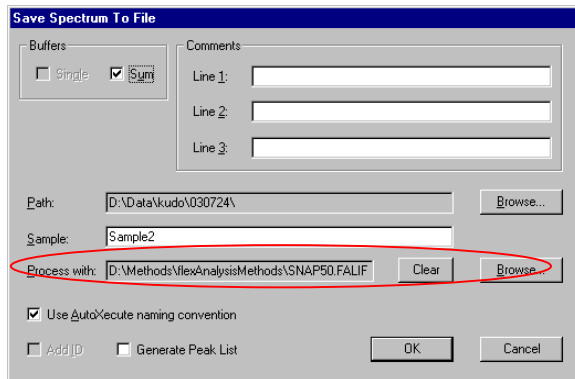


FlexAnalysis Methodを使用したPMF用スペクトル処理について

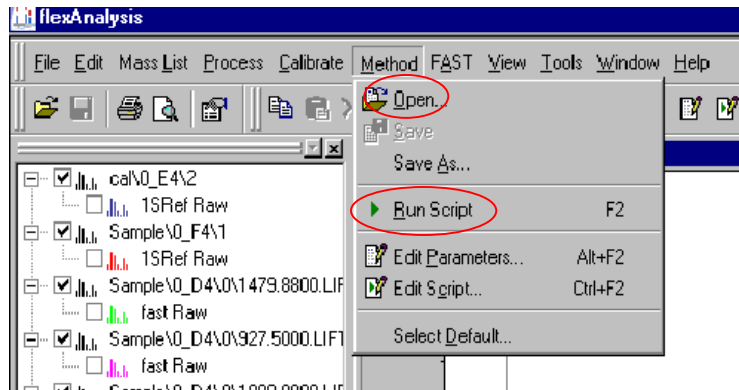
FlexAnalysis Methodには、
1. ピークピックの条件やキャリブレーションリスト等のパラメータ
2. 自動処理のためのスクリプト
が含まれています。

FlexControlでのSaveの時に・・・



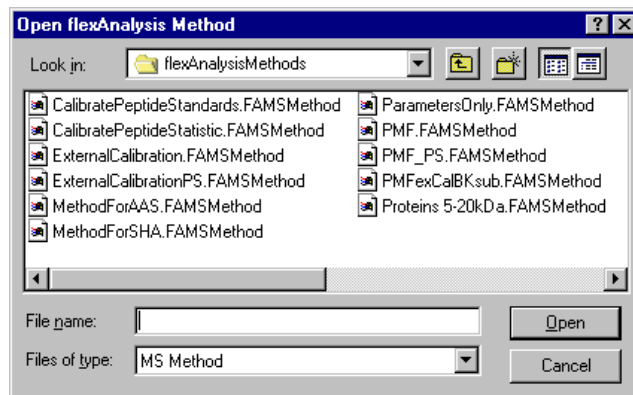
Process withに
FlexAnalysis Methodを設定
すると、
FlexAnalysisにデータが読
み込まれると同時に
Methodも読み込まれ、その
中に書き込まれている
パラメータ条件にそって、
スクリプトが実行されます。

もしくはFlexAnalysisで
Methodメニュー OpenでMethodを指定しおき・・・



Run Scriptを選ぶとスクリプトが実行されます。

メソッド選択画面



主に使用するのは・・・

PMF.FAMSMETHOD

質量数800～4000の中でピークピックを行います（SNAP）。

CalibratePeptideStandard.FAMSMETHOD

Peptide Calibration Standardのスペクトルに対して使用します。スペクトルの中からスタンダードのピークを探し、それを基にキャリブレーションを行います。その結果、計算された新しいキャリブレーション定数はFlexAnalysis内に保持されます。

