

# Skyline 针对 MS1 筛选的 DDA 搜索

---

Skyline 靶向质谱环境能直观呈现导入 Skyline 文档的原始质谱仪数据信息。借助这些可视化功能，您可以执行各种操作，如优化所测肽段和离子对以及调整整合边界等来对数据加以处理。最初开发 Skyline 的目的是利用选择反应监测（简称 SRM，亦称为多反应监测（简称 MRM））质谱进行定量分析，现在它的应用范围已经扩大到，从数据依赖型串联质谱所获得的质谱数据的 MS1 谱图中，去提取时间-强度色谱峰来用于肽段定量实验。

Skyline MS1 全扫描筛选支持导入，探索性蛋白质组学实验中，使用数据依赖采集 (DDA) 模式获得的数据集。导入原始数据后，使用 Skyline 新开发的和原有的功能，可以协助定量测量来自于多次重复测定采集的，肽段母离子 MS1 信号。鉴于 Skyline 出色的数据可视化图，这种模式也可用于可视化以及更好地理解，来自于其它“非标记”定量工具的定量结果。

本教程将介绍以下几个重要方面，在您想要使用 Skyline 来对 DDA 数据中的 MS/MS 谱图进行肽段谱图匹配时，这几个方面对有效利用 Skyline MS1 筛选至关重要：

- 设置一个用于 MS1 筛选的 Skyline 文档
- 对原始数据执行 DDA 搜索以寻找潜在定量目标

Skyline 旨在为靶向蛋白质谱研究提供一种独立于供应商的平台。它可以导入来自于供应商 Agilent、Bruker、SCIEX、Shimadzu、Thermo-Scientific 和 Waters 的原始数据用于 MS1 筛选，这样一来，您就可以将在 Skyline 获得的专业知识，转移到任何一家有着以上供应商质谱仪的质谱实验室。

## 入门指南

要开始本教程，请下载下列 ZIP 文件：

<https://skyline.ms/tutorials/DdaSearchMS1Filtering.zip>

将文件解压到您电脑上的某个文件夹，比如：

C:\Users\brendanx\Documents

该操作将创建一个新文件夹：

C:\Users\brendanx\Documents\DdaSearchMS1Filtering

如果您在开始学习本教程之前就一直在用 Skyline，最好将 Skyline 恢复为默认设置。要恢复默认设置：

- 启动 Skyline。

- 在**起始页**上单击**空白文档**，显示如下：

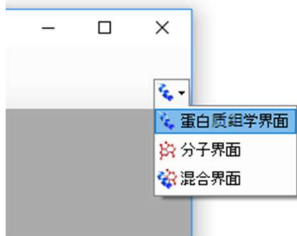



- 在**设置**菜单中单击**默认值**。
- 在询问您是否保存当前设置时，单击表单上的**否**。

该 Skyline 实例中的文档设置现已重置为默认值。

由于本教程涵盖蛋白质组学主题，因此您可以执行以下操作来选择蛋白质组学界面：

- 单击 Skyline 窗口右上角的用户界面控件，然后单击类似如下的**蛋白质组学界面**：



Skyline 将在蛋白质组学模式下运行，Skyline 窗口的右上角  随之显示蛋白质图标。

您可以用多种方法开始编辑空白文档，但在本教程中，您将使用一组按序排列的表单（即“向导”），它将引导您逐步经历几个步骤：搜索质谱仪数据依赖采集 (DDA) 数据文件、设置目标以及导入这些文件中的色谱图。

在开始 DDA 搜索之前，需要更改 Skyline 默认使用的内标。

- 在**设置**菜单中单击**肽段设置**。
- 单击**修饰**选项卡。
- 将**内标类型**设置为“无”。

“肽段设置”表单现在应如下所示：

肽段设置

酶解 预测 过滤器 库 修饰 定量

结构修饰(S):

Carbamidomethyl (C) 编辑列表(E)

最大可变修饰数(M): 3 最大损失(L): 1

同位素标记类型(I): heavy

同位素修饰(I): 编辑列表(I)

内部标准类型(N): 无

确定 取消

- 单击肽段设置表单中的确定按钮。图中内部标准改为内标

## 搜索 DDA 文件，将肽段载入 Skyline 文档

您可以使用导入肽段搜索向导，对 DDA 数据文件中的 MS/MS 谱图进行肽段搜索。

首先执行以下操作以保存您的新文档：

- 单击工具栏上的保存按钮 (Ctrl-S)。
- 导航到您为本教程创建的 DdaSearchMS1Filtering 文件夹。
- 在文件名字段中，输入“DdaSearchMS1FilteringTutorial.sky”。
- 单击保存按钮。

现在按下面的指示启动**导入肽段搜索**向导：

- 在**文件**菜单中选择**导入**，然后单击**肽段搜索**。

Skyline 将呈现如下所示的表单：

**构建**选项适用于 DDA 搜索引擎的输出（如 Comet 的 pepXML 文件，Mascot 的 .dat 文件），**执行 DDA 搜索**选项应用于原始数据（如 RAW、WIFF、\*.d、mzML、mzXML）。本教程中的 mz5 文件为中心对齐数据，目的是提供比质谱仪产生的原始 Thermo RAW 文件更快的下载速度。

执行以下操作，将所包含的 DDA mz5 文件添加到搜索中：

- 单击**执行 DDA 搜索**单选按钮。
- 单击**添加文件**按钮。

- 选择您为本教程创建的 DdaSearchMS1Filtering 文件夹中的所有 mz5 文件。
- 单击**打开**按钮。

此时向导表单将显示如下：

导入肽段搜索

谱图库

构建(B)     使用现有(U)

