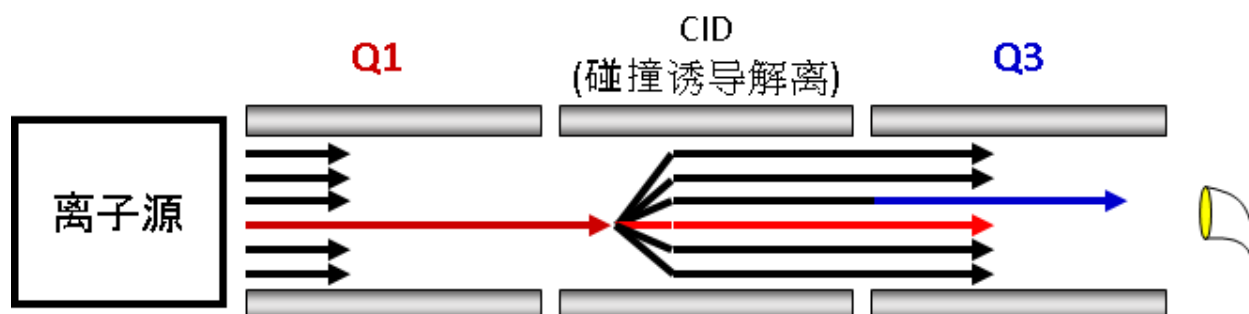


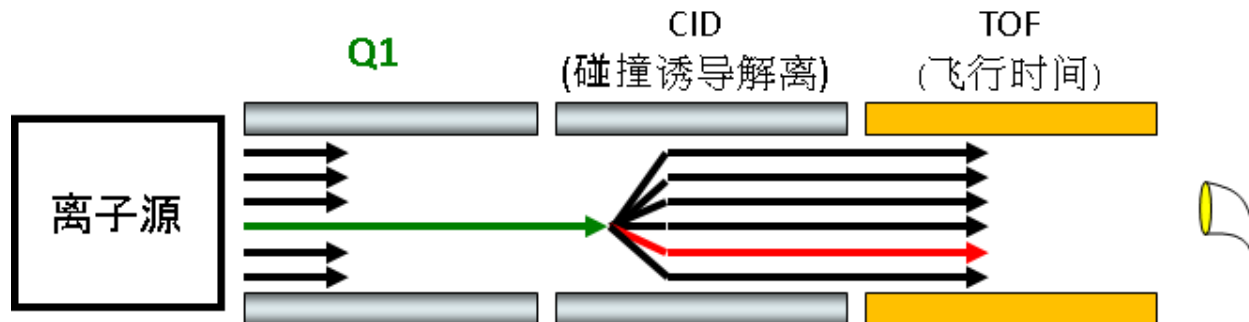
Skyline 平行反应监测

Skyline 支持从多种全扫描质谱仪（如离子阱、Orbitrap 和 Q-TOF 仪器）的原始数据文件中提取基于色谱峰的定量测定方法。无论是对于六大质谱仪供应商（Agilent、Bruker、SCIEX、Shimadzu、Thermo-Scientific、Waters）的高分辨率质谱仪还是低分辨率质谱仪，Skyline 都支持灵活使用这些分析方法。

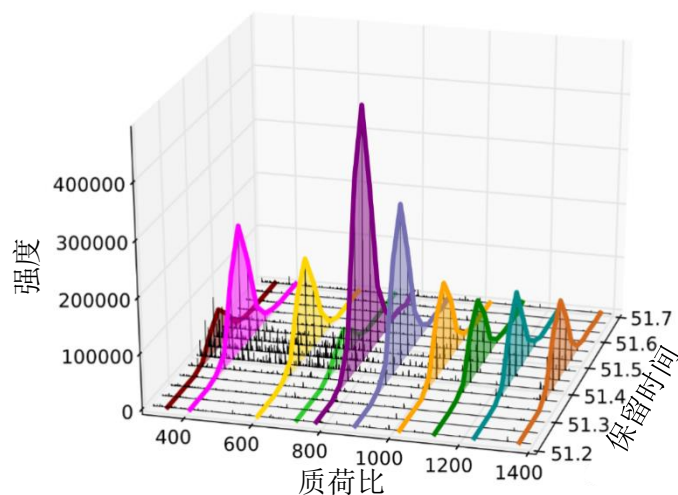
在本教程中，您将学习如何使用 Skyline 分析采用靶向方法采集的串联质谱，这种方法叫做平行反应监测 (PRM)，亦称伪 SRM 和 MRM-HR™。顾名思义，PRM 是一种与 Skyline 最初在三重四级杆质谱仪中采用的 SRM 非常相似的全扫描方法：



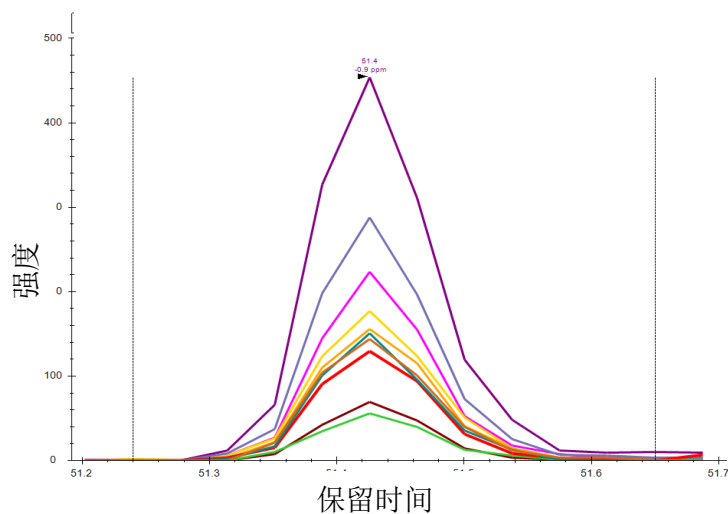
与 SRM 扫描母离子和子离子对并分别采集它们在一个周期中的强度相似，PRM 则扫描非数据依赖型母离子列表并采集其在一个周期中的完整串联质谱。