ExternalCalibration.FAMSMETHOD

FlexAnalysis内に保持されているキャリブレーション定数をスペクトルに適用し、さらに質量数800～4000の中でピークピックを行います（SNAP）。

CalibratePeptideStandard.FAMSMETHODと
ExternalCalibration.FAMSMETHODはセットで使用します。

（使い方の例）

1．スタンダードのデータを測定し、

CalibratePeptideStandard.FAMSMETHODを設定して保存。

（その際、キャリブレーションの作業はしなくても良い）

2．そのデータをFlexAnalysisに読み込む

3．サンプルのデータを測定し、

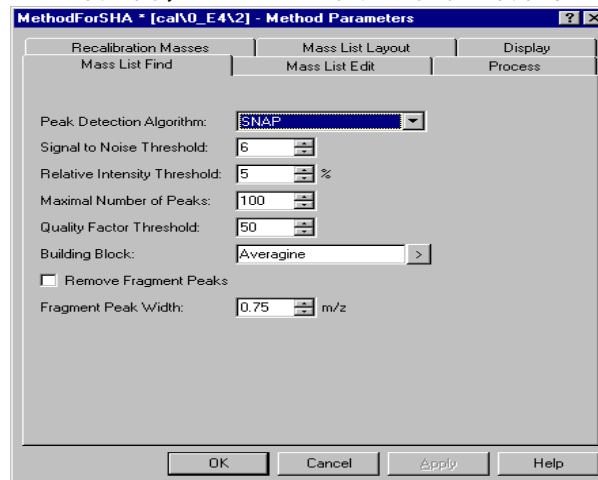
ExternalCalibration.FAMSMETHODを設定して保存。

4．そのデータをFlexAnalysisに読み込む。

5．3と4を繰り返す。

ピークピックの条件等の設定

Methodメニュー Edit Parameters



MS List FindとMass List Editでそれぞれ独立して条件を設定することが可能です。

ペプチドであればPeak Detection AlgorithmにSNAPを選択すると便利でしょう。同位体分布の形状を認識してMonoのピークのみをピックするアルゴリズムです。

Signal to Noise ThresholdはピックするピークのS/N比の下限の設定です。

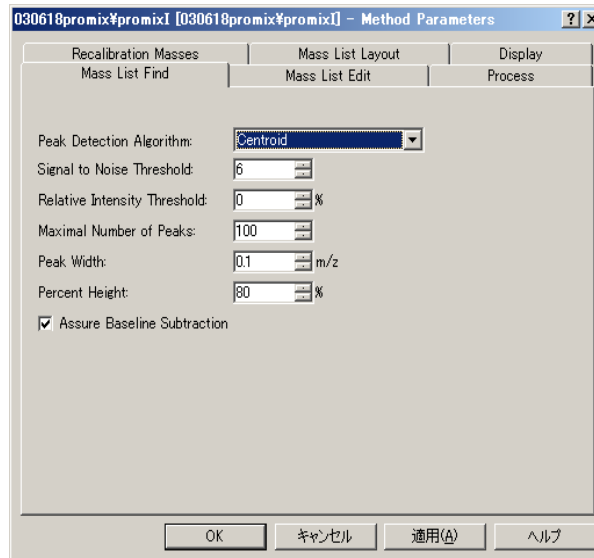
Relative Intensity Thresholdはピックするピークの強度の下限に関する設定で、スペクトル中で最大の強度を持つピークに対する%で指定します。

Maximal Number of Peaksはピックするピークの最大本数です。

Quality Factor ThresholdはSNAP固有のパラメータで、大きい値を入力する程、ピークの（同位体）形状が理論値とより一致していないとピックしなくなります。通常30～100程度で使用します。

設定をFlexAnalysisMethodの中に書き込む場合は、Methodメニュー Save As

Peak Detection AlgorithmにCentroid (ピークトップの重心をピックするアルゴリズム) を選択した場合は・・・



Signal to Noise ThresholdはピックするピークのS/N比の下限の設定です。

Relative Intensity Thresholdはピックするピークの強度の下限に関する設定で、スペクトル中で最大の強度を持つピークに対する%で指定します。

Maximal Number of Peaksはピックするピークの最大本数です。

Peak Widthは、おおよそ予想されるピーク幅です。大きすぎる数値に設定すると、小さなピークがノイズと判断されることがあります。(しきい値の設定ではありません)