截止得分(C):  
0.95

起始于(M):  
DDA 原始(搜索和构建库)

要搜索的文件(F):

- QE\_140221\_01\_UPS1\_100fmspiked.mz5
- QE\_140221\_02\_UPS1\_300fmspiked.mz5
- QE\_140221\_03\_UPS1\_600fmspiked.mz5

添加文件(A)

删除文件(D)

iRT 标准肽段(I):  
无

包含不确定匹配项(O)

工作流程

含有 MS1 筛选器的 DDA

DIA(数据非依赖性采集)

PRM

完成(F)    下一步(N) >    取消

- 单击**下一步**按钮。

此时将显示一个表单，询问您如何处理这三个 mz5 文件的共有前缀：

导入结果

您所选择的文件含有共同前缀和后缀。  
您希望删除某些或所有此前缀或后缀以便缩短用于 Skyline 的名称吗？

请勿删除

删除(R)

相同前缀(C):  
QE\_140221\_0

相同后缀(S):  
spiked.mz5

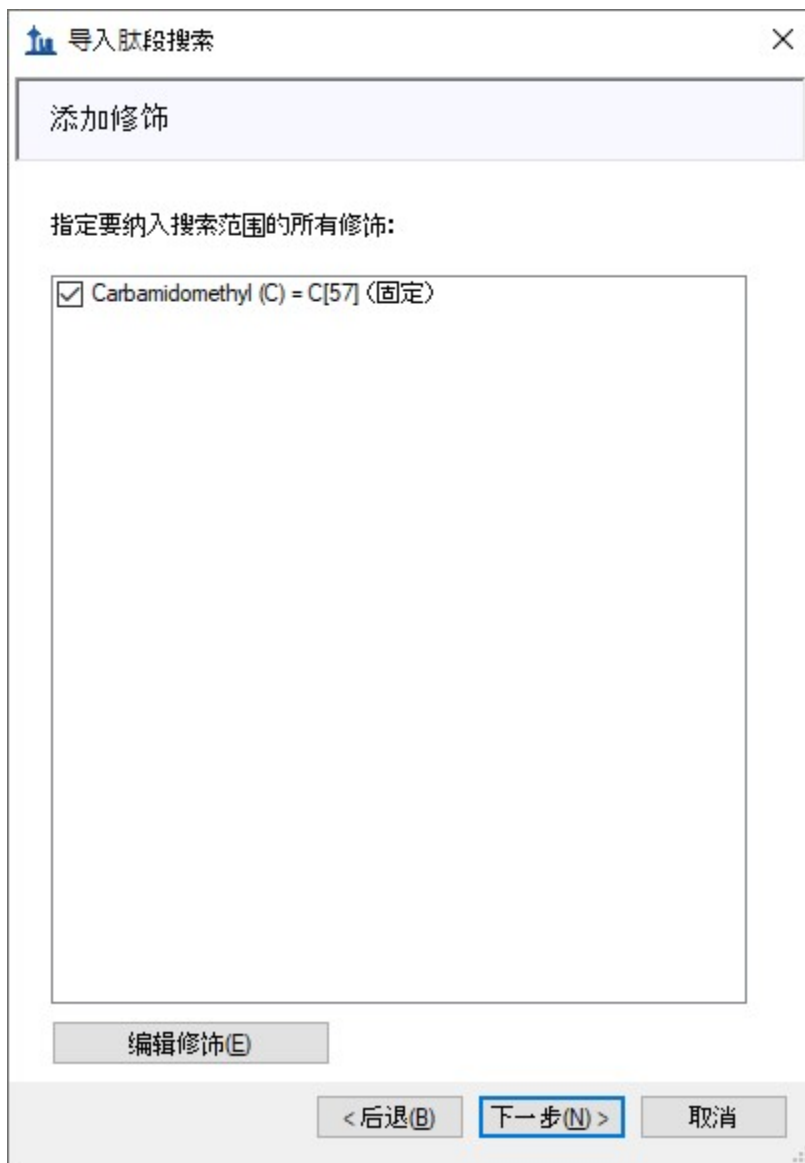
重复测定名称(N):  
1\_UPS1\_100fmol  
2\_UPS1\_300fmol  
3\_UPS1\_600fmol

确定 取消

- 单击**确定**按钮。

向导继续前进至**添加修饰**页面，其中列出了此文档中您可能希望包含在 DDA 搜索中的所有氨基酸修饰。这里务必区分固定修饰和可变修饰：固定修饰（有时称为静态修饰）总是应用于指定的氨基酸。例如，Carbamidomethyl C（氨基甲酸甲酯 C）通常视为固定修饰，因为数据中的所有半胱氨酸都会烷基化。Oxidation M 几乎总是视为可变修饰，因为氧化与否，具体取决于样品的处理情况。Skyline 搜索时总是将同位素标签作为变量处理，但是您可以单击**编辑修饰**按钮，来更改其它修饰是作为固定修饰还是可变修饰。

您也可以从本页面向文档中添加修饰。由于此文档被重置为默认值，所以列表中只以 Carbamidomethyl (C) 开始：



这些数据有 SILAC 标签，这里需要添加重标签修饰。添加步骤如下：

- 单击**编辑修饰**按钮。
- 单击**编辑重修饰**菜单选项。
- 单击**同位素修饰**列表旁边的**编辑列表**按钮。
- 单击**编辑同位素修饰**表单中的**添加**按钮。
- 在**编辑同位素修饰**表单的**名称**字段中输入“Label:13C(6)15N(2) (C-term K)”。
- 单击**名称**字段右侧的向下箭头，然后单击同名的项目。随即会从 Unimod 填充特异性和组成字段。