Skyline 对以这种方式采集的完整质谱进行提取，来获得时间-强度色谱图。



由此产生的色谱图提供的定量数据，与目前在 Skyline 用户界面进行的三重四级杆 SRM 实验数据类似。



当类似仪器上的时间不可选时，PRM 可作为三重四级杆的替代。即便如此，这种高分辨率串联质谱相比传统 SRM 在选择性上有优势，并且可以在肽段搜索中处理所收集的扫描，以帮助验证整合的色谱峰。PRM 还可以用于多种全扫描仪器，即便主要用于肽段谱图匹配管道的串联质谱谱图数据依赖采集 (DDA) 时，也同样适用于各种系统。这种无 ID 的质量控制方法将专门在一篇教程中进行介绍。本教程将探讨 PRM 在低分辨率 Thermo LTQ 和高分辨率 Agilent Q-TOF 上进行靶向定量测定的用法。

入门指南

开始本教程之前，请下载下列 ZIP 文件：

https://skyline.gs.washington.edu/tutorials/TargetedMSMS_2.zip

将其中的文件解压到您的电脑文件夹，如：

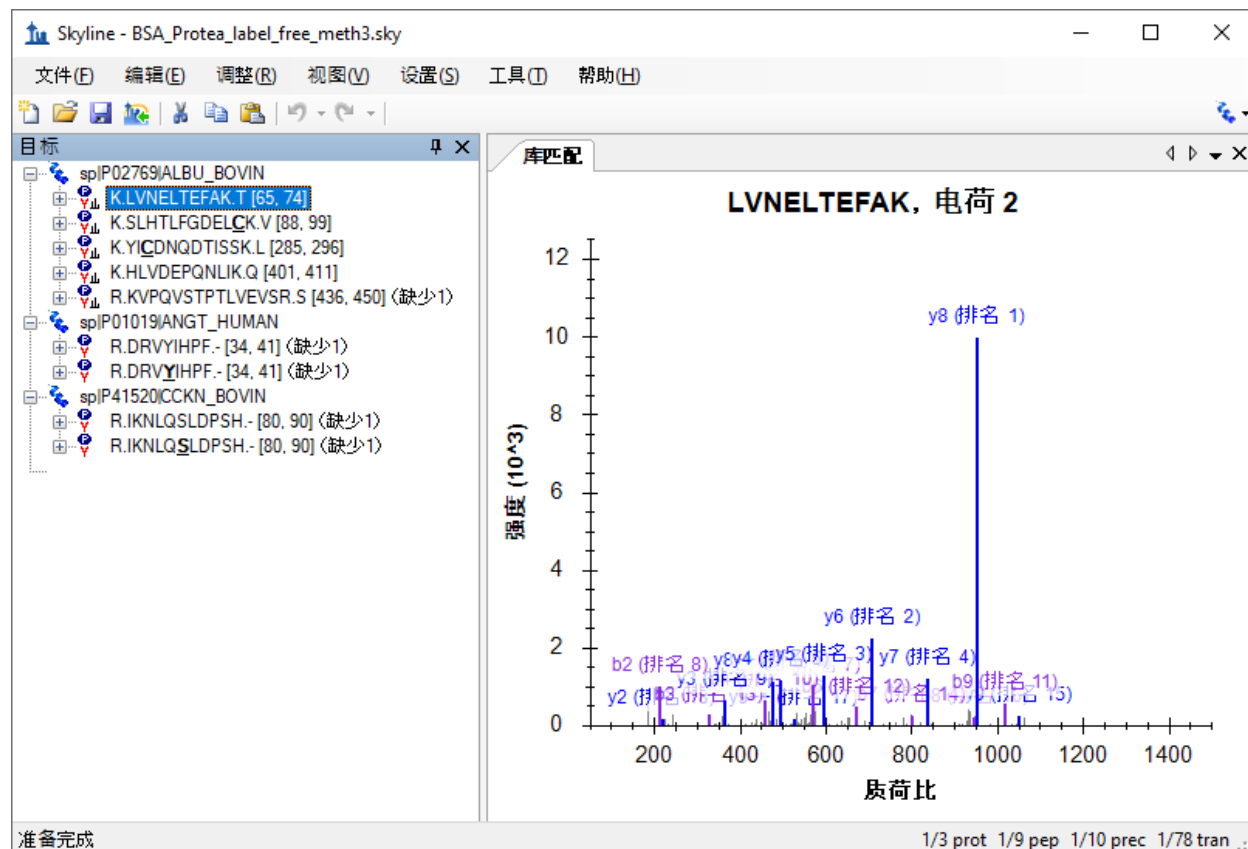
C:\Users\brendanx\Documents

这将创建一个新文件夹：

C:\Users\brendanx\Documents\TargetedMSMS

其中包含本教程所需的所有文件。在 Windows 资源管理器中，导航至新的“TargetedMSMS”文件夹及其包含的子文件夹“Low Res”。双击文件“BSA_Protea_label_free_meth3.sky”，即可打开其中包含低分辨率 Thermo LTQ 仪器所产生的 PRM 数据的 Skyline 项目。

选择文档中的第一个肽段，Skyline 将显示如下：



这是一个相对较小的文档。右下角状态栏显示其中包含 10 个肽段母离子，总共 78 个子离子或目标离子对。其中有的母离子具有源自公共 NIST 库的牛血清白蛋白 (BSA) 相关串联质谱谱图库。另