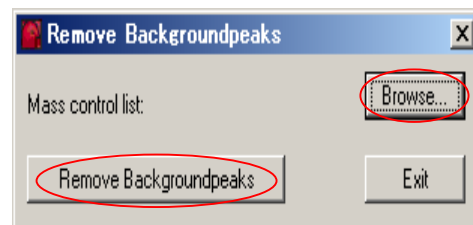
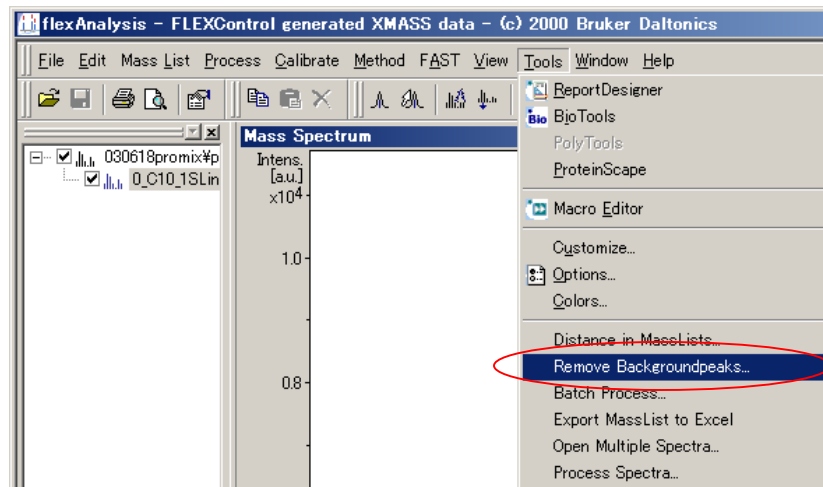
Percent HeightはCentroid固有のパラメータで、設定された値の分、ピークの下部が無視されます。すなわち例えば80%という設定であれば、ピークトップ20%で重心を計算し、そこをピックするという設定です。

Assure Baseline Subtractionにチェックを入れておくと、ピークピック時に自動でベースライン補正が行われます。

バックグラウンドピークのコントロール

PC内にバックグラウンドピークとして登録されている質量数のピークからピックを取り消す機能です。

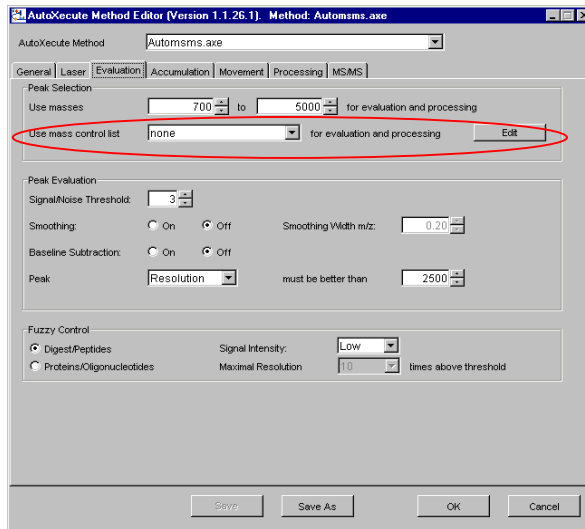
Toolsメニュー Remove Backgroundpeaks



Browseでコントロールリストのファイルを選択し、Remove Backgroundpeaksをクリックします。

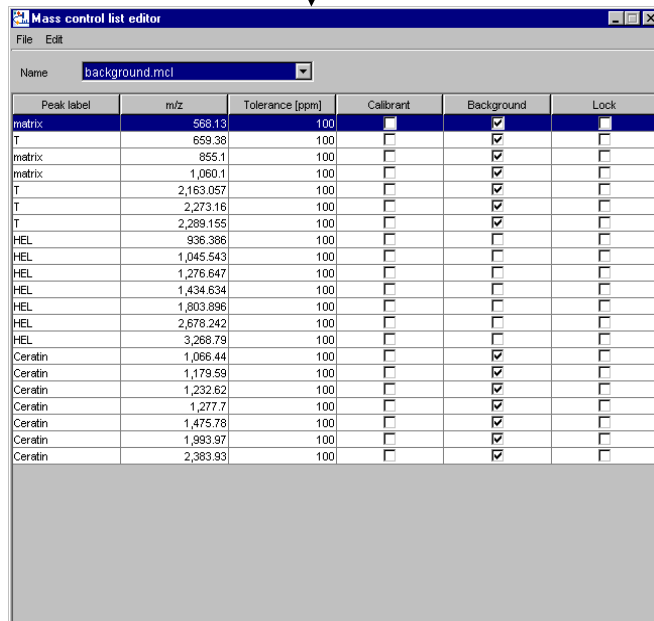
バックグラウンドリストの編集

FlexControl/AutoXecuteタブ Edit Evaluationタブ



5. ウィンドウを閉じる
(Cancelをクリック)