此时编辑同位素修饰表单应显示如下：

编辑同位素修饰

名称(N):  
Label:13C(6)15N(2) (C-term K)

氨基酸(A): K  
末端(T): C

化学式(C)

13C  15N  18O  2H

单同位素质量(M): 8.014199  
平均质量(A): 7.941847

相对保留时间:  
匹配

确定  
取消

- 单击**确定**按钮

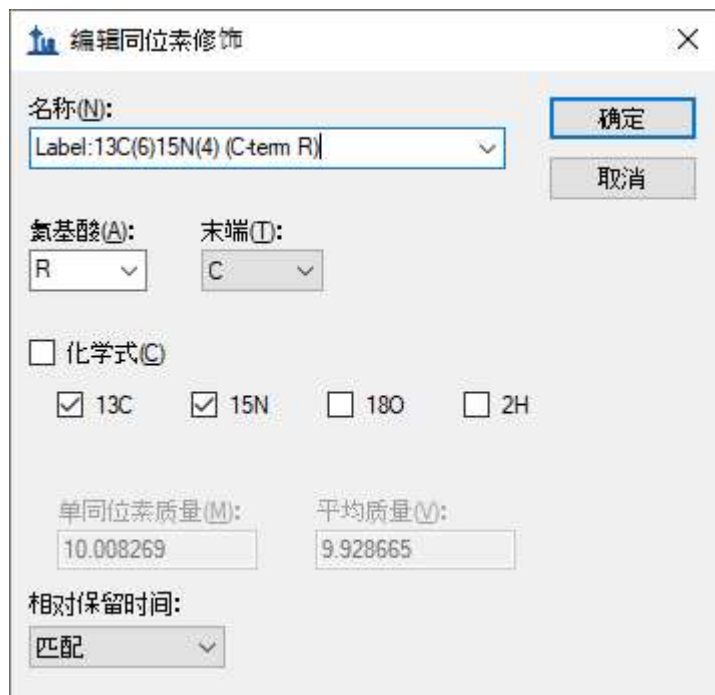
执行以下步骤以添加第二个同位素修饰：

- 单击**编辑同位素修饰**表单中的**添加**按钮。
- 从**编辑同位素修饰**表单的**名称**下拉列表中选择“Label:13C(6)15N(4) (C-term R)”。

软件将自动选中 **13C** 和 **15N** 复选框，以告知 Skyline 对总质量偏移为 10 Da ( $6 \times {}^{13}\text{C} + 4 \times {}^{15}\text{N}$ ) 的精氨酸分子中的所有碳原子使用  ${}^{13}\text{C}$ ，所有氮原子使用  ${}^{15}\text{N}$ 。



此时编辑同位素修饰表单应显示如下：



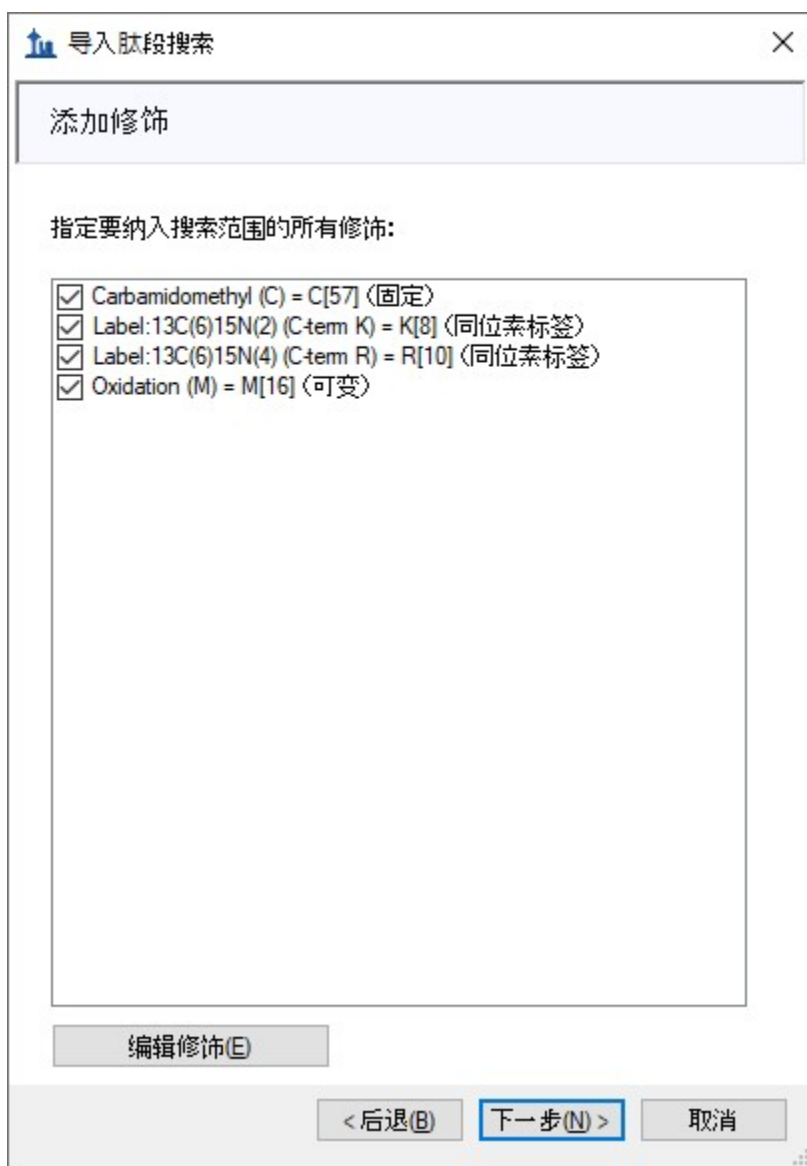
Skyline 自动计算单一同位素质量和平均质量偏移，例如，当这些氨基酸残基中使用了  $^{13}\text{C}$  和  $^{15}\text{N}$  时，赖氨酸 (K) 质量偏移约为 8 Da，精氨酸 (R) 约为 10 Da。要完成添加重修饰：