外还有两条分别存在非修饰形式和磷酸化修饰形式的肽段（一条为人源肽段，一条为牛源肽段），但这两条肽段不存在串联质谱谱图库。

如果您不熟悉如何在 Skyline 中创建这样的文档，可查看多个涵盖各种 Skyline 方法编辑功能的入门教程和教学视频。本教程将假设您熟悉用作靶向蛋白质组学方法编辑器的 Skyline，从现有文档入手。

为 PRM 配置 Skyline 文档

在 Windows 资源管理器中，您还将在此 Skyline 文档的同一个“Low Res”文件夹中看到两个 Thermo 原始文件。这些文件包含使用上述 PRM 方法在低分辨率 LTQ 仪器上采集的一系列 MS1 和串联质谱谱图，方法如下：

1. MS1 扫描
2. 串联质谱扫描 – 父级质荷比 582.32
3. 串联质谱扫描 – 父级质荷比 473.90
4. 串联质谱扫描 – 父级质荷比 722.34
5. 串联质谱扫描 – 父级质荷比 653.36
6. 串联质谱扫描 – 父级质荷比 820.47
7. 串联质谱扫描 – 父级质荷比 547.32
8. 串联质谱扫描 – 父级质荷比 523.77
9. 串联质谱扫描 – 父级质荷比 563.76
10. 串联质谱扫描 – 父级质荷比 417.89
11. 串联质谱扫描 – 父级质荷比 444.55

您可以使用 Skyline 为 Thermo-Scientific、Bruker 和 SCIEX 导出与此类似的 PRM 方法。对于 Agilent、Waters 以及 Thermo Q Exactive 仪器，Skyline 可以导出分离列表或等同于 PRM 的 SRM 离子对列表。在为全扫描仪器导出方法之前，必须配置用于全扫描数据分析的文档。

要为本教程提供的 Thermo 原始文件配置当前分析文档，请执行下列步骤：

- 在**设置**菜单中单击**离子对设置**。
- 单击**全扫描**选项卡。

目前尚未对该文档进行从全扫描数据中提取色谱图的设置。该文档仍将全面支持 SRM 数据，但需要进行一些修改才能将其导入全扫描数据文件。**全扫描**选项卡将显示如下：



Skyline 需要更多信息才能从全扫描数据中提取色谱图。

- 对于 MS1 筛选：从同位素峰值包含下拉列表中选择“计数”。
- 从母离子质量分析仪下拉列表中选择“QIT”。
- 对于串联质谱筛选，从采集方法下拉列表中选择“Targeted”。

此时，全扫描选项卡将显示如下：

离子对设置

预测 过滤器 库 仪器 全扫描

MS1 筛选(M)

同位素峰值包含(I): 计数
母离子质量分析仪(P): QIT

峰(K): 1
分辨率(O): 0.7 质荷比

同位素标记富集(B):

串联质谱筛选(S)

采集方法(C): Targeted
子离子质量分析仪(M): QIT

隔离方案(L):
分辨率(O): 0.7 质荷比

使用高选择性提取

保留时间筛选

仅使用 5 MS/MS ID 的分钟
 仅使用 5 预测保留时间的分钟
 包含所有匹配的扫描

确定 取消

请注意，同时启用 MS1 和串联质谱筛选时，所有母离子色谱图将会从 MS1 谱图中提取出来，而所有碎片离子色谱图从串联质谱谱图中提取出来。如果您想在串联质谱扫描中查看母离子的色谱图，需要禁用 MS1 筛选选项。

Skyline 将保留时间筛选默认设置为仅使用 5 分钟之内进行的串联质谱 ID 扫描，且此设置将突出显示为红色。如果将鼠标悬停在红色文字上方，会看到提示“本文档中的谱图库不包含针对此文档中的任何肽段的保留时间”。这是提醒您，尽管此设置旨在缩短提取色谱图的时长，但除非更改谱图库的内容，否则，由于缺乏有关联保留时间的串联质谱 ID，Skyline 将不得不从所有匹配的串联质谱谱图中提取色谱图。不过，您将针对此实验导入源自搜索靶向串联质谱谱图的肽段搜索数据。现在执行下列操作，可以缩短色谱图提取时长（即使缩短范围非常有限）：

- 将提取时长从“5”分钟更改为“2”分钟。

这能够显著减小 Skyline 文件的大小，加快导入时间并改善色谱峰挑选。

要确保串联质谱库中谱图的匹配与 Skyline 将要提取的色谱图正确对应，需要确保全扫描设置中的串联质谱分辨率与库中离子匹配耐受性窗口相匹配。对于此数据集，请执行下列步骤：

- 单击库选项卡。
- 在离子匹配耐受性字段中输入“0.7”。

库选项卡现在应显示如下：

离子对设置

预测 过滤器 库 仪器 全扫描

离子匹配耐受性(I):
0.7 质荷比

如果库谱图可用, 则选择其最强的离子(S)

选择(P):
6 子离子
最小子离子

从已过滤的离子电荷和类型(C)
 从已过滤的子离子和类型以及过滤的子离子(U)
 从已过滤的子离子(D)

确定 取消

此时，离子匹配窗口与色谱提取窗口相同。这对于高分辨率数据而言可能稍显复杂，因为色谱提取窗口将随着质荷比变化。我们希望日后添加一个复选框来强制两种设置相互匹配，但就目前而言，介于 0.05 和 0.01 之间的值通常最适合高分辨率数据，具体取决于串联质谱质量分析仪上的分辨能力设置。

MS1 全扫描设置表明，单一同位素母离子峰需从结果文件中的 MS1 扫描提取出来，所以需要确保文档中包含母离子的离子对条目。虽然 Skyline 应当已经在过滤器选项卡的离子类型字段中添加了“P”（表示母离子），但还是要检查以确保进行了添加：

