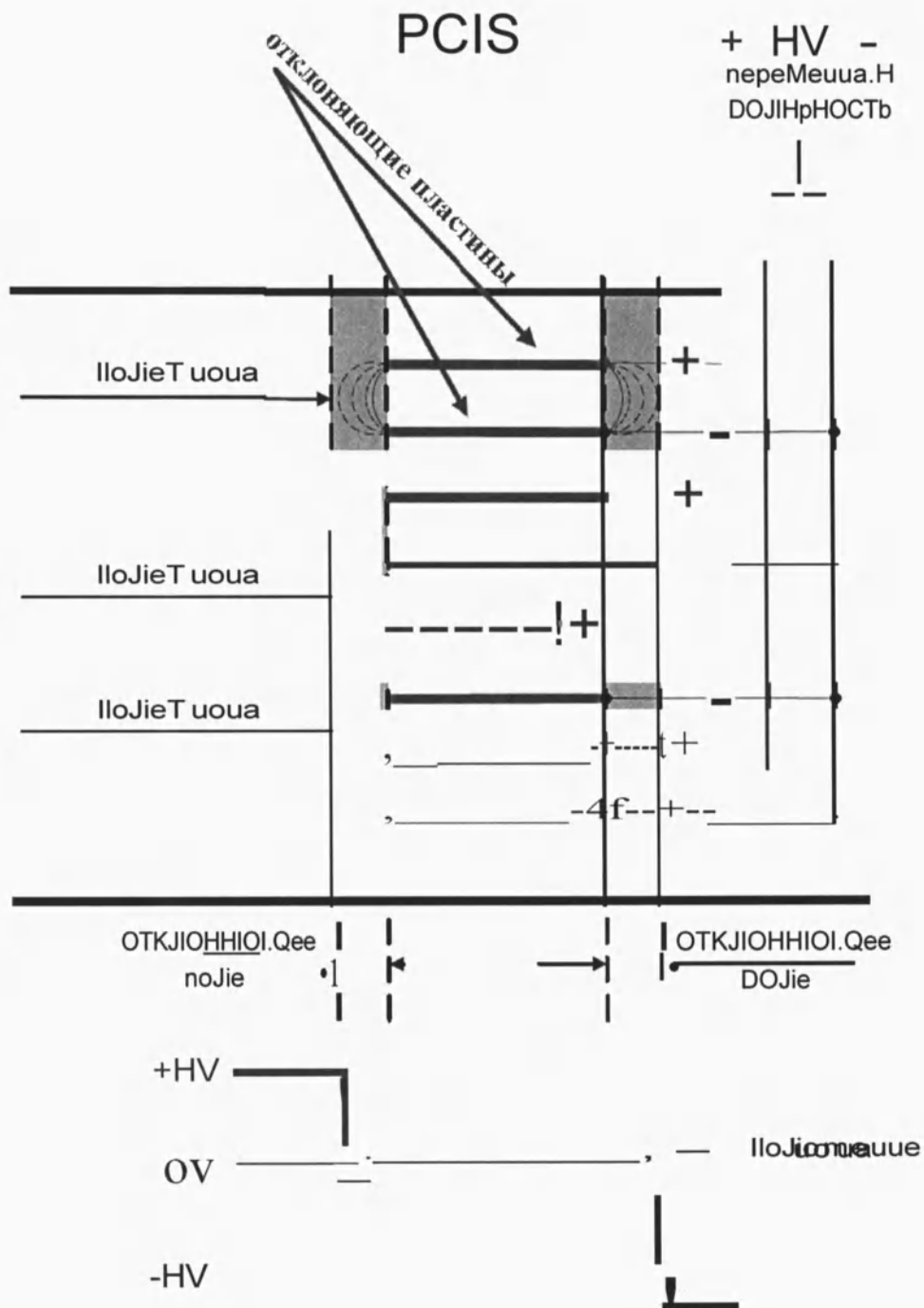


Рисунок 3-8 Принцип действия селектора родительских ионов

3.1.4 Рефлектор

Главной задачей рефлектора является нормализация времен полета ионов с разными энергиями.

Метастабильный распад ионов обуславливается избыточной энергией, получаемой во время сложного процесса MALDI. Поскольку родительские и фрагментные ионы продолжают двигаться с той же скоростью, они одновременно ударяют линейный детектор, таким образом, сливаясь в единый пик и не давая спектра фрагментных ионов. Для разделения фрагментных ионов в масс-спектрометр встраивается рефлектор. Ионы, обладающие различными массами, имеют разную кинетическую энергию, и проникают в разные места электрического поля; затем они отражаются и ударяют в рефлекторный детектор в разное время.

Для получения хороших масс-спектров с разумным соотношением сигнал-шум, геометрия рефлектора должна отвечать особым требованиям по электричеству и размерам, главным образом относительно размеров трубы дрейфа, а также типа и размера используемого рефлекторного детектора.

Прибор **microflex** и другие времяпролетные масс-спектрометры серии "flex" используют безрешеточный рефлектор с ионными линзами (Рис. 3-9). Фрагментные ионы, которые могут появиться внутри рефлектора, а не во время полета в области дрейфа, будут формировать нежелательный высокий химический фон.

Для минимизации времени пребывания ионов внутри рефлектора, рефлектор имеет два отделения, в первом из которых сила поля гораздо выше. В результате рефлектор становится короче, и длина бесполевого области дрейфа становится длиннее, по сравнению с времяпролетными рефлекторами с одним отделением. Благодаря этой конструкции все маленькие фрагментные ионы отклоняются, что позволяет снизить уровень шума. Кроме того, безрешеточная входная линза рефлектора создает эффект **пространственной фокусировки**, что позволяет повысить чувствительность.

Рефлектор работает при потенциале, превосходящем ускоряющее напряжение источника ионов приблизительно на два кВ.

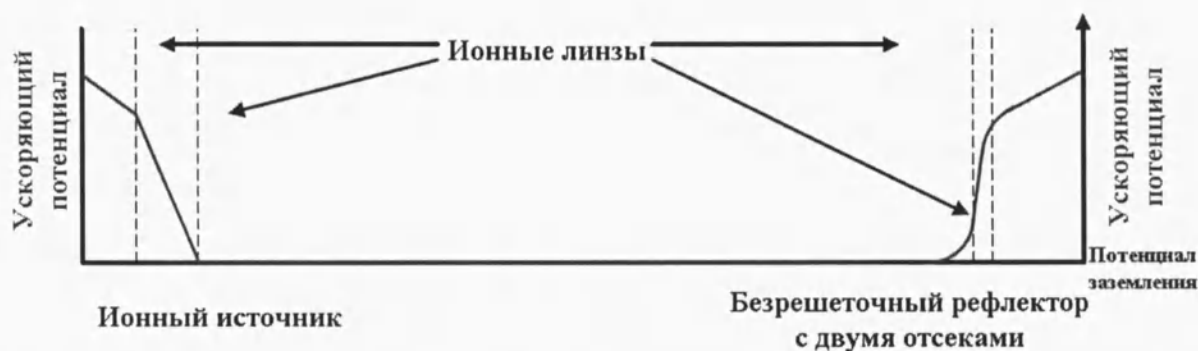


Рисунок 3-9 Распределение потенциальной энергии внутри безрешеточного рефлектора с двумя отделениями

3.1.5 Детектор

Детектор преобразует ионный ток в электрический, который затем оцифровывается и обрабатывается персональным компьютером.

Современные детекторы, используемые во времяпролетных масс-спектрометрах, созданы на основе пластин с микроканалами (см. Рис. 3-10), т.е. твердых пористых пластин с миллионами маленьких каналов ($d = 5-10$ мкм, длина = 0.5-0.8 мм), покрытых изнутри полупроводниковым слоем. Каждый из каналов работает как электронный умножитель, независимый от соседних микроканалов. Для достижения максимального выхода электронов все эти каналы электрически соединены параллельно.

Процесс умножения, происходящий в канале, изображен ниже.

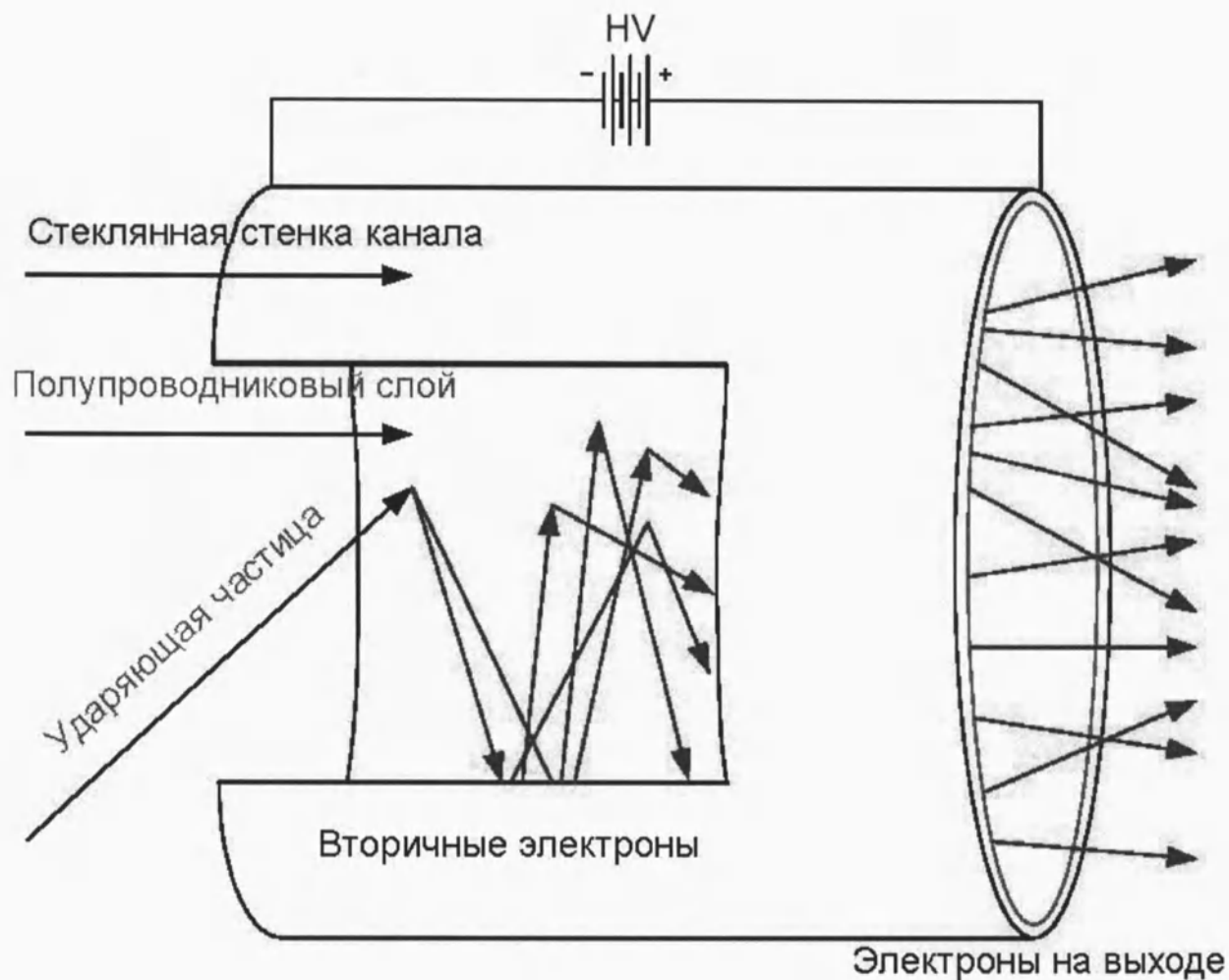


Рисунок 3-10 Принцип действия микроканала

Для нормального функционирования на микроканалы накладывается разность потенциалов до 1000 Вольт. Это приводит к протеканию тока через полупроводниковый слой, поставляющего электроны, необходимые для процесса умножения электронов.

Другим параметром, влияющим на производительность, является время отклика детектора. Оно важно для предотвращения ухудшения разрешения пиков. Детекторы на основе пластин с микроканалами производят выходное напряжение с десятикратно меньшим временем нарастания сигнала (< 1 нс) по сравнению с другими конфигурациями детекторов, такими, как каналные электронные или дискретные диодные умножители.

Каждый детектор **microflex** содержит две соединенные между собой пластины с микроканалами. Линейный детектор оборудован опцией селекции пропускания "gating"², позволяющей избежать возникновения эффектов насыщения, которые могут возникать в связи с попаданием в детектор матричного вещества.

3.1.6 Цифровой преобразователь

После лазерного удара цифровой преобразователь начинает записывать входящие аналоговые сигналы с детекторов и преобразовывать их в цифровую информацию. Цифровая карта может работать со скоростью до 2 GS/sec. Это устройство вмонтировано в ПК. Установки прибора соответствуют параметрам, заданным на странице **Detector** программы **flexControl**.