Use mass control listでリストを選択 Edit



1. 行を追加 (Editメニュー New peaks)

2. 名前・質量数・誤差範囲を設定

3. Backgroundにチェックを入れる

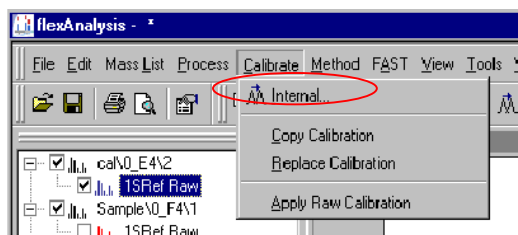
4. 保存 (Fileメニュー Save)

5. 閉じる (Fileメニュー Exit)

FlexAnalysisでのキャリブレーションについて

FlexAnalysisでキャリブレーションを行うことも可能です。
これはFlexControlでのキャリブレーションとは独立したものです。

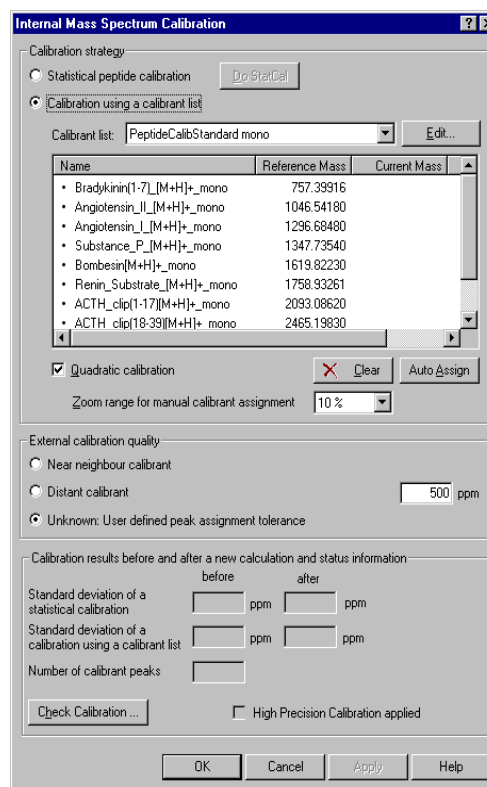
Calibrateメニュー Internal



基本的な操作はFlexControlと同じ。
「キャリブラントの名前を選択し、
そのピークを選択」を繰り返し、
ApplyもしくはOKをクリックします。

Calibrant Listを編集する場合は
Editをクリックするとエディタが
起動します。

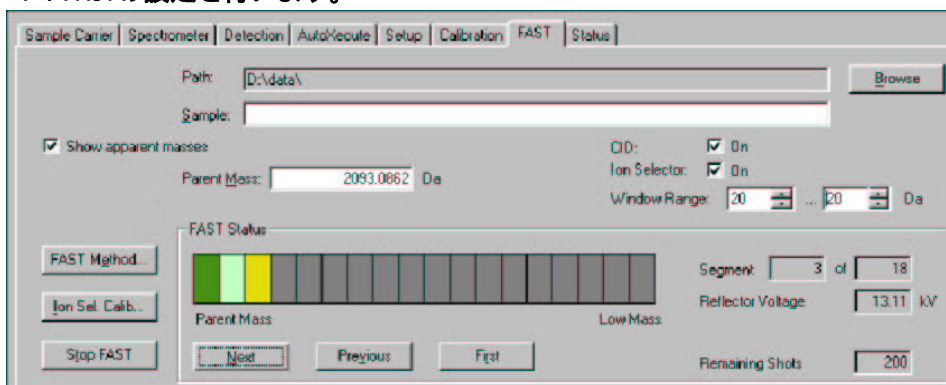
フォーマットは
名前 タブorスペース 質量数
(#はコメントアウト)
です。
編集後、保存してエディタを終了
します。



FAST測定

FAST (PSD) は通常のMS測定に比較すると感度が低い測定です。
MS測定で得られたピークの内の一つを選択して測定をすることになりますが、基本的には「なるべく」一番シグナル強度が高く、かつ近接して他のピークがないものを選択します。