- 单击过滤器选项卡。

此时，过滤器选项卡应显示如下：

The screenshot shows the 'Ion Pairs Settings' dialog box with the 'Filter' tab selected. The 'Peptide' section is active, showing the following settings:

- 母离子电荷(P): 2, 3
- 离子电荷(Q): 1, 2, 3
- 离子类型(T): y, b, p

The 'Sub-ion Selection' section includes:

- 从(E): 质荷比 > 母离子
- 至(Q): 6 个离子

The 'Special Ions (S)' section contains a list of checkboxes for special ion types:

- N-terminal to Proline
- C-terminal to Glu or Asp
- iTRAQ-114
- iTRAQ-115
- iTRAQ-116
- iTRAQ-117

An 'Edit List (E)...' button is located to the right of the list. At the bottom of the dialog, there are two buttons: '确定' (OK) and '取消' (Cancel).

- 单击**确定**按钮。

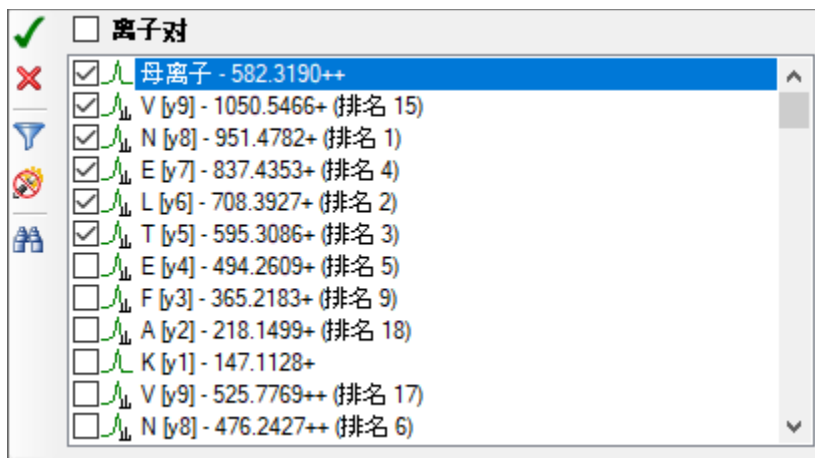
要确保每个肽段母离子条目都包含一个母离子离子对，请执行下列操作：

- 在**编辑**菜单上选择**全部展开**，然后单击**母离子 (Ctrl-W)**。

遗憾的是，由于本文档中的所有母离子都进行了手动编辑，这导致 Skyline 无法根据**过滤器**选项卡中的变化而更改离子对。因此，您需要手动添加母离子离子对，如下所示：

- 将鼠标悬停在第一个母离子“582.3190++”上方，并单击标记右侧的向下箭头。
- 选中弹出的选择列表顶部的母离子离子对。

此时，表单将显示如下：



- 单击绿色复选按钮 (Enter)。

针对文档中的其它 9 个母离子分别重复此步骤。完成这些更改后，重新选择第一个肽段。

现在完成了文档配置，能够处理 PRM 数据了。您也可以用它来为 LTQ 仪器导出 PRM 方法。

PRM 方法导出

我们强烈建议您使用仪器控制电脑从 Skyline 文档导出所有方法。这是因为大多数仪器供应商未将其方法编辑软件设计得能够在其它设置中良好运行，并且 Skyline 必须使用这些供应商提供的库来对您提供的模板方法进行必要的更改。在有些情况下，您可在个人电脑上设置供应商软件，以模拟仪器控制电脑上的环境，但我们不建议这样做。我们建议您在个人电脑上编辑 Skyline 文档，然后将其转移至仪器控制电脑，用于最终的方法导出。

因此，要为当前文档导出 LTQ 方法，首先要将针对 Thermo LTQ 的 Skyline 文档转移至仪器控制电脑，然后执行下列步骤：

- 在**文件**菜单中选择**导出**，然后单击**方法**。

- 在**仪器类型**下拉列表中，Skyline 默认选项为“Thermo LTQ”。
- 选择**单一方法**。
- 在**方法类型**下拉列表中选择“标准”。
- 单击**模板文件**字段旁边的**浏览**按钮。
- 如果您在 LTQ 上执行此操作，请导航至适用于仪器（包含单一 MS1 扫描）的包含模板方法的文件夹。
如果不是，请导航至您为此教程创建的“TargetedMSMS”文件夹中的“Low Res”子文件夹。
- 如果在 LTQ 上执行此操作，请双击您的模板方法。
如果不是，请双击本教程提供的“TargetedMSMS_template.meth”文件。

导出方法表单将显示为：

导出方法

仪器类型(I): Thermo LTQ

确定 取消

单一方法(S) 每个蛋白质一个方法(O) 按质荷比排序

多个方法(M) 忽视蛋白质(R)

每次样品注射的最大母离子(X):