3.1.7 Лазерная система

Лазерная система работает с максимальной частотой следования импульсов 20 Гц. Она поставляет пульсирующее лазерное излучение к маленькому пятну на мишени. Лазерная система состоит из импульсного УФ-лазера³, регулятора усиления, позволяющего точно настроить лазерный поток, системы линз для фокусировки лазерного луча, и системы зеркал для направления лазерного луча в ионный источник на планшет мишени. Настройки прибора задаются в программе **flexControl**.

3.1.8 Камера

Камера передает изображение пятна образца в сегмент по управлению мишенью **Target Manipulation Segment** графического пользовательского интерфейса программы **flexControl**.

3.2 Конфигурация ПК

ПК управляет масс-спектрометром, а также собирает и хранит данные. Конфигурация компьютера должна отвечать конфигурации при поставке, т.е., например, следующим требованиям:

- 18-дюймовый жидкокристаллический дисплей, разрешение 1280 x 1024, True Color;
- лазерный принтер;
- операционная система Windows 2000;

² Пожалуйста, обратитесь к Руководству Пользователя **flexControl**. "Gating" – это дополнительная возможность системы, позволяющая детектировать только те ионы, которые представляют интерес. Все остальные ионы во избежание насыщения линейного детектора подавляются, включая нейтральные осколки.

³ Обычно используют азотный лазер с длиной волны 337 нм (и энергией импульса 150 мкДж) и шириной импульса 3 нс для компонентов матрицы, поглощающих свет на этой длине волны (класс опасности III B).

программные наборы **flexControl** / **flexAnalysis**.

3.3 Возможность удаленного сервисного обслуживания



Рисунок 3-11 Принцип удаленного сервисного обслуживания

Для наиболее оперативного функционирования прибора **microflex** он имеет возможность удаленного сервисного обслуживания (Рис. 3-11). Это позволяет выявлять неисправности через Интернет. Таким образом, часто можно эффективно решить проблемы с помощью персонального компьютера клиента, полностью управляемого службой сервиса Bruker Daltonics. Например, с помощью этой возможности можно обновлять программное и аппаратное обеспечение.

Кроме того, за счет такой возможности значительно ускоряется процесс сервиса, поскольку сервисный инженер после удаленной диагностики придет к Вам уже с подходящей запасной деталью.

Необходимое условие: Клиент должен иметь доступ в Интернет с управляющего компьютера **microflex**.

Пример проведения удаленного сервисного обслуживания в Европе:

1. Зайдите на сайт <http://bdal.webex.com>. Появится окно, изображенное на Рис. 3-12.
2. На данной веб-странице выберите **Join**. Появится окно, изображенное на Рис. 3-13.



Рисунок 3-12 Веб-страница компании Bruker

Внимание: "Http"-соединение сменяется на "https"-соединение, закодированное 128 битами для обеспечения самого высокого возможного уровня безопасности!

В США Интернет-сервис доступен по адресу: bdalsupport-us.webex.com.

Рисунок 3-13 Введите необходимую информацию

Пожалуйста, введите необходимую информацию. Позвоните в Службу Сервиса Bruker +49 (341) 2431 395, чтобы узнать Ваш номер поддержки сессии. Нажмите кнопку "Submit" и следуйте указаниям, чтобы успешно подсоединиться для осуществления удаленного сервиса Вашего **microflex**.

4 ЭКСПЛУАТАЦИЯ

4.1 Включение/выключение прибора

Прибор включается/выключается при помощи клавишного переключателя на передней панели и сетевого выключателя (Рис. 3-3), где:

0 = Off (выключен).

I = On (включен).

Когда прибор правильно включен, на передней панели загорается светоиндикатор Power (Рис. 3-2).

Внимание: При положении выключателя 0 прибор выключен!

4.2 Проверка готовности прибора к работе

Когда прибор готов к сбору данных, на передней панели загорается светоиндикатор Ready (Рис. 3-2). Если он не горит, это означает, либо что мишень находится вне прибора, либо что давление внутри анализатора слишком высокое.

4.3 Установка планшета мишени

Чтобы установить в прибор планшет мишени:

1. Откройте крышку загрузочного порта (см. Рис. 3-6) и поместите планшет мишени MSP внутрь на платформу мишени.

Внимание: Если загрузочный порт нельзя открыть без усилия, это может означать, что носитель мишени может находиться в положении IN (т.е. «внутри»). Сначала переведите его в положение OUT («наружу»).

Осторожно: Постарайтесь, чтобы в загрузочный порт или на черное кольцо не попадали какие-либо мелкие предметы или частицы, для обеспечения prevent надежной работы прибора.

2. Закройте крышку загрузочного порта.
3. Нажмите и отпустите кнопку "TARGET IN/OUT" (Рис. 3-2).
4. Подождите, пока загорится светоиндикатор READY, оповещающий о готовности к сбору данных. Общее время от нажатия кнопки до загорания лампочки READY не должно превышать пяти минут, и обычно составляет менее двух с половиной минут.

4.4 Удаление планшета мишени

Чтобы достать планшет мишени:

1. Нажмите и отпустите кнопку "TARGET IN/OUT".
2. Откройте крышку загрузочного порта, достаньте планшет мишени, и закройте крышку загрузочного порта.

Внимание: Не доставайте предыдущую мишень, пока не подготовите новую мишень к её установке в прибор! Если в настоящее время у Вас нет подготовленного планшета мишени, вдвиньте платформу мишени внутрь (без мишени). Выдвиньте её наружу, когда у Вас будет готова новая мишень с образцами. Крышка загрузочного порта должна быть открыта минимальное время. Обратите внимание: пренебрежение этим советом не приведет к порче прибора, однако замена планшета мишени может занять до 30 мин!

4.5 Управление при выполнении анализов

Способы управление масс-спектрометром при выполнении анализов описаны в Руководстве

Пользователя **flexControl**, серийный номер 224 217.

5 ТЕКУЩЕЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ ПРИБОРА

Каждые три месяца проверяйте вентиляционный воздушный фильтр. Если он визуально забит пылью, для обеспечения надлежащей работы прибора замените фильтр. Для замены фильтра поднимите старый фильтр, выньте его из держателя, и затем вдвиньте туда новый фильтр (Рис. 3-4).

Состав изделия масс-спектрометр microflex в следующих вариантах исполнения: microflex LT/SH, microflex LRF:

1. Системный блок.
2. Монитор.
3. Устройство для печати.
4. Программное обеспечение специальное медицинское.
5. DVD-диск с программным обеспечением для управления, сбора и обработки данных.
6. DVD-диск с поисковым программным обеспечением для протеомики.
7. DVD-диск с программным обеспечением для управления прибором, выполнения измерений и обработки спектров, для автоматизации измерений и обработки спектров, для одновременного управления системой жидкостной хроматографии и масс-спектрометром.
8. DVD-диск с программным обеспечением для интерпретации MS и MS/MS спектров пептидов с возможностью поиска в глобальных протеомных базах данных.
9. DVD-диск с программным обеспечением для поиска в протеомных базах данных и установленными протеомными базами данных (MSDB, NCBI, Swissprot) для идентификации белков по MS и MSMS спектрам.
10. DVD-диск с программным обеспечением для поиска неизвестных соединений.
11. DVD-диск с программным обеспечением для статистической обработки получающегося массива данных.
12. DVD-диск с программным обеспечением для исследования синтетических полимерных структур.
13. DVD-диск с программным обеспечением для исследования структур сополимеров.
14. DVD-диск с программным обеспечением для исследования SNP-геномодификаций.
15. DVD-диск с программным обеспечением для определения качества олигонуклеотидов.
16. DVD-диск с программным обеспечением для масс-спектрометрического типирования микроорганизмов по масс-спектрам специфичных белков с использованием входящей в комплект базы данных.
17. База данных на DVD для масс-спектрометрического типирования микроорганизмов по масс-спектрам специфичных белков.
18. DVD-диск с программным обеспечением для интегральной обработки массива спектров.
19. DVD-диск с программным обеспечением для управления протеомными проектами, хранения и обработки протеомных данных, включая системы поиска по протеомным и базам данных пост-трансляционных модификаций белков и пептидов.
20. Серверная станция с предустановленным программным обеспечением для управления протеомными проектами, хранения и обработки протеомных данных, включая системы поиска по протеомным и базам данных пост-трансляционных модификаций белков и пептидов.
21. Серверная станция с предустановленными белковыми поисковыми базами данных.
22. Набор для обслуживания масс-спектрометра:
 - воздушный фильтр -1 шт.;
 - входной фильтр -1 шт.;
 - прокладки для диафрагмового насоса.
23. Форвакуумный мембранный насос.
24. Мишень для анализа образцов из нержавеющей стали.
25. Мишень для анализа образцов из полированной нержавеющей стали.
26. Мишень для анализа образцов из нержавеющей стали со структурированной поверхностью.
27. Адаптер для крепления мишеней для анализа образцов в масс-спектрометре.
28. Набор мишеней для анализа образцов с предварительно нанесенной матрицей с 96 точками (10 шт. в комплекте).
29. Адаптер для мишеней для анализа образцов с предварительно нанесенной матрицей в масс-спектрометре.
30. Набор мишеней для анализа низкомолекулярных соединений (NALDI) (5 шт. в комплекте).

31. Адаптер для мишеней для анализа низкомолекулярных соединений.
32. Калибровочная мишень.
33. Калибровочный стандарт для калибровки масс-спектрометра в низком пептидном диапазоне (5 пробирок в комплекте).
34. Калибровочный стандарт для калибровки масс-спектрометра в высоком пептидном диапазоне (5 пробирок в комплекте).
35. Калибровочный стандарт для калибровки масс-спектрометра в низком белковом диапазоне (5 пробирок в комплекте).
36. Калибровочный стандарт для калибровки масс-спектрометра в высоком белковом диапазоне (5 пробирок в комплекте).
37. Бактериальный калибровочный стандарт (5 пробирок в комплекте).
38. Калибровочный стандарт для калибровки масс-спектрометра анализа олигонуклеотидов в низком массовом диапазоне (5 пробирок в комплекте).
39. Калибровочный стандарт для калибровки масс-спектрометра анализа олигонуклеотидов в высоком массовом диапазоне (5 пробирок в комплекте).
40. Масс-спектрометрическая матрица HCCA (5 пробирок по 200 мг в комплекте).
41. Масс-спектрометрическая матрица 3-HPA (5 пробирок по 200 мг в комплекте).
42. Масс-спектрометрическая матрица 2,5-DHAP (5 пробирок по 200 мг в комплекте).
43. Масс-спектрометрическая матрица SA (5 пробирок по 200 мг в комплекте).
44. Масс-спектрометрическая матрица 2,5-DHB (5 пробирок по 200 мг в комплекте).
45. Масс-спектрометрическая матрица SDHB (5 пробирок по 1 г в комплекте).
46. Масс-спектрометрическая матрица 2,3,4-THAP (5 пробирок по 200 мг в комплекте).
47. Масс-спектрометрическая матрица 2,4,6-THAP (5 пробирок по 200 мг в комплекте).
48. Масс-спектрометрическая матрица DIT (5 пробирок по 200 мг в комплекте).
49. Масс-спектрометрическая матрица IAA (5 пробирок по 200 мг в комплекте).
50. Система предварительного разделения образцов на основе ВЭЖХ с нано-потоками.
51. Колонки хроматографические.
52. Вials.
53. Крышки для виал.
54. Септы для виал.
55. Стандартный образец (5 пробирок по 500 пмоль вещества/пробирке).
56. Набор для обслуживания ВЭЖХ с нано-потоками:
 - 3 капилляра с пластиковыми или металлическими ферулами и гайка;
 - 3 капилляра от дегазатора до автосемплера;
 - 2 капилляра с фильтром и фитингом;
 - 1 комплект (нанолитровый тройник с нулевым мертвым объемом (1/32 дюйма диаметр трубки);
 - 10 трубок с диаметром 360 мкм;
 - 1 петля на 20 мкл;
 - 2 комплекта подачи жидкостей (пластиковый тройник с 3 фитингами, 3 ферулами и 2 капиллярами);
 - 1 набор (плоские фильтры 2 шт.);
 - 1 линия смешения жидкостей (пластиковый тройник, 5 пластиковых ферул, 5 пластиковых фитинга, 3 капилляра, 1 стальная ферула, 1 стальной фитинг);
 - 1 игла для автосемплера;
 - 1 капилляр для выходы с колонки с фитингом, фильтром и ферулой;
 - 1 линия сброса избытка растворителя (капилляр фитингом и ферулой);
 - 1 трубка с фитингом и ферулой.
57. Набор для запуска ВЭЖХ с нано-потоками:
 - 1 игла для автосемплера;
 - 1 комплект плунжерных шайб (4 шт. в комплекте);
 - 1 прокладка для клапана;
 - 1 капилляр для выходы с колонки с фитингом, фильтром и ферулой;
 - 1 линия сброса избытка растворителя (капилляр фитингом и ферулой);
 - 1 капилляр с пластиковыми или металлическими ферулами и гайка;
 - 1 набор предконок (3 шт. в комплекте);
 - 1 колонка;

- 1 набор капилляров (2 см, 1/32 диаметр, 30 шт.).
58. Система автоматического нанесения образцов на базе роботизированного комплекса пробоподготовки ВЭЖХ-MALDI, обеспечивающий сбор фракций от жидкостного капиллярного или нано-хроматографа и нанесение их на мишени для масс-спектрометра.
59. Источник бесперебойного питания.

АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Анкерная технология AnchorChip 23

Б

Блок управления 15

В

Вакуумная система 19

Включение и выключение прибора 32

Входы и выходы 13

Д

Детектор 27

З

Задняя панель компьютера 14

Знаки безопасности 7

К

Камера 29

Л

Лазерная продукция класса опасности III 18

Лазерная система 29

М

Меры предосторожности при управлении прибором 8

Н

Наладка 12

Нормативы 9

О

Отклоняющее напряжение/подавление матрицы 24

П

Планшеты Micro SCOUT 23

Прибор 5

Проверка готовности прибора 32

С

Селектор родительских ионов, PCIS 24

Селекция пропускания 29

Схема ионного источника 20

Схема прибора 15

Соблюдение законодательных требований 9

Т

Текстовые обозначения и символы 8

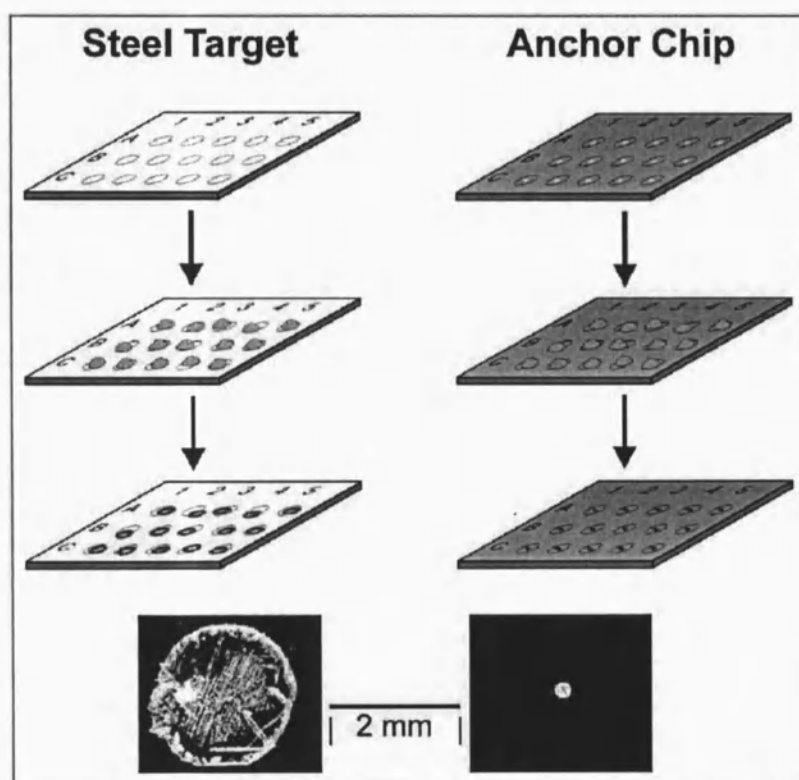
Текущее обслуживание прибора	33
Техника безопасности при использовании электрических систем	10
Технические и электрические требования	12
Транспондер	23
Требования по условиям окружающей среды	12
У	
Удаление планшета мишени	33
Удаленное сервисное обслуживание	30
Установка и наладка прибора	12
Установка планшета мишени	32
Ц	
Цифровой преобразователь	29

ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРОВ

MALDI-TOF

Ячейки с гидрофильными центрами связывания: высокопроизводительная идентификация белков на субфемтомолярном уровне

Показано, что использование пластин мишеней с маленькими гидрофильными центрами связывания (анкерами) на гидрофобном покрытии (AnchorChip™) приводит к 10- и 100-кратному увеличению чувствительности в MALDI-TOF и tandemной масс-спектрометрии по сравнению с традиционными стальными мишенями [M. Schurenberg et al., Prestructured MALDI-MS Sample Supports, Anal. Chem. 72 (2000) 3436ff.].



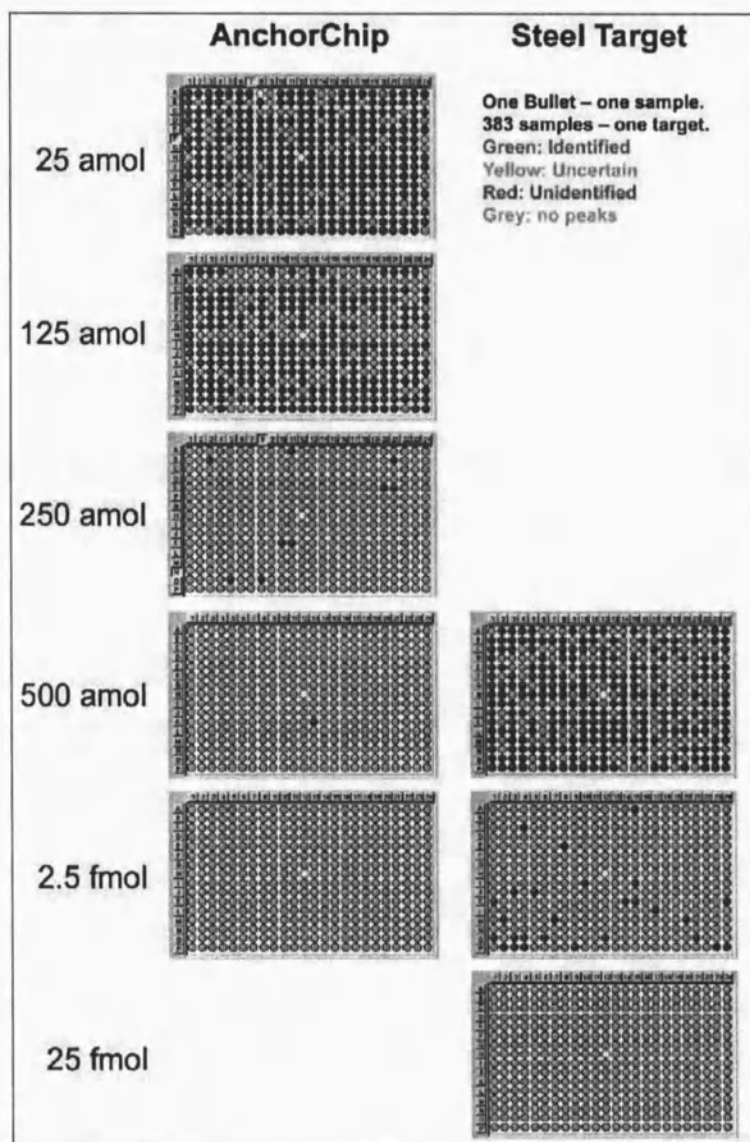
Фиг. 1: Принцип подготовки AnchorChip.

Тогда как на стандартных стальных мишенях капли, содержащие матрицу и анализируемое вещество, при высушивании занимают довольно большое пространство (здесь показан пример в случае DHB), на мишенях AnchorChip они стягиваются, и образуемые кристаллы занимают точно определенную площадь.

Для приготовления пластин AnchorChip на гидрофильный центр ячейки – анкер – наносят крупную каплю (0,5–3 мкл), содержащую матрицу и анализируемое вещество. После высушивания она стягивается до размера этого центра, ограничивая, таким образом, площадь образования кристаллов матрицы до точно определенных размеров (Фиг. 1). В результате такого высушивания, в отличие от обычного процесса «высушивания капель», концентрация анализируемого вещества повышается на коэффициент, зависящий от размера гидрофильного центра.

Материалы и методы

Для пробоподготовки использовали восьмиканальный робот-пипетатор (mapII/8™, Bruker Daltonics, 15 мин/мишень). На ряды гидрофильных анкерov (AnchorChip, диаметр 600 мкм) и



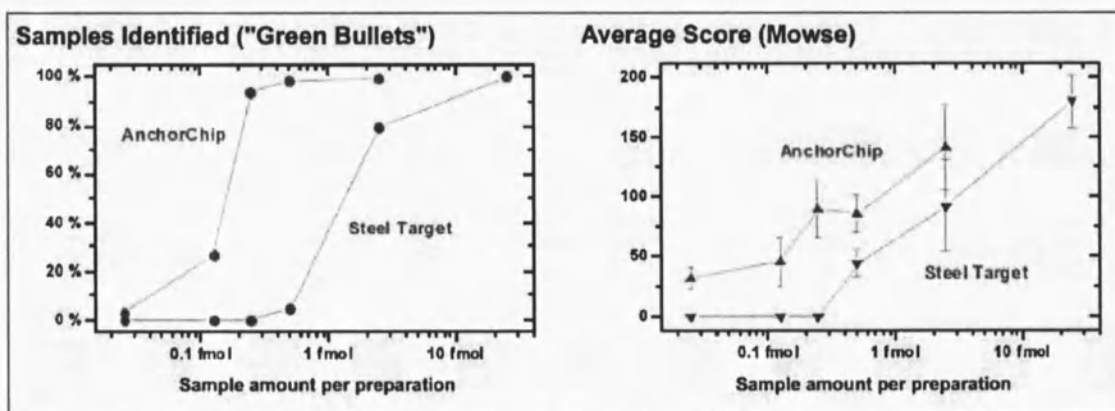
на стандартные стальные мишени наносили гидролизат белка (трипсиновый гидролизат бычьего сывороточного альбумина), используя различные количества образца. Для проведения каждой серии анализов использовали 383 образца с одинаковым количеством вещества, а также одну пептидную смесь для внешней калибровки.

Для подготовки мишеней AnchorChip на анкеры наносили 2,25 мкл матрицы (-циано-4-гидроксипинамовая кислота (-cyano-4-hydroxycinnamic acid, HCCA), 0,2 г/л в смеси этанол:ацетон 4:1) и 0,25 мкл образца (трипсиновый гидролизат белка при разном разбавлении). Для подготовки стандартных

стальных мишеней наносили 0,75 мкл матрицы (HCCA, 5 г/л в 30% ацетонитриле с добавкой 0,1% трифторуксусной кислоты). Использовали условия пробоподготовки «DD», с соответствующими соотношениями образец/матрица. Автоматический сбор спектров осуществлялся на приборе BIFLEX III™ (Bruker Daltonics). Скорость сбора данных составляла 30-60 сек./образец и зависела от качества образца. Для одного образца собирали 200 масс-спектров.

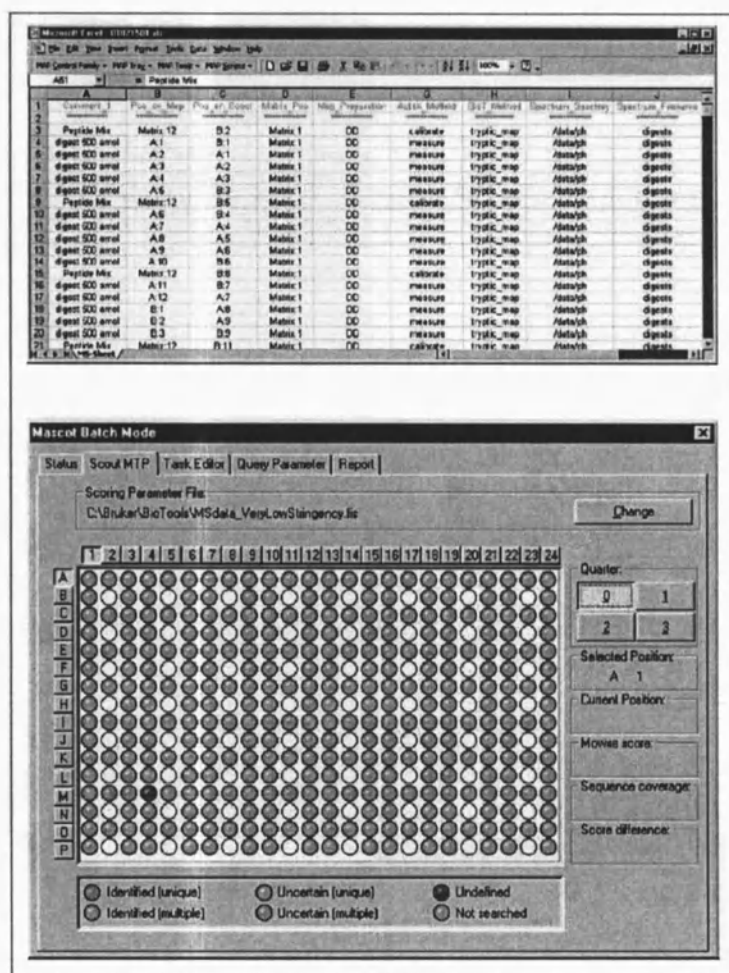
Сочетание автоматического сбора масс-спектров и серийного поиска по базам данных (biotools™/Bruker Daltonics; MSDB, Mascot/Matrix Science) показали увеличение чувствительности, достигаемое с помощью анкерной технологии. Результаты поиска по базам данных быстро оценивались алгоритмом с гибким регулятором. В основном эта оценка основывалась на покрывающей способности базы данных в отношении последовательностей и индекса Моуза. После перенесения отчетов об оценке поиска в Microsoft Excel проводился статистический анализ для сравнения результатов поиска по обоим типам мишеней.