- 单击编辑同位素修饰表单中的确定按钮。
- 单击编辑同位素修饰表单中的确定按钮。
- 选中添加修饰列表中您刚创建的“Label:13C(6)15N(2) (C-term K)”和“Label:13C(6)15N(4) (C-term R)”修饰对应的复选框。

现在您将添加 Oxidation (M) 作为结构修饰：

- 单击编辑修饰按钮。
- 单击编辑结构修饰菜单选项。
- 单击同位素修饰列表旁边的编辑列表按钮。
- 单击编辑结构修饰表单中的添加按钮。
- 在编辑结构修饰表单的名称字段中输入“Oxidation (M)”。
- 单击名称字段右侧的向下箭头，然后单击同名的项目。随即会从 Unimod 填充特异性和组成字段。
- 单击编辑结构修饰表单中的确定按钮。
- 单击编辑结构修饰表单中的确定按钮。
- 在添加修饰列表中为您刚刚创建的“Oxidation (M)”修饰选中相应的复选框。
- 还要确保选中“Carbamidomethyl (C)”对应的复选框，因为在您选择默认设置的情况下它应处于选中状态。

这时的**添加修饰**页面应如下所示：



- 单击**下一步**按钮。

向导将前进至**配置全扫描设置**页面。

- 在**质量准确度**字段中输入“20”。

本页面中的其它字段应默认为可用于本教程的值，向导显示如下：

The screenshot shows a dialog box titled '导入肽段搜索' (Import Peptide Search) with a close button (X) in the top right corner. The main section is '配置全扫描设置' (Configure Full Scan Settings). It contains the following fields and options:

- 母离子电荷: 2
- MS1 筛选(M):
  - 同位素峰包含(I): 计数
  - 母离子质量分析仪(P): Centroided
  - 峰(K): 3
  - 质量准确度(A): 20 ppm
- 使用高选择性提取
- 保留时间筛选:
  - 仅使用 MS/MS ID 5 分钟之内的扫描
  - 包含所有匹配的扫描

At the bottom, there are three buttons: '< 后退(B)' (Back), '下一步(N) >' (Next), and '取消' (Cancel). The 'Next' button is highlighted with a blue border.

- 参见 [MS1 全扫描筛选教程](#)（第 9 页）以了解有关这些设置的更多信息。
- 单击下一步按钮。上图中 Centroided 可翻译为中心对称的

随即会进入导入 FASTA 页面。在本教程中，您将使用一个人类蛋白质的 FASTA 文件，并且来自 Sigma-Aldrich 的通用蛋白质组学标准 (UPS) 序列，将附加在顶部（这样 Skyline 就会对 UPS 和非 UPS 蛋白质之间共有的任何肽段使用这些检索号）。要选择 FASTA：

- 单击浏览按钮。
- 从为该教程创建的文件夹中选择“2014\_01\_HUMAN\_UPS.fasta”文件。
- 单击打开 FASTA 表单中的打开按钮。

此时向导将显示如下：

- 单击下一步按钮。

向导将前进至**调整搜索设置**页面。在这里您可以为 DDA 搜索设置最重要的参数。对于本教程，请执行以下操作：

- 在 **MS1 耐受性** 字段中输入“5”。（请注意，在您退出该文本框时，表单会认为您指的是 ppm，并相应设置单位框）。
- 在 **MS2 耐受性** 字段中输入“10”。