方法: 1

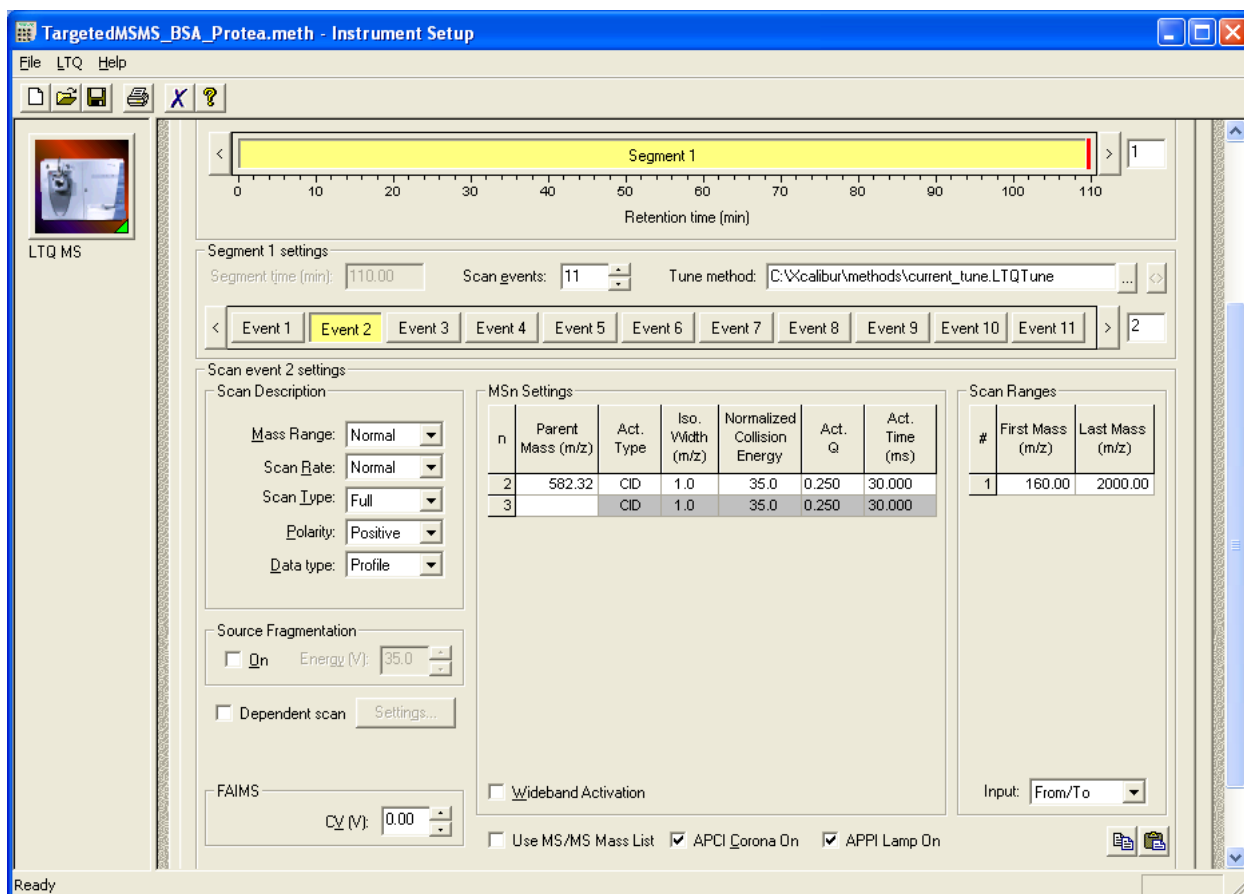
最优化(Z): 无

方法类型(T): 标准

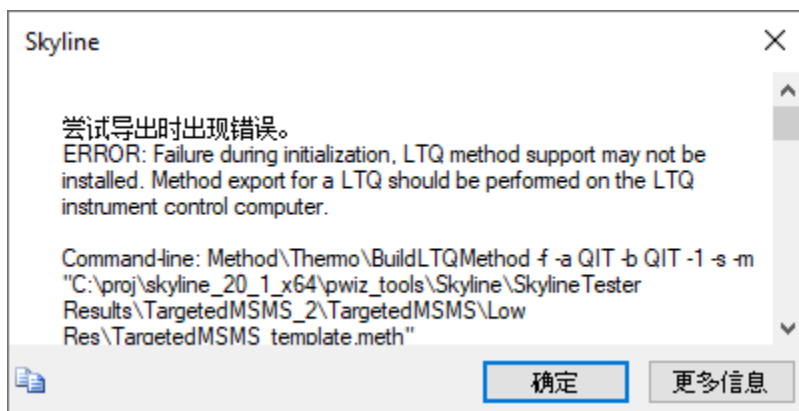
模板文件(E): .ow Res\TargetedMSMS_template.meth 浏览(B)...

- 单击**确定**按钮。
- 在出现的**导出 Thermo LTQ 方法**表单中，导航至您要保存方法的文件夹。
- 在**文件名字段**中输入“TargetedMSMS_BSA_Protea.meth”。
- 单击**保存**按钮。

如果在 Thermo LTQ 仪器上真正执行这些步骤，此操作应该会成功，并会创建您指定的新的“TargetedMSMS_BSA_Protea.meth”文件。双击此文件，LTQ 仪器设置软件应显示如下：