Результаты и их обсуждение



Фиг. 3: Статистика серийных поисков. Слева: Сравнение относительного количества надежно проведенных идентификаций на стальных мишенях и на AnchorChip. Оценка надежности производилась алгоритмом BioTools. Справа: Сравнение средних индексов Моуза для пробоподготовки на стальных мишенях и на AnchorChip, полученная Mascot на основе серийного поиска по базам данных.

- Все демонстрируемые результаты были получены при использовании полностью автоматизированных процедур: пробоподготовки, сбора данных, аннотирования с использованием поисков Mascot. Вручную задавались только параметры самого анализа.



Фиг. 4: Калибровка по ближайшему соседу.

Для этого эксперимента была выбрана более сложная крупноформатная таблица (сверху). Для автоматической калибровки прибора была выбрана одна калибровочная смесь (на рисунке снизу она обозначена белыми кружками). Калибровка по данному пятну использовалась для окружающих его образцов (500 амоль вещества, нанесенного на AnchorChip). Полученный средний индекс Моуза (148) был существенно выше, чем для мишеней, калиброванных только по одной позиции.

- Демонстрируемые данные были получены для модельного гидролизата. Реальные образцы могут содержать посторонние вещества, осложняющие кристаллизацию матрицы на мишенях AnchorChip. Мы установили, что решить эту проблемы такого рода можно, используя автоматизированные процедуры промывки мишени и перекристаллизации (см. документ «Система MT-60 серии flex: области применения»). Однако для реальных образцов необходимо индивидуально оптимизировать

90% идентификаций на AnchorChip проводились на уровне 200 амоль вещества, тогда как на стальных пластинах эта величина составляла 10 фмоль (получена в результате интерполяции). Независимо от количества образца, AnchorChip всегда давал лучшие результаты поиска, чем стальные мишени: индекс Моуза для AnchorChip всегда был по меньшей мере на 50 единиц выше. (Фиг. 2, 3).

Еще более высоких величин индекса Моуза можно достичь при использовании более сложной процедуры пробоподготовки, используя 64 позиции для внешней калибровки соответствующих окружающих данную ячейку образцов (Фиг. 4). Таким образом, средний индекс Моуза может быть повышен с 84 (500 амоль, для одноточечной калибровки мишени) до 148 (500 амоль, калибровка по ближайшей соседней точке с сильно снижающимся массовым отклонением при поиске по базам данных).

последовательность пробоподготовки до приготовления больших серий одинаковых образцов.

- Умелый энтузиаст-экспериментатор сможет провести идентификацию и получить хорошие результаты даже при самых низких концентрациях. Возможно, потом это и назовут «обычным результатом». Но только при соответствующей статистической обработке, то есть при постановке анализа нескольких сотен одинаковых образцов, заявления о качестве аналитического метода будут правомерными.

Питер Гуфнагел, Мартин Шуренберг, Клаус Кёстер, Карл-Отто Крётер, Детлев Сукаю
Bruker Daltonics GmbH

Использование масс-спектрометров MALDI-TOF для контроля синтеза сополимеров

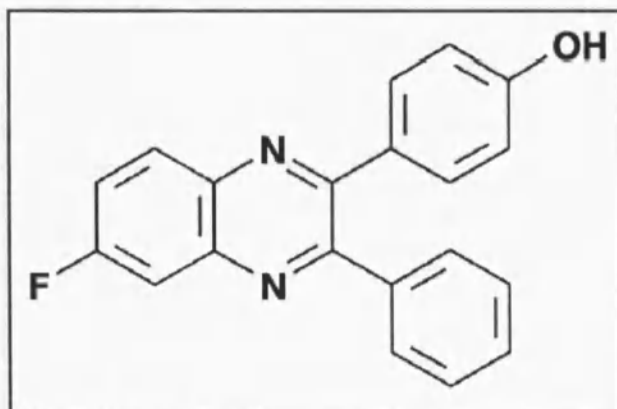
В последние годы масс-спектрометрия MALDI-TOF (лазерной десорбции и ионизации при содействии матрицы, *Matrix-Assisted Lased Desorbtion/Ionization*) стала очень мощным инструментом для анализа синтетических полимеров. В различных целях были проанализированы полимеры многих классов. Качество масс-спектров олигомеров в диапазоне масс вплоть до 10000 Да было существенно улучшено за счет метода Импульсной Экстракции Ионов (*Pulsed Ion Extraction, PIE*). Этот метод обеспечивает изотопное разрешение разных пиков олигомеров. Кроме того, число исследования в области подготовки полимерных образцов постоянно растет.

Для анализа синтезируемых сополимеров мы использовали Импульсную Экстракцию Ионов (*Pulsed Ion Extraction, PIE*). Наши эксперименты показали преимущества изотопного разрешения в интерпретации масс-спектров. Для того, чтобы достичь максимального разрешения, все спектры регистрировались в режиме рефлектрона. Это было необходимо для различения линейных и циклических продуктов реакции, поскольку их массы отличались только на 2 Да (2 атома водорода).

Синтез.

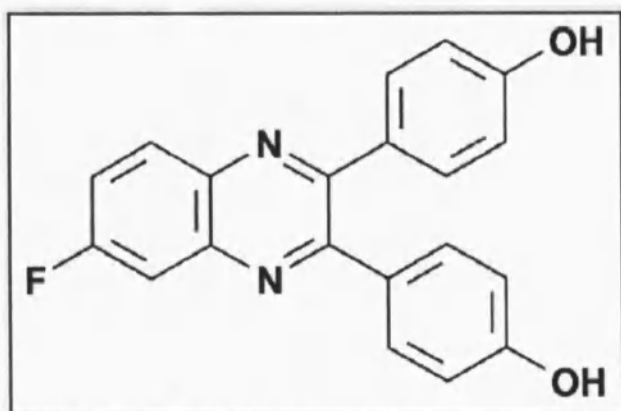
Для синтеза сополимера использовали следующие 2 мономера:

Компонент А:



молекулярная масса 316.1 Да; молекулярная масса звена в цепи 296.1 Да.

Компонент В:



молекулярная масса 332.1 Да; молекулярная масса звена в цепи 312.1 Да.

Реакционная смесь состояла из 20% компонента А и 80% компонента В.

Результаты.

Полный масс-спектр исследуемого сополимера показан на Рис. 1. На нем видна серия сигналов с отличием по массовым числам в 296 Да.

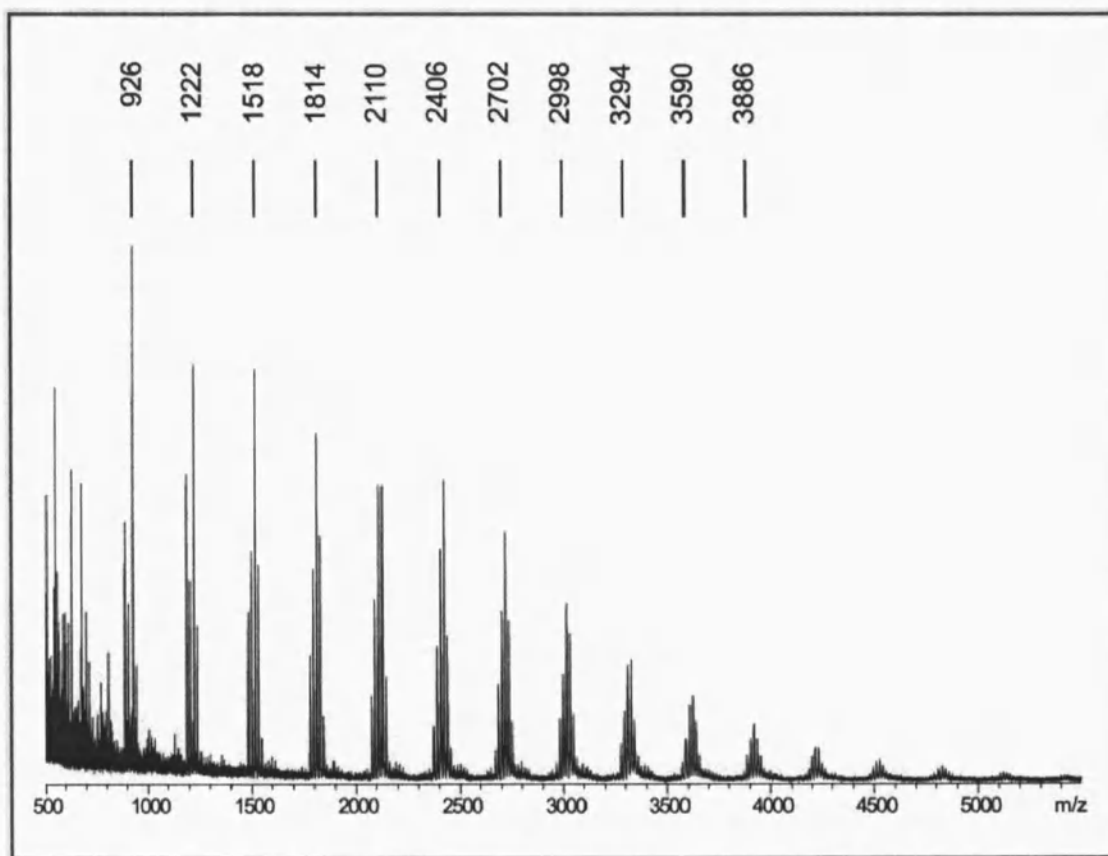
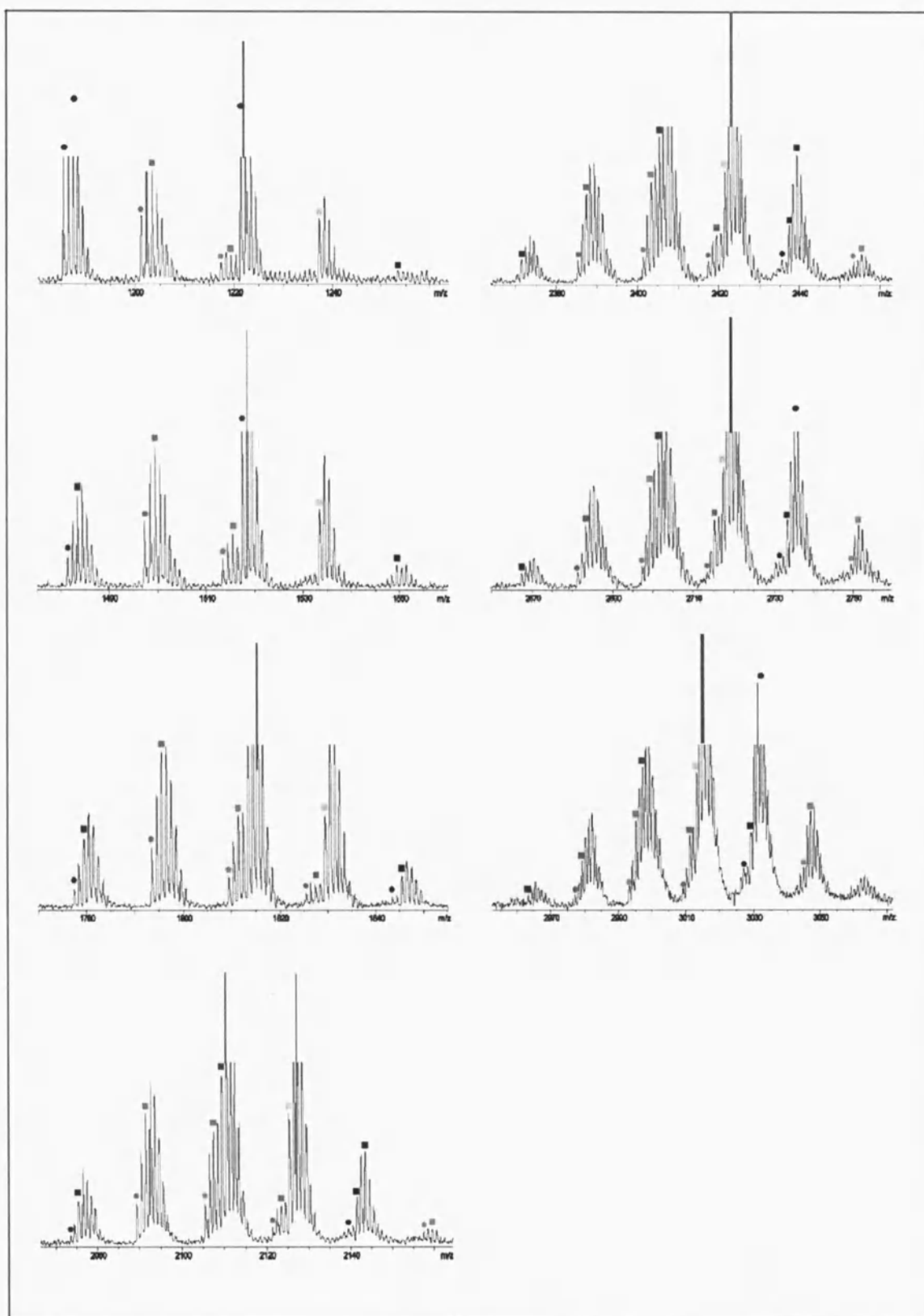


Рис. 1: Полномасштабный масс-спектр исследуемого сополимера. Ясно наблюдается олигомерная единица 296 Да, соответствующая компоненту А

Эта масса соответствует компоненту А, доля которого в синтезе составляла



Р с. 2: Ysen 4eHHble OTAe||bl P с. 1. Li,seTHble MeTKOTHOCfiTCfi K cpopMynaM,np BeAeHHbiM s Ta6n 1..1e 1.