该表单现在应显示如下：

导入肽段搜索

调整搜索设置

搜索引擎(S):  
MSAmanda

MS1 耐受性(Q): 5 单位: ppm

MS2 耐受性(Q): 10 单位: ppm

碎片离子(E):  
b, y

MS2 分析仪(A):  
Default

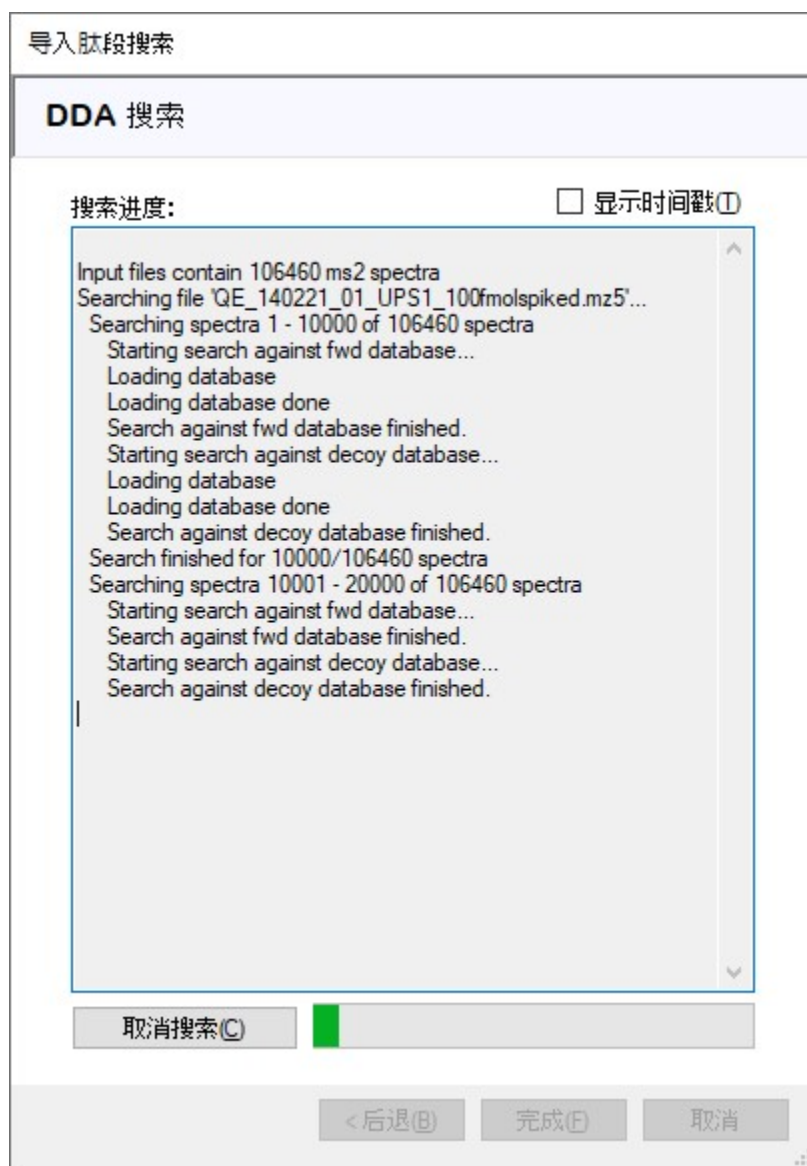
最大可变修饰数(V):  
3

其他设置(O)

< 后退(B) 下一步(N) > 取消

- 单击**下一步**按钮开始搜索。
- 注意：此图与英文版的配图有所区别，此图中有 MS2 分析仪：Default

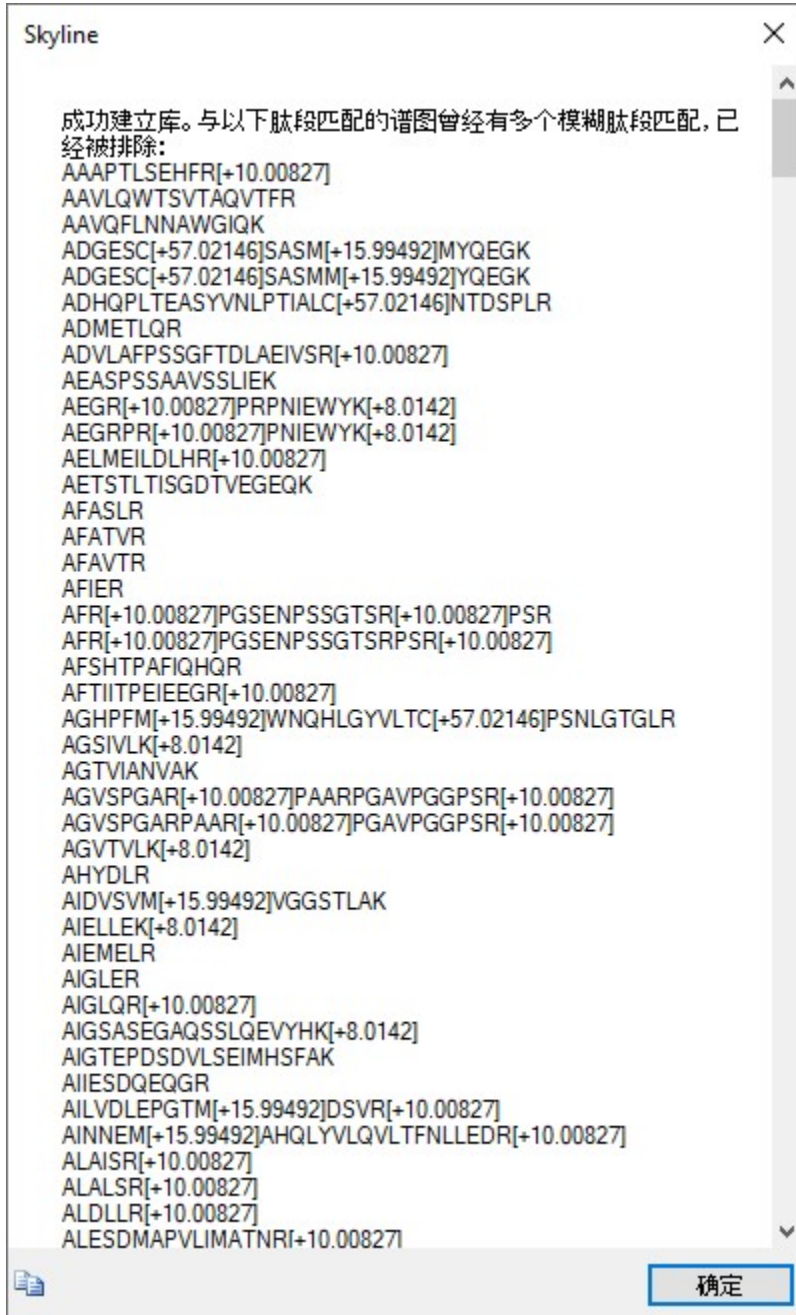
DDA 搜索页面将显示搜索进度。您也可以单击该页面的**取消搜索**按钮来取消搜索。