否则，Skyline 将显示以下错误消息：

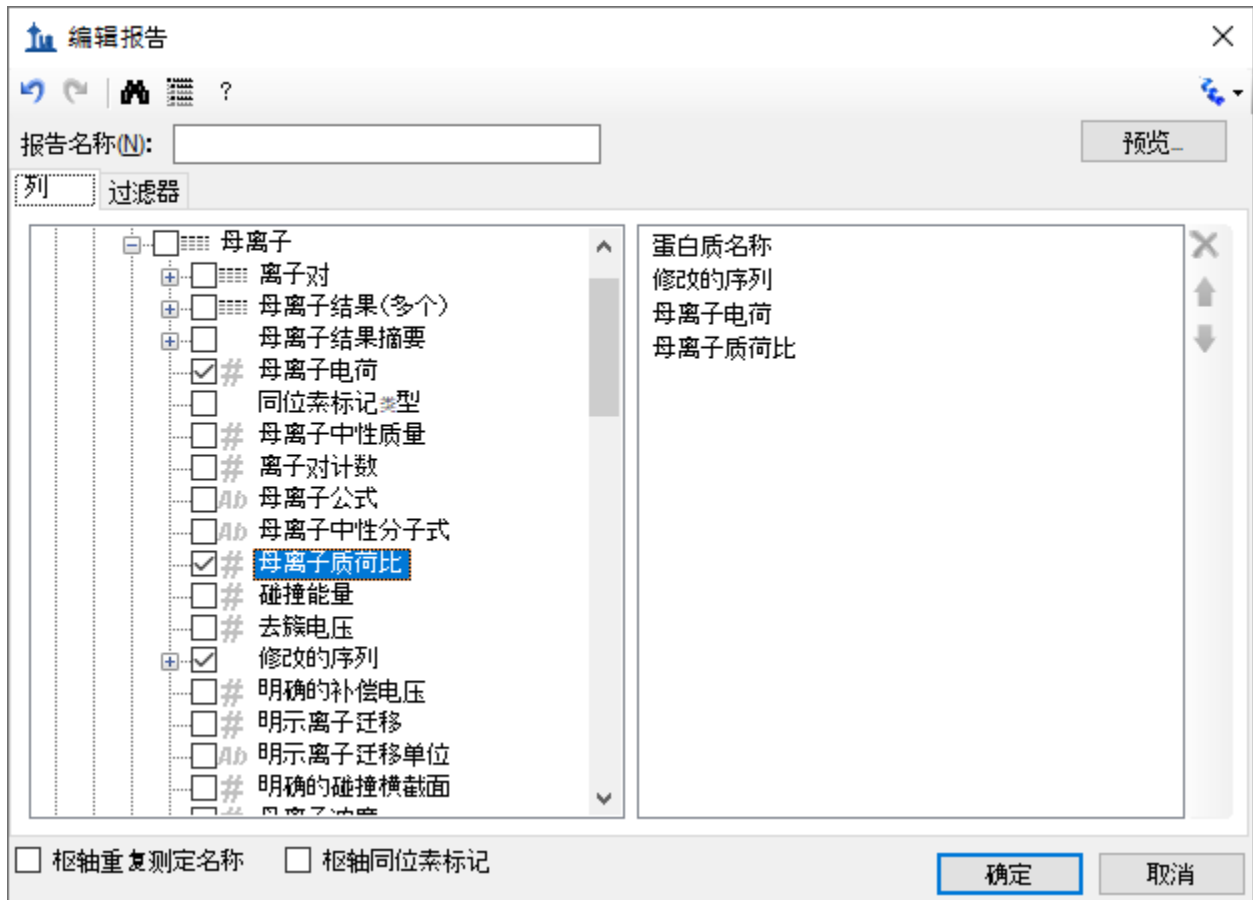


单击**确定**按钮即可继续教程的其余部分。但请记住，类似的步骤对 Thermo Ion Trap、Fusion、Bruker TOF 以及 SCIEX QTOF 仪器控制电脑也适用。或者，对于 Agilent TOF、Thermo Q Exactive 和 Waters QTOF 仪器，也可以使用“文件”>“导出”>“分离列表”。

不过，在类似这样的小文档中，您应当能够手动创建上述方法，因为它只要求为本文档中的特定母离子质荷比值设置一次 MS1 扫描和 10 次串联质谱扫描。为此要生成一个包含母离子质荷比值的报告，请执行下列步骤：

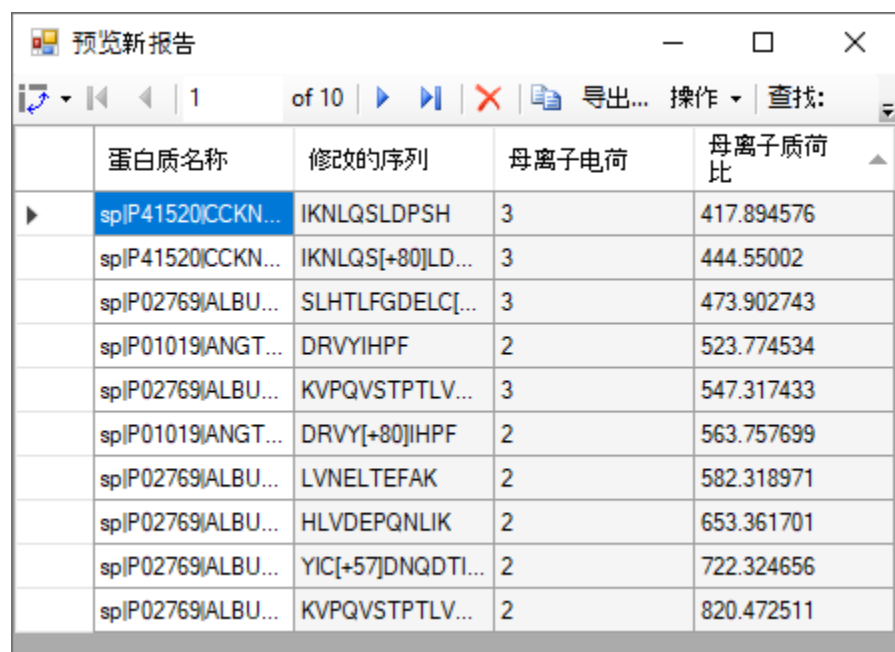
- 在文件菜单中选择导出，然后单击报告。
- 单击导出报告表单中的编辑列表按钮。
- 单击编辑报告表单中的添加按钮。
- 在编辑报告表单中，添加以下字段：
 - 蛋白质名称
 - 修改的序列
 - 母离子电荷
 - 母离子质荷比