20%. Компонент В, по-видимому, не принял участия в полимеризации. Группы отдельных

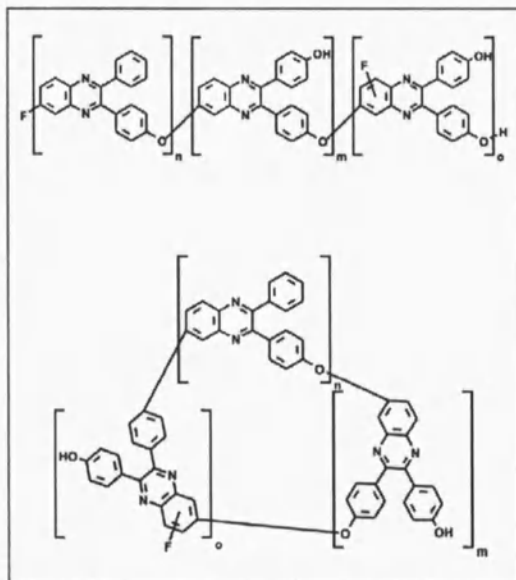


Рис. 3: Наблюдаемые структуры полимера. На спектрах, показанных на Рис. 2, линейные структуры отмечены квадратами, а циклические – кружками.

пиков образованы девятью различными продуктами реакции, имеющими, по-видимому, линейное и циклическое строение. Благодаря изотопному разрешению каждого пика их легко можно интерпретировать.

На Рис. 2 увеличены части масс-спектра, относящиеся к олигомерным группам. Их интерпретация приведена в Таблице 1.

Помимо циклических продуктов, которые на Рис. 2 отмечены кружками, основные компоненты продуктов реакции линейны (на Рис. 2 они обозначены квадратами). Таким образом, продукты реакции имеют структуры, показанные на Рис. 3.

Помимо двух введенных мономеров А и В, в цепочке

полимера был обнаружен третий продукт-заместитель.

Это соединение, которое далее мы будем обозначать как компонент С, с массой на 18 Да выше, чем масса компонента В, могло образоваться при замещении

		+ А	+ 2А	+ 3А	+ 4А	+ 5А	+ 6А
A4 cyclic	●	1185,4	1481,5	1777,6	2073,7	2369,8	2665,9
A4 linear	■	1187,4	1483,5	1779,6	2075,7	2371,8	2667,9
A3B cyclic	●	1201,4	1497,5	1793,6	2089,7	2385,8	2681,9
A3B linear	■	1203,4	1499,5	1795,6	2091,7	2387,8	2683,9
A2B2 cyclic	●	1217,4	1513,5	1809,6	2105,7	2401,8	2697,9
A2B2 linear	■	1219,4	1515,5	1811,6	2107,7	2403,8	2699,9
A3C linear	■	1221,4	1517,5	1813,6	2109,7	2405,8	2701,9
AB3 cyclic	●	1233,4	1529,5	1825,6	2121,7	2417,8	2713,8
AB3 linear	■	1235,4	1531,5	1827,6	2123,7	2419,8	2715,9
A2BC linear	■	1237,4	1533,5	1829,6	2125,7	2421,8	2717,9
AB2C cyclic	●	1251,4	1547,5	1843,6	2139,6	2435,7	2731,8
AB2C linear	■	1253,4	1549,5	1845,6	2141,7	2437,8	2733,9
A2C2 linear	■	1255,4	1551,5	1847,6	2143,7	2439,8	2735,8
ABC2 cyclic	●	1269,4	1565,4	1861,5	2157,6	2453,7	2749,8
ABC2 linear	■	1271,4	1567,5	1863,6	2159,7	2455,7	2751,8

Таблица 1: Вычисленные массы для различных составов олигомерных фрагментов.

одного атома водорода в компоненте В на фтор.

Неожиданно было обнаружено, что структура олигомерных групп менялась с изменением диапазона масс. Циклические продукты больших размеров не наблюдались; основные

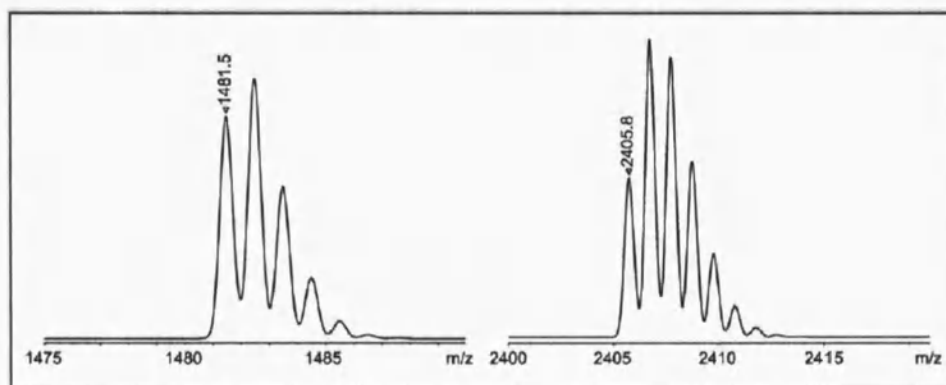


Рис. 4: Расчетные изотопные распределения для циклического иона A5 (слева) и линейного иона A7C (справа).

компоненты в диапазоне высоких масс содержат продукт замещения C.

Для детального исследования перекрывающихся сигналов необходимо сравнить их с расчетными. Два примера, приведенные на Рис. 4, хорошо коррелируют между собой.

Были сделаны следующие наблюдения:

1. Циклические продукты не типичны и исчезают в диапазоне высоких масс.
2. Основными продуктами являются линейные сополимеры.
3. Чем выше масса олигомера, тем больше в цепи полимера обнаруживается продукта C.

Заключение.

Для детального изучения синтеза сополимера использовали масс-спектрометрию MALDI-TOF. При использовании метода Импульсной Экстракции Ионов мы получили спектры, изотопно разрешенные вплоть до 5 кДа. Такое великолепное разрешение позволило различить линейные и циклические структуры, а также отличить заместители фтор и кислород. Таким образом, анализ при использовании масс-спектрометрии MALDI-TOF является эффективным средством для осуществления контроля за синтезом сополимеров.

Франц Майер-Познер 1, Уолкер Созерленд 1, Крис Весдемиотис 2.

1 Bruker Daltonik GmbH

2 Химический факультет Акронского Университета, США, штат Огайо.

Предструктурированные MALDI-TOF подложки для образцов: промывание образца и перекристаллизация

Как было недавно показано [1-5], использование предструктурированных мишеней MALDI, отличительной чертой которых стали маленькие гидрофильные участки («анкеры») на гидрофобном субстрате, приводит к более чем 10-кратному увеличению чувствительности по сравнению с сухой подготовкой капель для традиционных металлических мишеней, даже при полностью автоматизированной пробоподготовке и сборе данных. После испарения растворителя исходные микролитровые капельки стягиваются на анкерах, что приводит к повышению концентрации анализируемого вещества.

Выбор растворителя является определяющим, особенно для таких нерастворимых в воде матриц, как α -циано-4-гидроксикоричная кислота (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, HCCA). Органический растворитель выпаривается быстрее, чем вода, и после того, как концентрация матрицы достигает её растворимости, начинается процесс кристаллизации матрицы. Если в капле содержится слишком много воды, матрица начинает осаждаться слишком рано, что приводит к кристаллизации вне анкеров. Даже если матрица растворена в

чистом органическом растворителе, осаждаемый раствор анализируемого вещества часто содержит слишком много воды. Мы представляем простой метод перекристаллизации на мишени, в котором кристаллы возвращаются на анкер, независимо от исходного состава растворителя.

Этот этап перекристаллизации можно совместить с этапом промывания на мишени, в котором из подготовленных образцов будут удалены буферы. Здесь будут приведены два примера с обычно используемыми буферами (бикарбонат аммония и Трис/HCl), показывающие, что перекристаллизация не влияет на общую

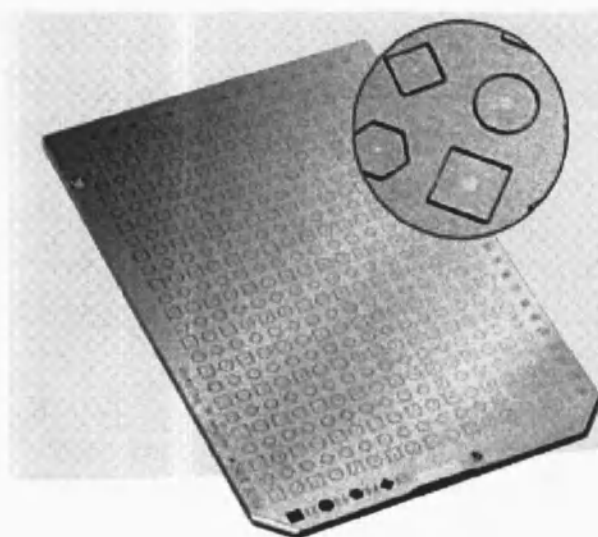


Рис. 1. Мишень AnchorChip с 384 гидрофильными участками различного размера (200, 400, 600, 800 мкм).

чувствительность и, по меньшей мере, эффективна для очистки ZipTips C 18.

Методы

Анализируемые вещества и буферные смеси.

Трипсиновый внутрирастворный гидролизат Бычьего Сывороточного Альбумина (БСА) разбавляли до трех различных концентраций (2/1/0,5 фмоль/л) двумя различными буферными растворами (50мМ бикарбонат аммония и 20мМ Трис/HCl pH 6,8). Для каждого эксперимента использовали 0,5 мкл анализируемого раствора, таким образом, общее количество анализируемого вещества составляло 1 фмоль, 500 амоль и 250 амоль, соответственно.

Для каждой концентрации осуществляли сравнительные эксперименты, в которых гидролизат БСА растворяли не в буферных растворах, а вместо этого в 0,1% трифторуксусной кислоте (TFA).

Пробоподготовка

Подготовка анкеров: 0,5 мкл анализируемого раствора и 2 мкл HCCA с концентрацией 0,3 г/л в смеси этанол: ацетон 2:1 наносили на анкер размером 600 мкм. Перекристаллизацию проводили для всех образцов, не содержащих буфера, с перенесением всех кристаллов на анкер. Промывание и перекристаллизацию осуществляли для всех образцов, содержащих буфер.

Промывание: 5-10 мкл 1% TFA наносили пипеткой на высушенную ячейку. Промывочный буфер удаляли после приблизительно 30 секунд после нанесения.

Перекристаллизация: 0,7 мкл смеси этанол/ацетон/1% TFA (6/3/1) наносили на высушенную ячейку.

Подготовка ZipTips: -C18 Zip-Tip (Millipore) увлажняли и стабилизировали согласно указаниям производителя. 0,5 мкл анализируемого раствора разбавляли 2 мкл 0,1%TFA и полученные 2,5 мкл раствора загружали на ZipTips. Связанные пептиды промывали 0,1% TFA и элюировали 2 мкл 40% ацетонитрила на анкер размером 600 мкм. В эту каплю вносили 2 мкл HCCA и затем образцы перекристаллизовывали.

Предструктурированная MALDI мишень

В работе использовали гидрофобные мишени AnchorChip™ (Bruker Daltonics) с 384 гидрофильными анкерами, общепринятого формата микротитровой пластины.

Масс-спектрометрия и анализ данных

Для сбора масс-спектров использовали MALDI-TOF масс-спектрометр BIFLEX III™. Идентификацию белков проводили при использовании программного обеспечения для поиска по базам данных Mascot в сочетании с базой данных по белкам OWL.