搜索结束后:

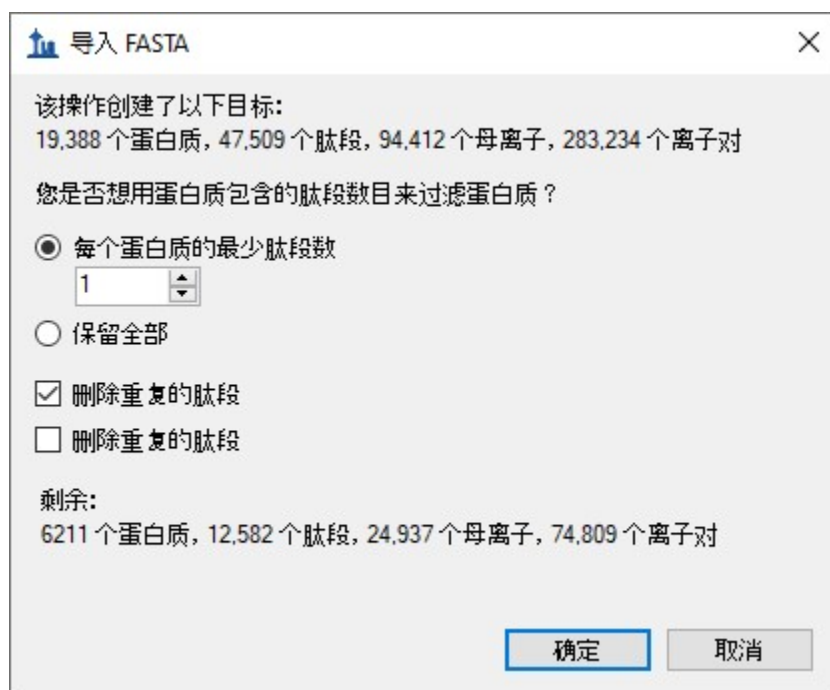
- 单击**完成**按钮。

Skyline 将开始根据搜索结果构建谱图库。完成谱图库构建后，将弹出一个消息框，提醒您有些谱图可能被解读为多个置信水平相同的不同肽段，并且这些肽段将被忽略：



- 单击**确定**按钮关闭此消息。

然后 Skyline 开始将该库导入您的文档。导入完成后，会提示您设置此文档中包含蛋白质的条件：



- 选中**删除重复的肽段**复选框（即保留第一次出现的非唯一肽段）。
- 单击**确定**按钮。

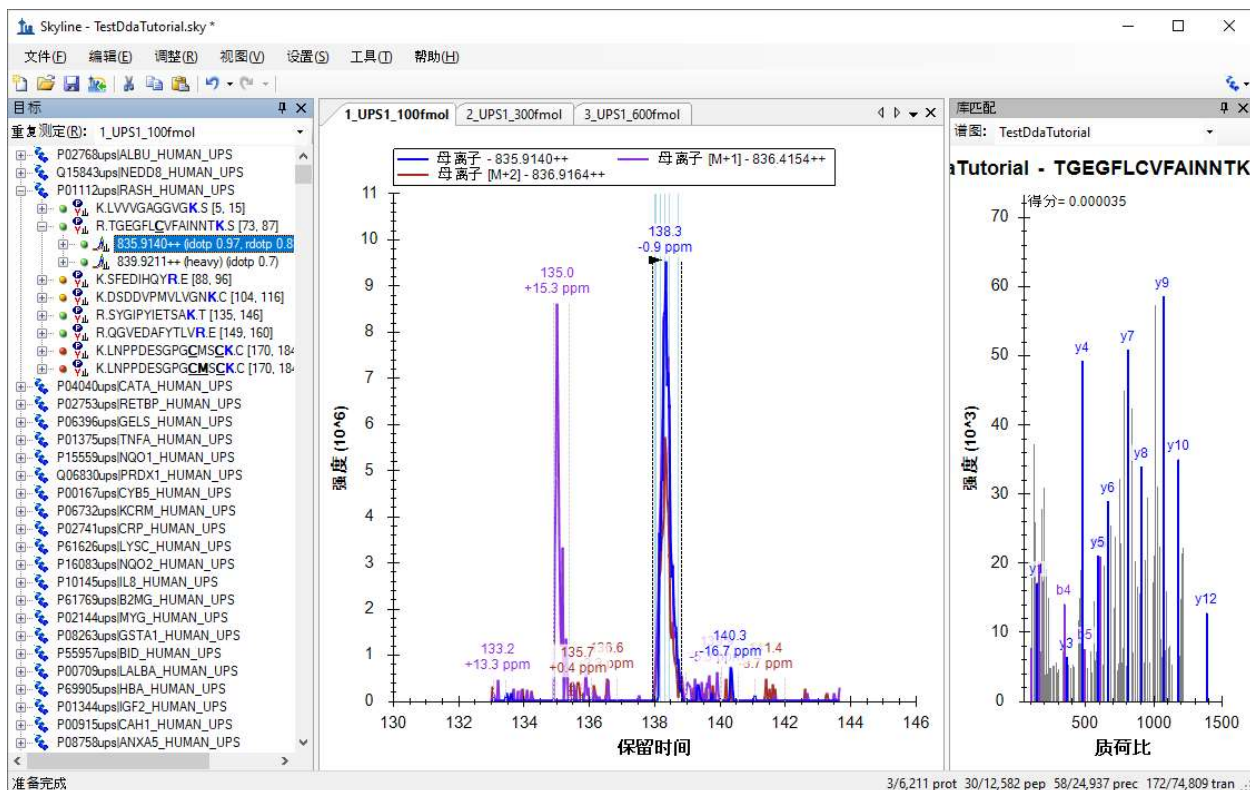
## 配置 Skyline 以查看导入的数据

蛋白质导入文档后，您会看到 Skyline 主窗口，其中**目标视图**的顶部为 UPS 蛋白质。您应当会看到那里有 **6,025** 个蛋白质（在状态栏中计数）。Skyline 也将开始提取色谱图，并在**导入结果**表单中显示进度。您可以等待几分钟直至色谱图提取完成，或者在导入期间继续执行最后一步除外的所有步骤。

- 单击第三个蛋白质 P01112ups|RASH\_HUMAN\_UPS 旁边的 [+] 图标。
- 单击该蛋白质的第二个肽段 R.TGEGFLC**V**FAINNTK.S 旁边的 [+] 图标。（注意，英文版中 the third peptide, also should be the second peptide, according to the figure below）