此时编辑报告表单将显示如下：



- 单击预览按钮。
- 在预览新报告表单中，单击“PrecursorMz”列标题。

此时预览报告表单将显示如下：



蛋白质名称	修改的序列	母离子电荷	母离子质荷比
sp P41520 CCKN...	IKNLQSLDPSH	3	417.894576
sp P41520 CCKN...	IKNLQS[+80]LD...	3	444.55002
sp P02769 ALBU...	SLHTLFGDELIC[...	3	473.902743
sp P01019 ANGT...	DRVYIHPF	2	523.774534
sp P02769 ALBU...	KVPQVSTPTLV...	3	547.317433
sp P01019 ANGT...	DRVY[+80]IHPF	2	563.757699
sp P02769 ALBU...	LVNELTEFAK	2	582.318971
sp P02769 ALBU...	HLVDEPQNLIK	2	653.361701
sp P02769 ALBU...	YIC[+57]DNQDTI...	2	722.324656
sp P02769 ALBU...	KVPQVSTPTLV...	2	820.472511

借助此表单中显示的母离子质荷比值，可以加快 PRM 方法的设置过程，即使在目前缺乏直接方法导出支持的仪器上也能做到这一点。实际上，用于检查数据的原始方法就是通过这种方式建立的。不过需要注意的是，越来越多的 PRM 实验变得和 SRM 一样可以进行可靠的预定采集，因此 Skyline 中的时序安排算法变得非常宝贵。

导入并检查全扫描数据

要为此文档导入肽段搜索结果和在 Thermo LTQ 上收集的两个原始数据文件，请执行下列步骤：

- 按住 Esc 键，直到所有表单均消失，仅留下 Skyline 主窗口。
- 在文件菜单中选择导入，然后单击肽段搜索。

Skyline 将显示如下向导表单：

此表单的首页可用于针对您的 Skyline 文档建立一个谱图库。若要现在执行此操作，请执行下列步骤：

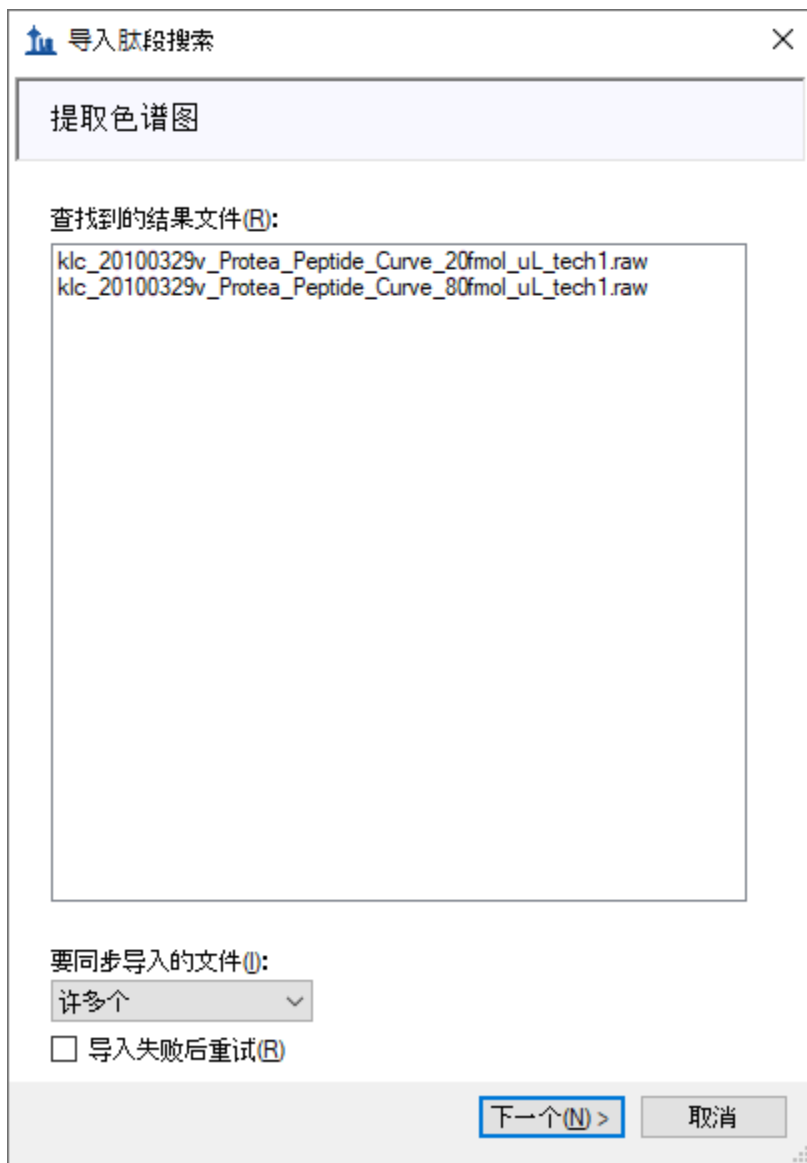
- 在**截止得分**字段中输入“0.99”。
- 选中**文档肽段过滤器**复选框，只保留文档中识别该肽段的谱图。
- 单击**导入肽段搜索**表单中的**添加文件**按钮。
- 导航至“Low Res”文件夹的“search”子文件夹。
- 在**文件名**字段中键入“*.xml”。
- 按住 Ctrl 键并单击此文档中以 .perc.xml 结尾的两个文件。
- 单击**添加输入文件**表单中的**打开**按钮。