Результаты

На Рис. 2а показан типичный вид AnchorChip после пробоподготовки, когда в растворе анализируемого компонента и матрицы содержалось слишком много воды. Осаждение матрицы началось до того, как вся капля стянулась на анкере. С другой стороны, если бы в исходной капле было слишком мало воды, капля стянулась бы на анкер, но результат пострадал бы из-за образования слишком тонкого слоя кристаллов, при котором нельзя было бы получить удовлетворительные результаты масс-спектрометрического анализа. Визуально контролировать оптимальное количество воды невозможно, и в большинстве

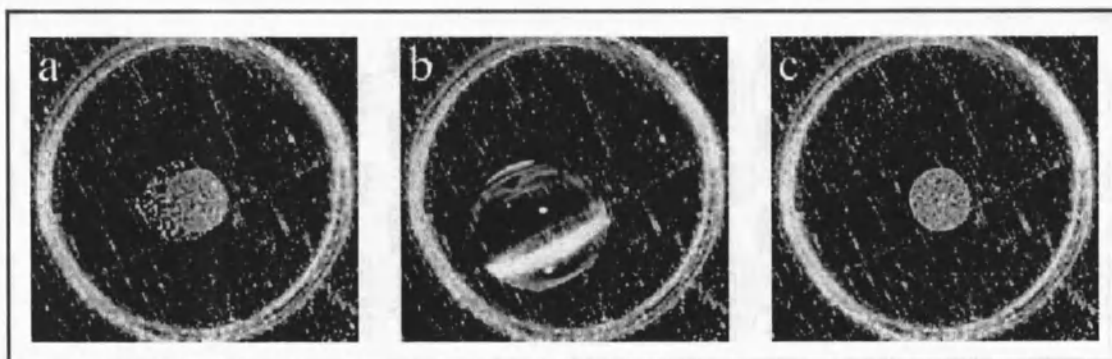


Рис. 2. Рекристаллизация НССА образца без буфера на «анкерном» участке 600 мкм.

случаев даже сам по себе анализируемый раствор уже содержит слишком большое количество воды.

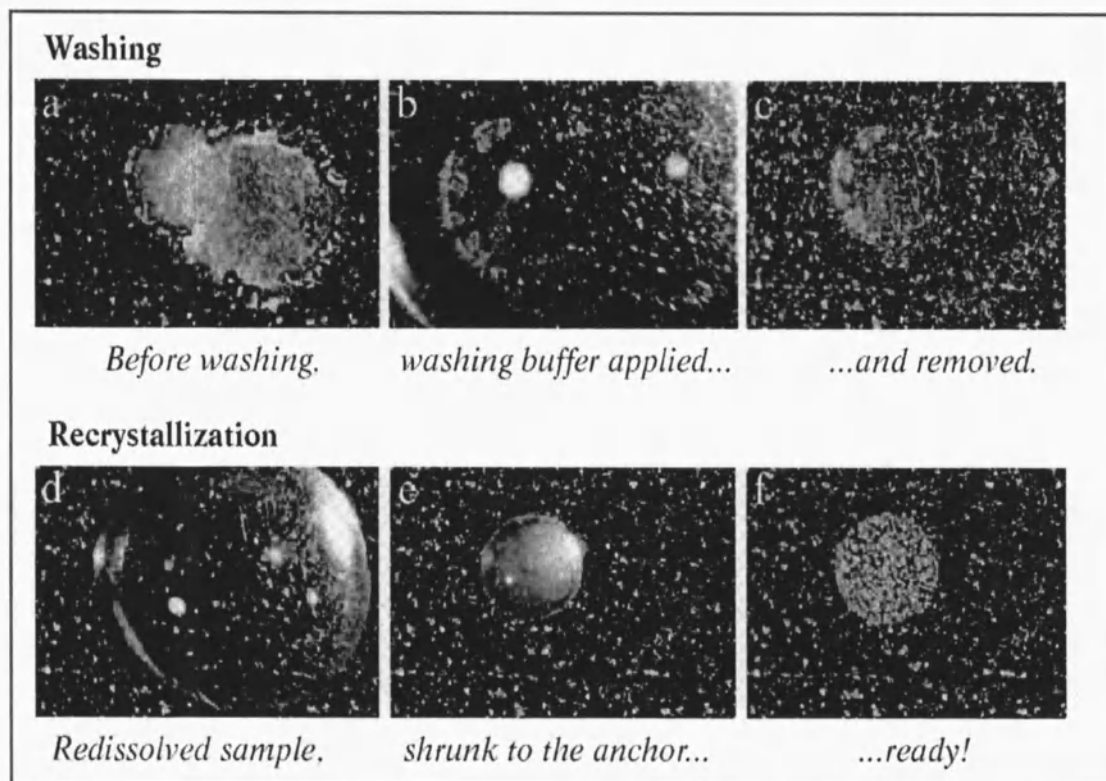


Рис. 3. Промывка и рекристаллизация препарата НССА содержащего 0.5 мкл бикарбоната аммония (50 мМ) на «анкерном» участке 600 мкм.

Если добавить к закристаллизованному образцу каплю с подходящим составом растворителей, кристаллы снова растворяются (Рис. 2b), и капля целиком стягивается на анкер. После выпаривания растворителя под микроскопом можно увидеть компактный слой крошечных, хорошо отделенных друг от друга кристалликов, покрывающий анкер (Рис. 2c). Обычно для перекристаллизации мы использовали 0,7 мкл смеси этанол/ацетон/1% NAF (6/3/1).

Если в изначально приготовленной капле присутствуют буферы, ситуация существенно осложняется. При этом не только высушенный слой становится значительно шире анкера, но и любой кристаллизации матрицы противодействует кристаллизация буфера (Рис. 3a). После такой подготовки пробы невозможно получить сигнал анализируемого вещества.

Мы успешно промывали буфер-содержащие образцы 5-10 мкл 0,1-1% TFA в течение приблизительно 30 секунд (Рис. 3b) и затем удаляли промывной растворитель с помощью пипетатора (Рис. 3c). Во время промывания удалялся лишь водорастворимый буфер, тогда как водонерастворимая НССА оставалась на мишени. Получаемый осадок был скорее аморфным, чем кристаллическим. К счастью, анализируемое вещество удерживалось на

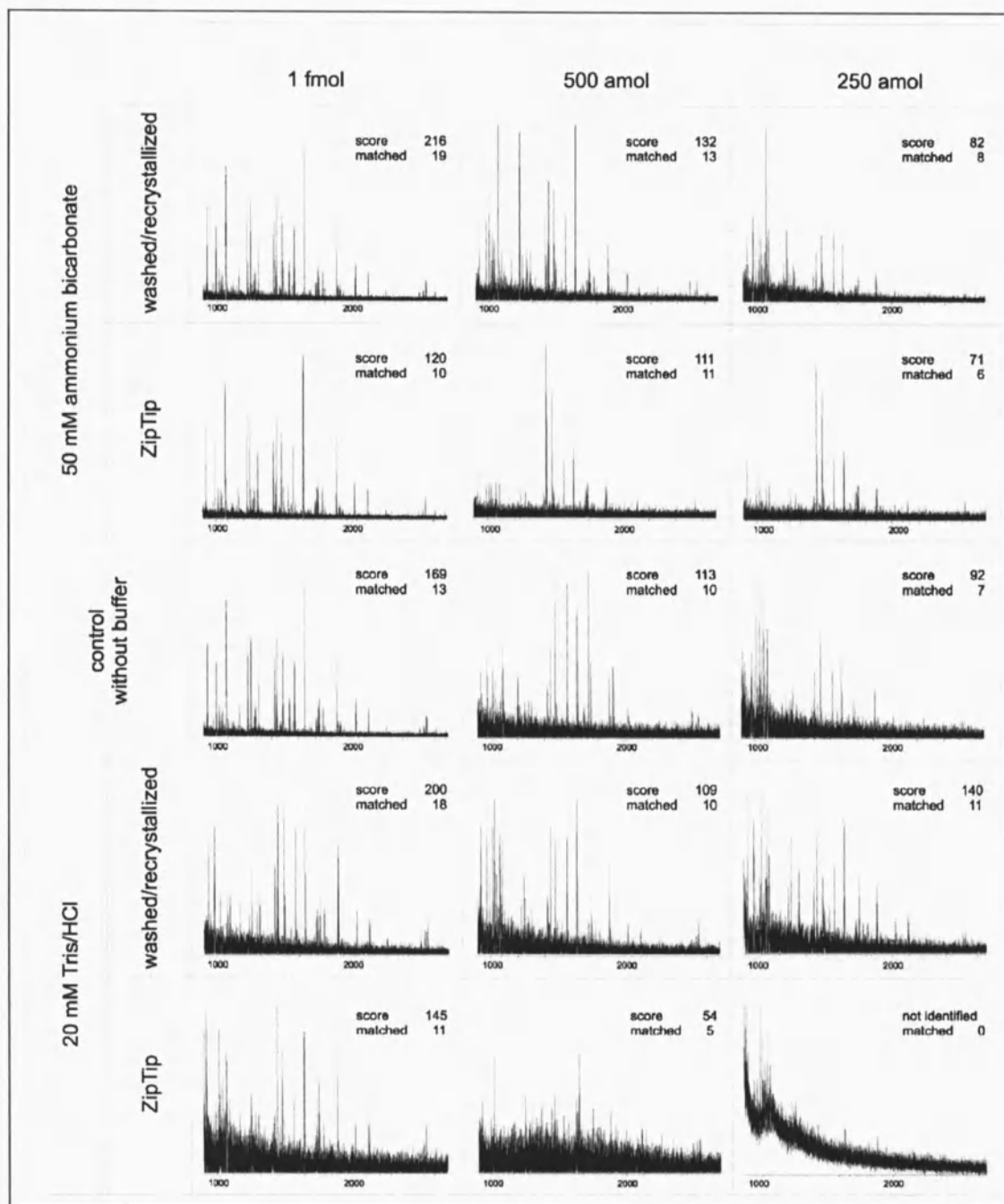


Рис. 4. MALDI масс-спектры, полученные в различных экспериментах на «анкерном» участке 600 мкм.

матрице (или на поверхности мишени) и не переходило в буфер, и его можно было перекристаллизовать вышеописанным способом (Рис. 3d-f).

На Рис. 4 показаны типичные масс-спектры, полученные для разных экспериментов. После промывания и перекристаллизации образцов хорошие масс-спектрометрические результаты

были получены для обоих исследуемых буферов, и можно было однозначно идентифицировать белки даже на уровне 250 амоль. По масс-спектрам и полученным результатам можно заключить, что процесс промывания не приводит к существенным потерям анализируемого вещества: общая чувствительность, полученная для промытых и перекристаллизованных буфер-содержащих образцов, не снижается по сравнению с образцами, не содержащими буфера, которые только перекристаллизовывали, но не промывали.

В общем случае бикарбонат аммония является лучшим буфером для MALDI, чем Трис/HCl. Проба, содержащая 0,5 мкл 30мМ Трис/HCl, не закристаллизовалась, и такие капли оставались жидкими даже полчаса спустя. После промывания бикарбонат аммония можно удалить практически количественно, поскольку он улетучивается при контакте с кислотным промывочным буфером, тогда как Трис/HCl полностью удалить нельзя. На масс-спектрах, полученных при использовании Трис/HCl, фон в области меньших масс несколько выше, чем для масс-спектров, полученных с использованием бикарбоната аммония (Рис. 4).

В других сериях экспериментов перед нанесением на мишени AnchorChip мы очищали буфер-содержащие анализируемые растворы с помощью ZipTips (Millipore). Аналитический сигнал и степень удаления буфера были сравнимы с методом промывания и перекристаллизации на мишени для образцов, содержащих 50мМ бикарбоната аммония, но гораздо хуже – для образцов с низкой концентрацией, содержащих 20мМ Трис/HCl. Для образцов с концентрацией ниже 500 амоль, содержащих Трис/HCl, не было зарегистрировано сигналов белков. Это указывает на то, что связывающе-элюирующая способность ZipTips зависит от вида используемого буфера.

Заключение.

Промывание и перекристаллизация на мишени:

- обеспечивает новые степени свободы в подготовке предструктурированного носителя образца, поскольку результаты анализа становятся независимыми от изначально приготовленных капель (состава буфера и растворителя).
- эффективно позволяет избавиться от буферов: бикарбонат аммония и Трис/HCl.
- обеспечивает выигрыш в чувствительности при подготовке анкерov.
- обеспечивает сравнимые (бикарбонат аммония) или лучшие результаты (Трис/HCl), чем ZipTips.
- гораздо дешевле, чем ZipTips.
- очень просты, поскольку состоят только из стадий пипетирования.
- полностью совместимы с автоматизацией.