- 单击该肽段第一个母离子 835.9140++，会出现该母离子的色谱图和该肽段的 MS/MS 谱图。（请注意，肽段序列中粗体显示且加下划线的“**C**”残基表示脲甲基半胱氨酸）。
- 如果您未看到 MS/MS 谱图，请在**视图菜单**上单击**库匹配**。
- 如果您在**库匹配**视图中未看到如下图所示的尽可能多的注释峰，请在**视图菜单**上选择**离子类型**，并选中 **B** 和 **Y**。
- 如果您未看到肽段的整个色谱图，在**视图菜单**上选择**自动缩放**，并单击**无** (Shift-F11)。
- 右键单击色谱图，选择**肽段 ID 时间**，并单击**已校准**（如果未选中）。



Skyline 窗口应显示如下：



现在文档已通过所导入的三项 DDA 运行完成了 MS1 筛选的全部配置。由于在导入向导中选择了仅使用 MS/MS ID 5 分钟之内的扫描设置，本视图中的色谱图长度约为 10 分钟（133 至 143 分钟）。请注意，在为 MS1 筛选进行 Skyline 文档设置时，您将在由三重四级杆 SRM 实验所产生的子离子离子对（例如 y-离子）的地方，看到不同的母离子同位素峰值，例如对于肽段 TGEGFLCVFAINNTK，会显示这些母离子同位素峰值：母离子 - 835.914++、母离子 [M+1] - 836.4154++ 和母离子 [M+2] - 836.9164++。

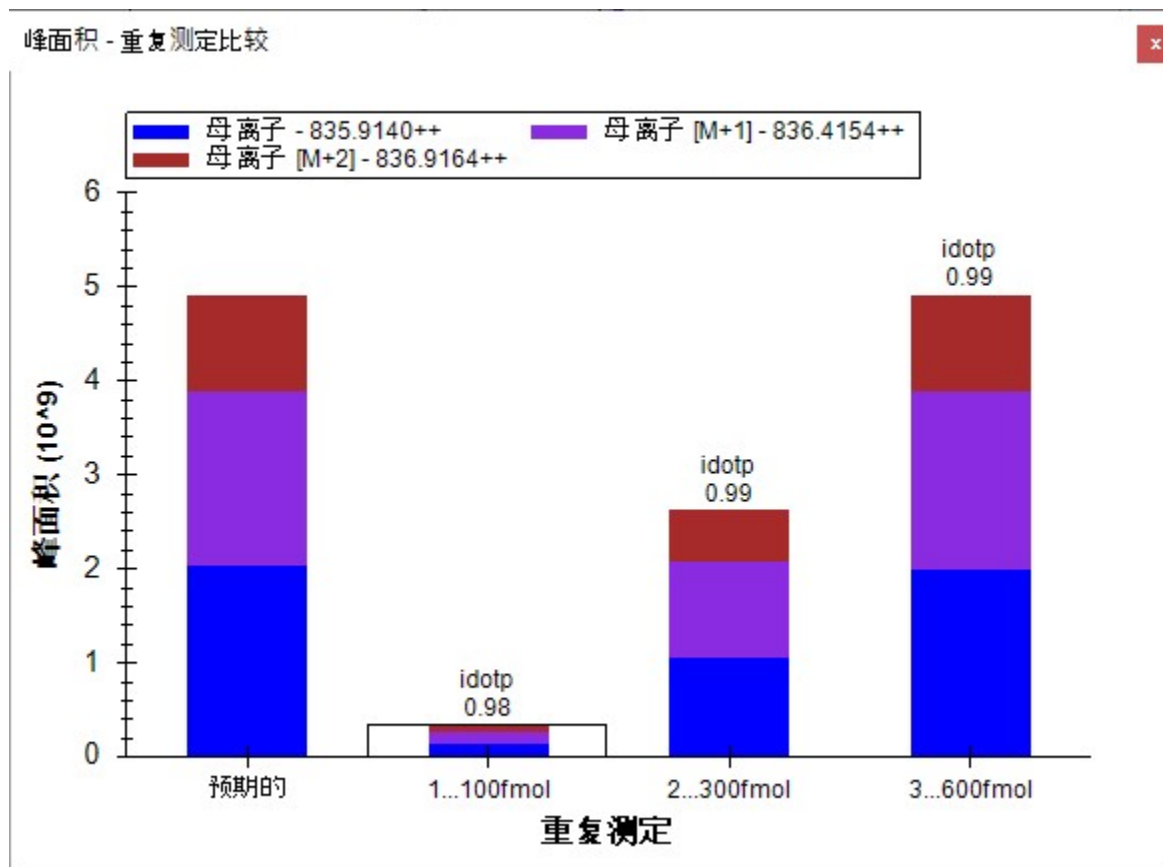
要配置一些在一般情况下有用的其它功能，尤其是可视化某些 MS1 筛选数据，请执行下列步骤：