1. FlexControl MethodにFAST用メソッド (FAST.psm等) を選択します。
2. スタンドを測定して、キャリブレーションを行います。
(その際、イオンセクタをoffにする必要があります。下図)
3. そのままサンプルを試測定して、目的のシグナルが現れることを確認。
4. FASTの設定を行います。



- (i) あらかじめデータをセーブする場所と名前を入力します。()
- (ii) FASTの測定をする親イオンの質量数を入力し、Enterキーを押します。()
(入力されると、全部でいくつのセグメントが必要かが に表示され、 が分割されます。)
- (iii) イオンセクターのチェックを外し、offにします。()
- (iv) 試測定をして任意のシグナルがきれいにセレクトされているかチェックします。
- (v) 必要に応じてWindow Rangeを調整します。入力欄が2つありますが、左側が低質量数側、右側が高質量数側に向かってParentMassの質量数からセレクトのウインドウを開けるという設定です。目安は親イオンの質量数の1%+数Daです。数値を大きくし過ぎると近接したピークも同時にセレクトされますし、小さくしすぎると親イオンのピーク強度・分解能低下やマスズレを起こしますので、試測定しながら最適な値を探すと良いでしょう。

5. 測定を始めます。

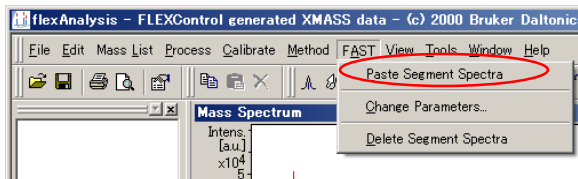
イオンセクタの調整に問題が無ければ測定を始めます。
イオンを解裂させるためにレーザーパワーを通常より5~10%程度(目安です。サンプルによって大きく異なる場合もあります)高い状態で測定を行い、Addボタンで積算を重ねます。フラグメントイオンのピークがなるべくきれいに測定できるようにレーザーパワー、レーザーの照射位置、検出器の感度(Detector Gain)を調整しながら測定すると良いでしょう。

Remaining Shots () が0になるまで測定・Addを続けると、Next () が緑色になり、次のセグメントへ移るように促されます。クリックすると次の測定のための準備(Save、Clear SumおよびReflector電圧調整)がされますので、続けて次のセグメントの測定を行います。ただし、これは飽くまで目安ですので、スペクトルのクオリティー(主にS/N比)が十分であれば、 が0になる前にNextをクリックすることも可能ですし、逆に0になった後も積算を重ねることも可能です。スペクトルのクオリティーが十分と判断された時点で次のセグメントへ進むようにします。

最後のセグメントまで進むと、NextボタンがFinishに変わっていますので、クリックするとこれで終了とのウインドウが現れますので、OKをクリックして測定終了です。

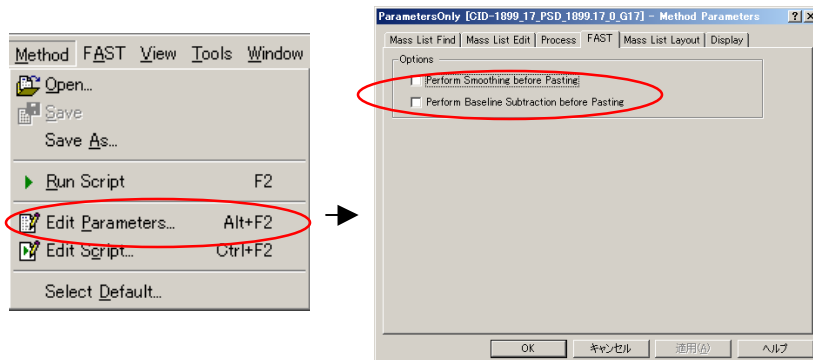
6. スペクトルを一枚につなぎ合わせます（ペースト）。

スペクトルの一枚目（1SRef）をFlexAnalysisに読み込み（自動で全セグメントが読み込まれます）、FASTメニューのPaste Segment Spectraを選択すると、ペーストが行われます。



ペーストと同時にベースライン補正・スムージングを行う場合・・・

Methodメニューの中のEdit Parametersを選択して現れるウィンドウでFASTタブを選択し、Perform SmoothingおよびPerform Baseline Subtractionにチェックを入れます。



ベースライン補正・スムージングとも使用するとスペクトルが見やすくなる傾向がありますが、小さなピークがつぶれてしまう可能性もありますので注意が必要です。