Литература

- [1] M. Schurenberg, C. Luebbert, H. Eickhoff, M. Kalkum, H. Lehrach, E. Nordhoff: Prestructured MALDI-MS Sample Supports. *Anal. Chem.* 72 (2000) 3436-3442.
- [2] M. Schurenberg, E. Nordhoff, A. Sickmann, D. Suckau: 10-100 fold Sensitivity Increase for MALDI-MS. The 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 11-15, 2000, Long Beach, Ca, WPC 108.
- [3] J. Gobom, M. Schurenberg, M. Mueller, D. Theiss, H. Lehrach, E. Nordhoff: -cyano-4-hydroxycinnamic Acid Affinity Sample Preparation – A Protocol for MALDI-MS Peptide Analysis in Proteomics. *Anal. Chem.* 73 (2001) 434-438.
- [4] R. Hufnagel, M. Schurenberg, C. Koster, K. Krauter, D. Suckau: Hydrophilic Anchors: High-Throughput Protein Identification in the Subferptomole Range. ABRF Conference 2001, Feb. 24-27, 2001, San Diego CA, USA.
- [5] T. Johnson, J. Bergquist, R. Ekman, E. Nordhoff, M. Schurenberg, K. Kloppel, M. Muller, H. Lehrach, J. Gobom: A CE-MALDI Interface Based on the Use of Prestructured Sample Supports. *Anal. Chem.* 73 (2001) 1670-1675.

Мартин Шюренберг 1, Питер Гуфнагел 1, Барбара Эргард 1, Детлев Сукаю 1, Экгард Нордгофф 2.

1 Bruker Daltonik GmbH

2 Институт Молекулярной Генетики Макса Планка, Берлин, Германия.

Автоматизированная пробоподготовка для генотипирования полиморфов ДНК методом масс-спектрометрии MALDI-TOF

Фирма Bruker Daltonics предлагает технологию для низко-, средне- и высокопроизводительного генотипирования полиморфов ДНК. Рабочая станция Mapll/pure, часть предложенного программного оборудования, оптимизируема для автоматических магнитно-шариковых систем, в том числе очистительных систем для ДНК genopure фирмы Bruker Daltonics.

Mapll/pure – это 8-канальная пипетирующая рабочая станция, основанная на сериях роботов Daltonics для автоматической пробоподготовки перед масс-спектрометрическим анализом. Mapll/pure создана для автоматической очистки и подготовки биологических образцов к анализу масс-спектрометрами MALDI-TOF серии flex. Длительные ручные процедуры заменяются автоматическим управлением всеми пипетирующими стадиями для постановки и очистки продуктов молекулярно-биологических реакций, а также нанесением образцов и матриц на пластины мишеней MALDI.

В качестве практического примера мы приводим автоматическое генотипирование SNP в человеческом гене, отвечающем за появление болезни Крейцфельда-Якоба.

Введение

Прионные болезни – это заразные болезни нейродегенеративного типа, присущие многим млекопитающим, например, овцам, крупному рогатому скоту и людям [1]. В частности, бычий губчатый энцефалит (BSE) вызвал в свое время большое общественное беспокойство, поскольку мог стать угрозой для людей, потребляющих зараженное коровье мясо. Есть данные, показывающие, что прионы BSE могут вызывать заболевания у людей [2]. Хотя человеческие прионные болезни являются редким явлением, есть данные о том, что «новый вариант» болезни Крейцфельда-Якоба (vCID) является проявлением BSE в человеческом организме. В частности, число vCID пациентов в Соединенном Королевстве экспоненциально растет [3]. Учитывая, что данная болезнь может быть результатом инфицирования бычьими прионами, центральной проблемой сохранения общественного здоровья стала проблема изучения репликации прионов – и того, как противодействовать им. Каковы взаимосвязи между болезнями крупного рогатого скота и людей, и как прионы попадают и повреждают центральную нервную систему?

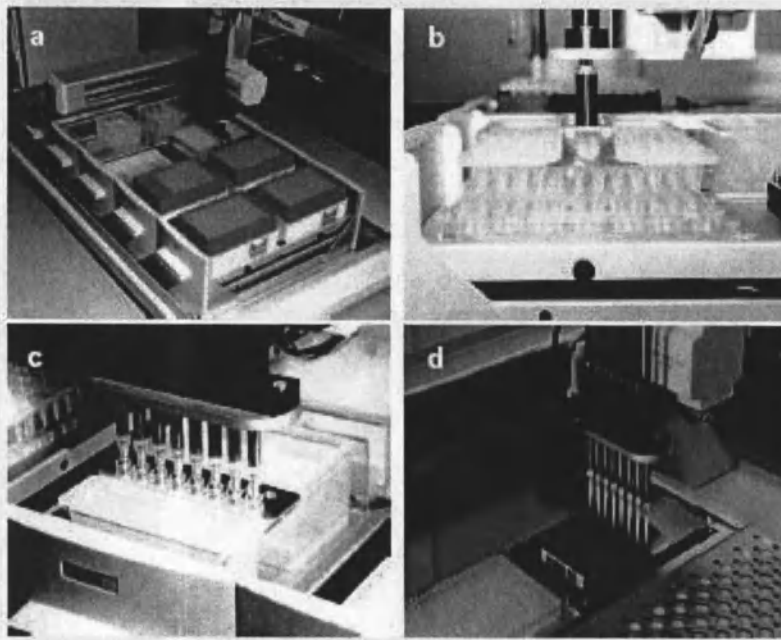


Рис. 1: Рабочая станция mapII/pure.

а) общий вид платформы; б) магнитный регулятор; в) адаптер низкого объема;
д) подготовка мишени MALDI.

Известно, что у людей и мышей полиморфы гена прионного белка влияют на инкубационный период прионных заболеваний и на восприимчивость к ним [4]. Человеческие прионные болезни делят на три различные формы: унаследованные, приобретенные и случайные. Большинство заражений губчатым энцефалитом происходит случайным образом. Генетически ген прионного белка PRNP полиморфен по отношению к метионину и

валину на кодоне 129. Было показано, что гомозиготность метионина является значительным фактором риска случайного заражения CJD [5]. Кроме того, все больные с vCJD в данном клиническом исследовании были гомозиготны по метионину и умерли в молодом возрасте [4]. Это навело на мысль, что метиониновая гомозиготность может увеличивать подверженность заболеванию.

Недавно были опубликованы результаты процедуры, подходящей для широкомасштабного генотипирования SNP на кодоне 129 в PRNP гене человека и крупного рогатого скота, использующей метод "GOOD assay" времяпролетного масс-спектрометра reflex IIITM фирмы Bruker Daltonics [6]. "GOOD assay" – это сложная процедура с превосходной способностью к высокопроизводительному SNP генотипированию [7, 8]. Однако для эффективной постановки анализа довольно большого числа образцов в день (100-200) необходима другая, более простая стратегия. В данной работе мы предлагаем простой способ анализа для SNP генотипирования. Процесс включает обычные молекулярно-биологические реакции, автоматическую очистку образца с использованием системы очистки ДНК genopureTM фирмы Bruker Daltonics на новой платформе-роботе mapII/pure, с последующей автоматической подготовкой образца и измерением аллель-специфичных фрагментов с использованием масс-спектрометрии MALDI-TOF.

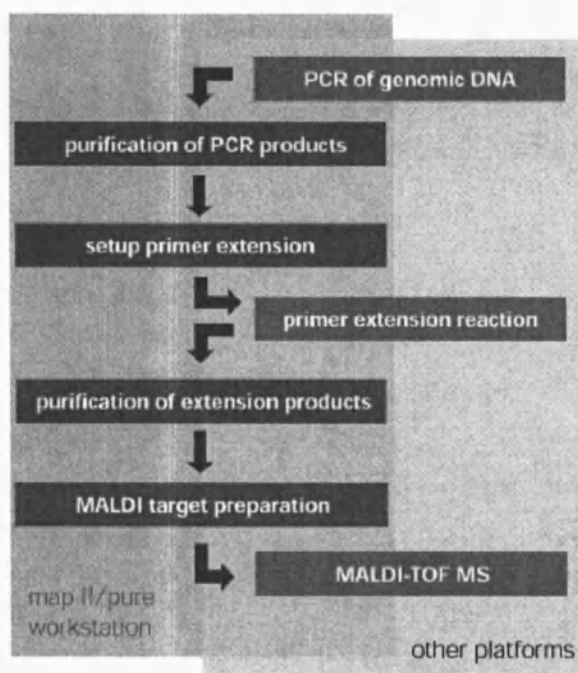


Рис. 2: Схема полуавтоматического протокола генотипирования SNP. Все пост-ПЦР стадии подготовки образцов выполняются одной платформой-роботом. Ручные операции нужны только для переноса пластин с образцами в термоциклизатор или в масс-спектрометр.

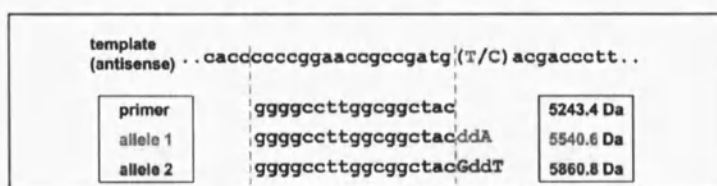


Рис. 3: Схематичное изображение реакции аллель-специфического удлинения праймера в случае генотипирования SNP M129V гена PRNP. Олигонуклеотидный праймер полиморфно удлиняется ДНК-полимеразой и предварительно выбранными dGTP, ddATP и ddTTP. Продукты аллель-специфического удлинения можно определить методом масс-спектрометрии MALDI-TOF в соответствии с их молекулярными массами.

Подготовка образца для SNP детектирования

На блок-схеме (Рис. 2) показан принцип полуавтоматизированной стратегии генотипирования, использующей полностью автоматизированную систему очистки образца и автоматизацию стадий подготовки рабочей станцией-роботом mapII/8™ (Рис. 1). На первой стадии стратегии в стандартных условиях на 96-ячеечной пластине проводится ПЦР-амплификация геномной ДНК. ПЦР реакции производили вручную на пластине-микротитраторе с 96 ячейками в

специальной комнате во избежание загрязнения. После температурного цикла ПЦР-реакционные смеси переносили на платформу-робот, и остаточные нуклеотиды, праймеры, ферменты и соли

автоматически удалялись, следуя протоколу системы genopurge ds. Для сокращения времени анализа продукт ПЦР, иммобилизованный на поверхности магнитных шариков,

использовали непосредственно в той же трубке как основу для последующей аллель-

специфичной реакции удлинения праймера. Реакции удлинения праймера автоматически

осуществлялись роботом. Перед нанесением с помощью пипетатора при использовании

низкообъемного адаптера платформы-робота (Рис. 1) смеси наносили в 8-полосном формате.

Для удлинения праймера пластину-микротитратор вручную переносили в систему термоциклирования и затем снова помещали в робот после завершения удлинения.

Продукты аллель-специфичной реакции удлинения праймера (Рис. 3) очищались автоматически магнитно-шариковой системой очистки ДНК genopure oligo.

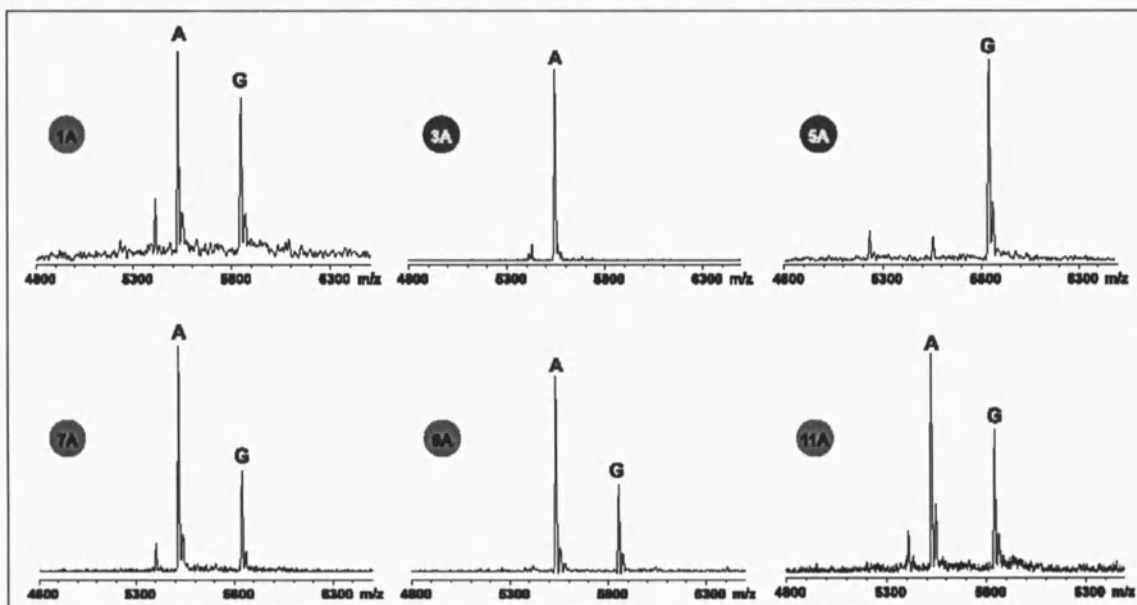


Рис. 4: Масс-спектры при анализе 96 образцов. Показана серия из 6 спектров для первого ряда MALDI мишени. Для каждого генотипа приведены типичные результаты.