- 在设置菜单上，确保选中**全部整合**。

这样的操作会告知 Skyline 将一个峰组内的所有色谱图（此处为母离子 M、M+1 和 M+2）整合在一起，无论这些峰看起来，是否与数据中的最大峰共洗脱。它不再像以前那样影响整合的峰面积。

- 在视图菜单中选择**峰面积**，然后单击**重复测定比较**。

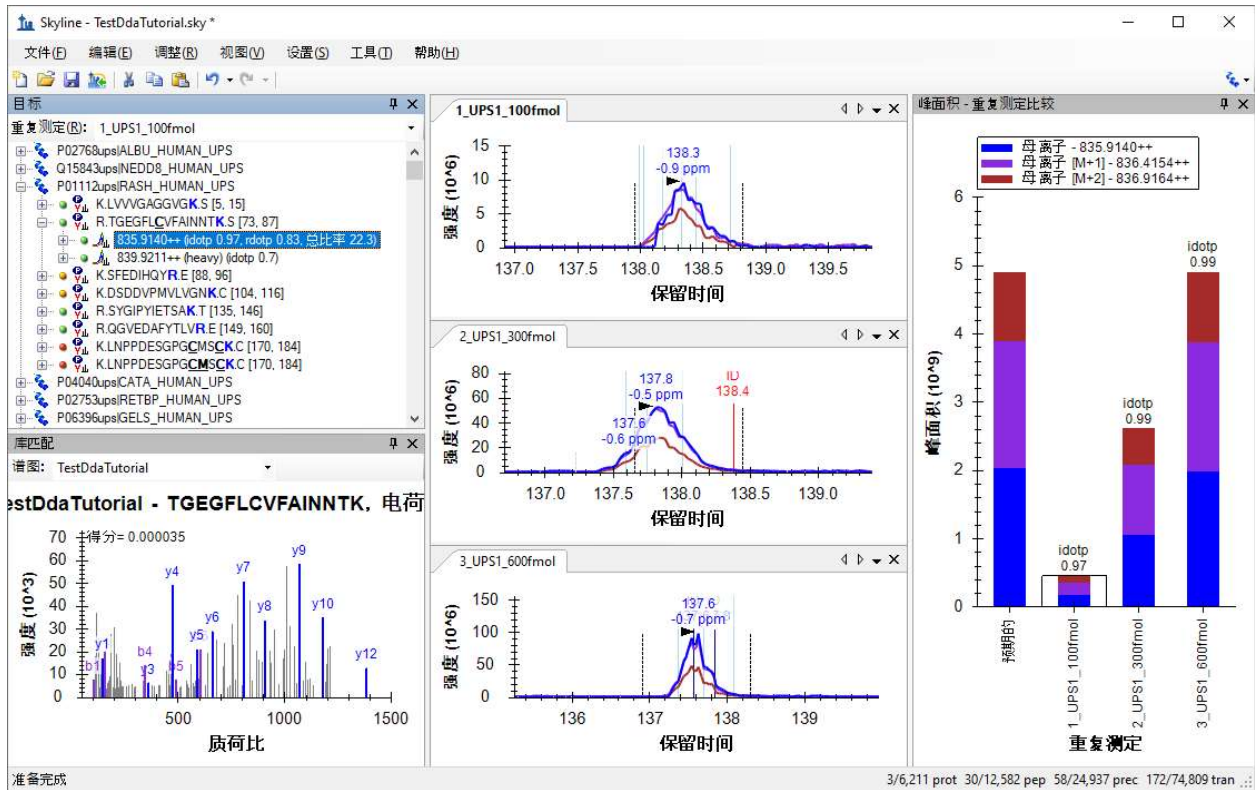
此时应当会出现一个包含下图的窗口：



您可以通过下列操作将**峰面积**窗口停靠在您需要的位置：

- 单击并按住鼠标左键，然后拖动，直到鼠标光标位于**库匹配**视图上方。
- 当出现 5 个十字形图标时，将鼠标移到下方图标处并松开鼠标左键，Skyline 窗口右侧的空间，在**库匹配**和**峰面积**视图之间，就会划分出不同的数据视图。
- 按照同样的操作将**库匹配**视图移到**目标**视图下方。
- 在**视图**菜单上选择**自动缩放**，然后单击**最佳峰值 (F11)**。
- 在**视图**菜单上选择**排列图形**，然后单击**列**。
- 右键单击色谱图，并单击**图例**，关闭色谱图中的图例。

现在 Skyline 窗口应显示如下:



此后您可以查阅 [MS1 全扫描筛选教程](#), 来了解有关 DDA 数据处理的更多信息。