Для очистки и ПЦР фрагментов, и удлинённых праймеров использовали новый магнитно-шариковый разделительный модуль рабочей станции-робота mapII/8™ (Рис. 2). Разделительный модуль состоит из магнитного адаптера, регулятора пластины, который управляется ручкой, и усовершенствованного автоматизирующего программного

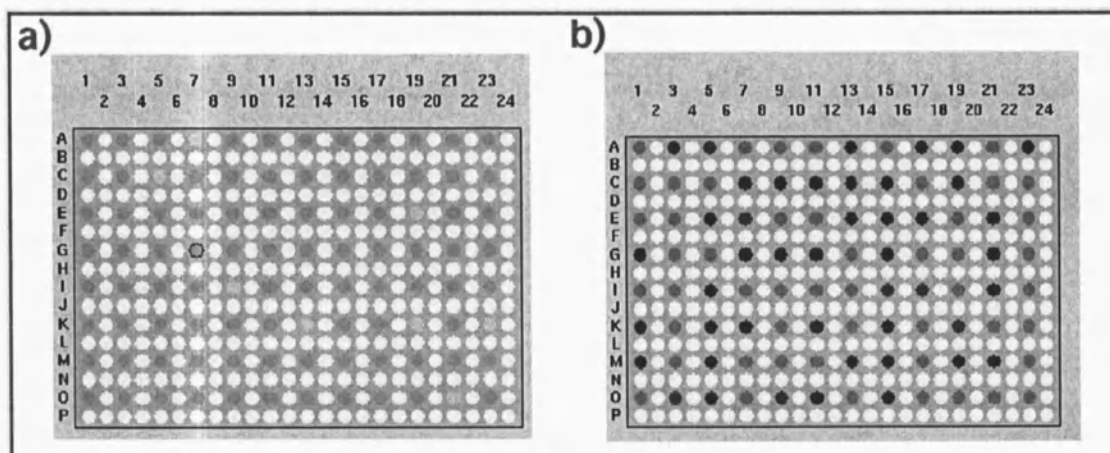


Рис. 5: Автоматическое распознавание аллелей программой genotools.

Результаты показаны в виде 384-ячеечной микропластины. а) надежность по отношению к интенсивностям пиков и отклонений масс от теоретических значений (зеленый = высокая, желтый = средняя, красный = низкая). б) генотипы; различными цветами представлены различные варианты аллелей.

обеспечения, контролирующего каждый процесс в протоколе и управляет полученными данными об образце.

После очистки продуктов аллель-специфичного удлинения праймера, матрица 3-HPA и образцы ДНК автоматически загружали на поверхность 384-ячеечной пластины MALDI мишени AnchorChip™ и вручную вносили в масс-спектрометр. Список образцов для автоматического измерения, содержащий данные о пробоподготовке и коды образцов ID, мог быть перенесен от рабочей станции к масс-спектрометру непосредственно по сети.

В результате масс-спектрометрического анализа были однозначно определены генотипы в образцах. Типичные результаты анализа серии из 96 индивидуальных образцов показаны на Рис. 4. Распознавание аллелей осуществлялось программным обеспечением genotools [9] для автоматизированного ДНК-анализа (Рис. 5). 88 (92%) образцов были проанализированы корректно с высокой надежностью, тогда как только для 8 образцов (8%) факторы надежности были средними, поскольку было несколько увеличено отклонение массы от теоретической, либо интенсивности пиков были заниженными. Однако генотипы всех 96 ДНК были корректно определены, что было подтверждено при проведении второго анализа такой же мишени с идентичными образцами. 39 (40%) индивидуальных ДНК были гомозиготны по метионину, 7 (7,3%) – по валину и у 50 (52,1%) был обнаружен гетерозиготный генотип по всем проанализированным полиморфам.

Обсуждение

SNP – это наиболее распространенная форма генетических полиморфов. Это, вместе с их потенциалом в качестве функциональных вариантов, привело к возрастанию интереса к SNP как факторам риска сложных заболеваний, например, для использования их в качестве фармакокинетических индикаторов, и для применения в судебной медицине. Производительность SNP генотипирования в разных лабораториях может очень отличаться. Так, в высокопроизводительных лабораториях в день анализируется 1000-10000 образцов, а в большинстве аналитических лабораторий в настоящее время число анализов в день обычно не превосходит несколько сотен. Таким образом, необходимы гибкие концепции для автоматической пробоподготовки.

Мы показали, что при использовании рабочей станции-робота mapll/pure есть прекрасная возможность для проведения в среднем 96-192 пробоподготовок в день. Система проста в использовании в условиях стандартной лаборатории и очищает образцы в 96-ячеечных микропластинах без каких-либо ручных манипуляций. Используя данную систему, можно избежать многих типичных ошибок ручной пробоподготовки, что приведет к высокой воспроизводимости результатов и практически идентичным условиям анализа каждого образца. В данном исследовании робот mapll/pure использовали для генотипирования полиморфа в человеческом гене прионного белка PRNP. Все 96 образцов были успешно

проанализированы методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, после чего определение генотипов проводили с использованием программы genotools. Автоматическое измерение и распознавание аллелей с высокой степенью надежностью были проведены в 90% образцов. Автоматизированные анализы характеризовались высокой производительностью и приводили к однозначному определению генетических вариаций. Статистическое распределение соответствует результатам недавно опубликованного клинического исследования [4], где ДНК-анализ проводили секвенированием Сэнгера. В противоположность той длительной и дорогой процедуре, с помощью простого масс-спектрометрического анализа, в сочетании с автоматизацией, можно быстро получить эквивалентные высоконадежные результаты. При этом постановка анализа и пробоподготовка просты в исполнении, и процедура строго нацелена на анализ определенного интересующего нас SNP. Поскольку условия ПЦР для амплификации SNP, содержащих геномные области, строго определены, за один день можно проанализировать до 192 образцов, получить результаты и интерпретировать их.

В заключении мы показали, что MALDI-TOF масс-спектрометрия в сочетании с простыми средствами для автоматизации является прекрасным инструментом для лабораторий, занимающихся генотипированием. В зависимости от степени автоматизации MALDI-TOF прибора могут быть удовлетворены все требования для подходов к SNP генотипированию как для низкопроизводительных аналитических исследований (<192 образцов в день), так и для проведения широкомасштабных геномных скринингов с производительностью более 10000 образцов в день.

Материалы и методы

Приготовление человеческих геномных ДНК

Геномные ДНК получали из крови, используя комплект QIAmp mini kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкциями производителя.

ПЦР

Геномные участки, содержащие полиморф, амплифицировали методом ПЦР. Все реакции удлинения праймера и ПЦР проводили в термоциклизаторе MJ PTC 225 Tetrad (MJ Research, США).

В качестве праймеров и для ПЦР, и для аллель-специфичного удлинения праймера использовали регулярные 2'-дезоксиполигонуклеотиды (MWG Biotech, Германия) и перечислены ниже в направлении от 5' к 3'. Праймерами для ПЦР-амплификации были: AGCAGTCATTATGGCGAACCT и GAAAGATGGTGAAAACAGGAAGA.

Термоциклирование проводили на 96-ячеечной микропластине (Biozym, Германия) при общем реакционном объеме 10 мкл. Для ПЦР совместно использовали 0,5 U полимеразы Tag DNA (Qiagen, Германия), 100 мкМ dNTPs (Promega, Германия) и 2,5 пмоль каждого

праймера, а также 5 нг геномной ДНК. Реакции проводили в коммерческом реакционном буфере, содержащем раствор Q (Qiagen, Германия) и 1.5 mM MgCl₂ (финальная концентрация). Условия проведения ПЦР: 2 мин при 94°C, затем 35 следующих циклов: 10 с при 94°C, 30 с при 58°, 30 с при 72°C, после чего следовало финальное удлинение – 2 мин при 72°C. Ампликон ПЦР был размером 801 bp.

Очистка продуктов ПЦР

Микропластину с 96 ячейками вручную переносили из термоциклизатора в магнитно-шариковую рабочую станцию *mapll/pure*. Для очистки ПЦР продуктов использовали комплект для очистки ДНК *genopure ds* фирмы Daltonics на платформе-роботе. Для очистки образца 96 ПЦР фрагментов использовали параметры «по умолчанию». На одну ячейку (10 мкл ПЦР продукта) использовали 3 мкл магнитных шариков и 12 мкл связывающего буфера *ds*, чтобы связать двухцепочечные ДНК-фрагменты на поверхности шариков. ДНК, иммобилизованные на шариках, несколько раз промывали 50 мкл эфирного промывочного буфера в соответствии с инструкциями производителя. После промывания шарики высушивали и использовали непосредственно в качестве темплатов для последующей реакции удлинения праймера.

Аллель-специфичная реакция удлинения праймера

Использовали 10 пмоль удлиняемого праймера, по 100 мкл dGTP (Promega, Германия), ddATP и ddTTP (Biolog, Германия) и 1,0 U Термосеквены (Amersham Pharmacia) в коммерческом реакционном буфере. Общий реакционный объем составлял 20 мкл. Реакционные смеси для удлинения праймера распределялись автоматически 8-игловым роботом из смеси, нанесенной на 8-ячеечных полосках. После распределения реагентов микропластину вручную переносили в термоциклизатор. Условия термоциклирования были следующими: 2 мин при 94°C, затем 30 следующих циклов: 10 с при 94°C, 30 с при 55° и 60 с при 72°C. Удлиняемый праймер: GGGGCCTTGGCGGCTAC.

Очистка продуктов аллель-специфичного удлинения праймера

Микропластину с 96 ячейками, опять же, переносили на платформу станции *mapll/pure*. Для очистки одноцепочечных ДНК использовали комплект для очистки ДНК *genopure oligo* фирмы Daltonics, контролируемый соответствующей программой. Для очистки 96 образцов использовали параметры «по умолчанию». На одну ячейку (20 мкл образца) использовали 5 мкл магнитных шариков и 50 мкл связывающего буфера *oligo*, чтобы связать одноцепочечные ДНК-фрагменты на поверхности шариков. ДНК, иммобилизованные на шариках, несколько раз промывали 50 мкл эфирного промывочного буфера в соответствии с инструкциями производителя. После высушивания шариков ДНК извлекали в 10 мкл элюирующего буфера.

Подготовка образцов для масс-спектрометрического анализа

3-Гидроксипиколиновую кислоту (3-HCA) концентрацией 10 мг/мл, содержащую 1 мг/мл гидроцitrата диаммония, использовали в качестве матрицы. Матричный раствор объемом 1 мкл наносили роботом *mapII/pure* в предварительно выбранном 96-ячеечном формате на MALDI мишень *AnchorChip 400* фирмы *Bruker* (диаметр анкера 400 мкм). Пятна матрицы оставляли при комнатной температуре до высыхания. На высушенную матрицу с помощью 8-игольного пипетатора наносили 1 мкл элюированного продукта аллель-специфичной реакции удлинения праймера. После высыхания образцов приготовленную MALDI мишень вручную переносили во времяпролетный масс-спектрометр *biflexIII* с ионным источником *scoutMTP*.

Автоматическое измерение, сбор данных и распознавание аллелей

Автоматические измерения контролировались программным комплектом для автоматизации *AutoXecute 4.0*. Автоматическое распознавание аллелей производилось программным модулем *genotools 1.0*, работающим в среде программы по обработке данных *xMass 5.1*.

Литература

- [1] Collinge J, Sidle KCL et al. *Nature* 1996; (383): 685-690.
- [2] Ironside JW. *Arch Virol Suppl* 2000; (16): 143-51.
- [3] Aguzzi A, Montrasio F, Kaeser PS. *NatRevMol Cell Biol.* 2001 Feb; 2(2): 118-26.
- [4] Alperovitch A, Zerr I et al. *The Lancet* 1999; 353(9165): 1673-1674.
- [5] Palmer MS, Dryden AJ et al. *Nature* 1991; (352): 340-341.
- [6] Sauer S, Lechner D et al. *Nucleic Acids Res.* 2000. 28: e100.
- [7] Sauer S, Lechner D et al. *Nucleic Acids Res.* 2000. 28: e13.
- [8] Bruker Daltonics Application Note MT-56.
- [9] Pusch W, Krauter K et al. *Biotechniques* 2001; (30): 210-215.

Томас Фрелич, Дирк Питерс, Жаклин Биммлер, Стефани Гагнер, Томас Вензел, Маркус Кострзева

Bruker Saxonia Analytic GmbH/ Bruker Daltonics GmbH

Пронумеровано и
прошнуровано 66 лист(ов)а