此时，表单将显示如下：

- 单击下一步按钮。

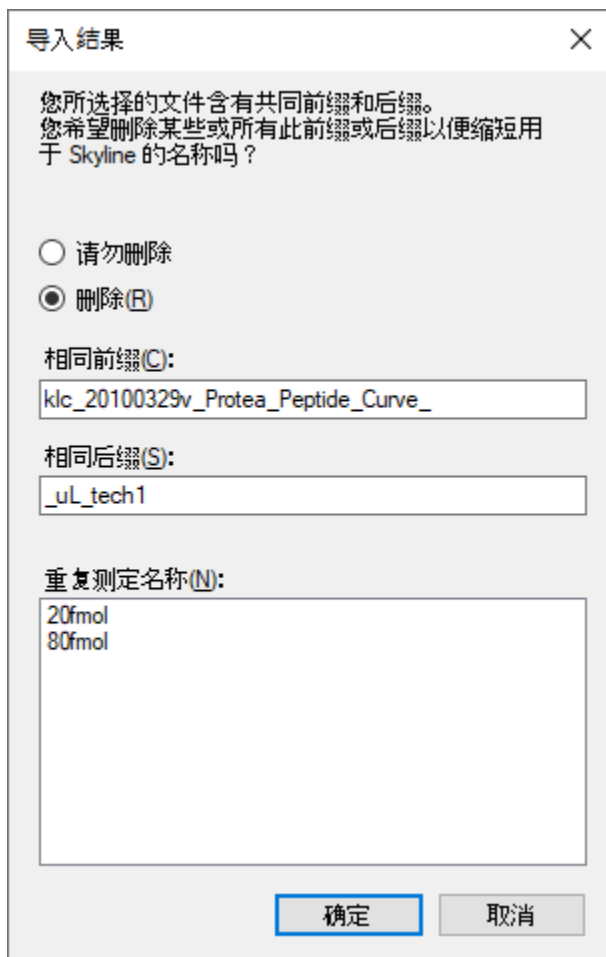
现在，Skyline 开始根据 PRM 数据的 Sequest/Percolator 肽段搜索结果建立谱图库，同时显示进度条。完成此步骤后，Skyline 会搜索围绕肽段谱图源文件或 Skyline 文档的任何原始数据文件，此例中找到两个匹配的 Thermo 原始文件。如果无法找到匹配的数据文件，系统将要求您重新查找。

向导表单现在将显示如下，其中显示 Skyline 用于色谱图提取的文件：



- 单击下一步按钮。

Skyline 检测到这些长文件名有共同的前缀和后缀，并提出删除它们，显示的表单如下：



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):
klc_20100329v_Protea_Peptide_Curve_

相同后缀(S):
_uL_tech1

重复测定名称(N):
20fmol
80fmol

确定 取消

由于 Skyline 会在图形标签和其它 UI 元素中显示这些重复测定名称，所以接受这些缩写名称不失为好主意，在这里您就会这样做。

- 单击**确定**按钮。

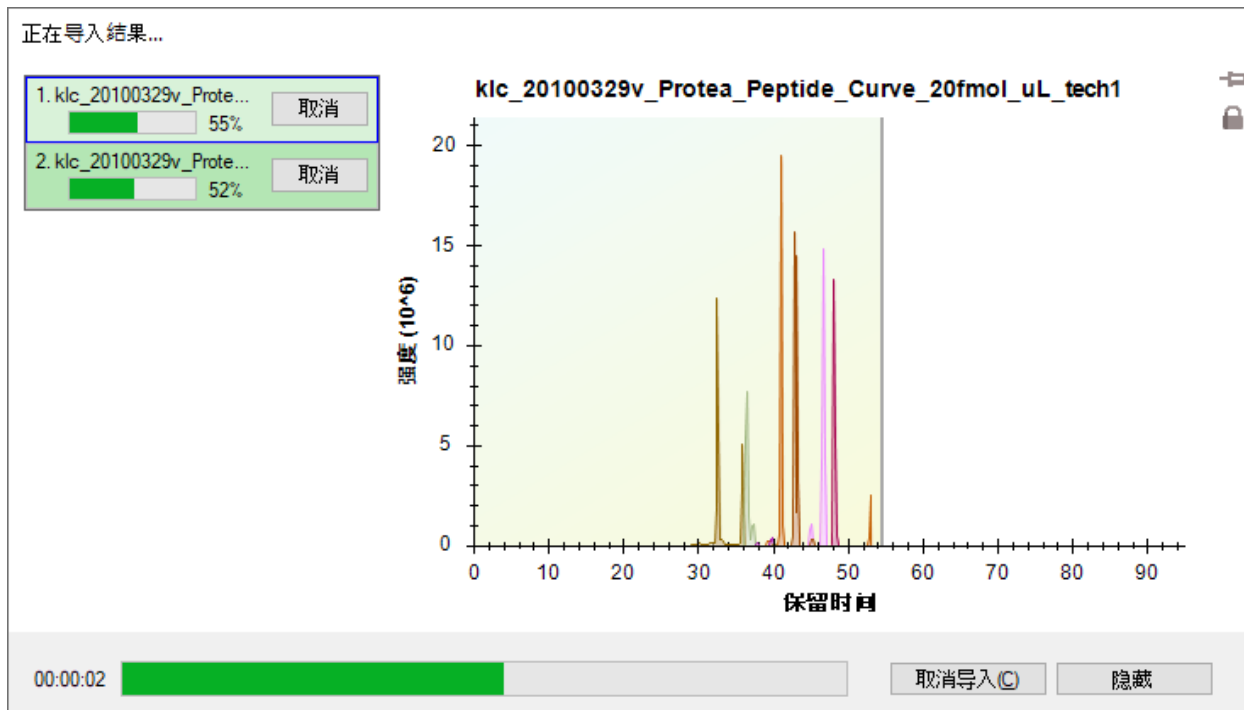
Skyline 将显示几个您已经调整的离子对设置。在 [MS1 全扫描筛选教程](#) 中介绍过，这些设置在一开始时非常有用，您不需要在这里进行任何进一步的更改。

- 单击向导表单中的**下一步**按钮。

Skyline 现在显示全扫描设置，并且您也已经为该数据集调整了这项设置。

- 单击**完成**按钮。

文件导入开始，底部 Skyline 窗口的状态栏中将显示进度和**加载色谱图**表单。

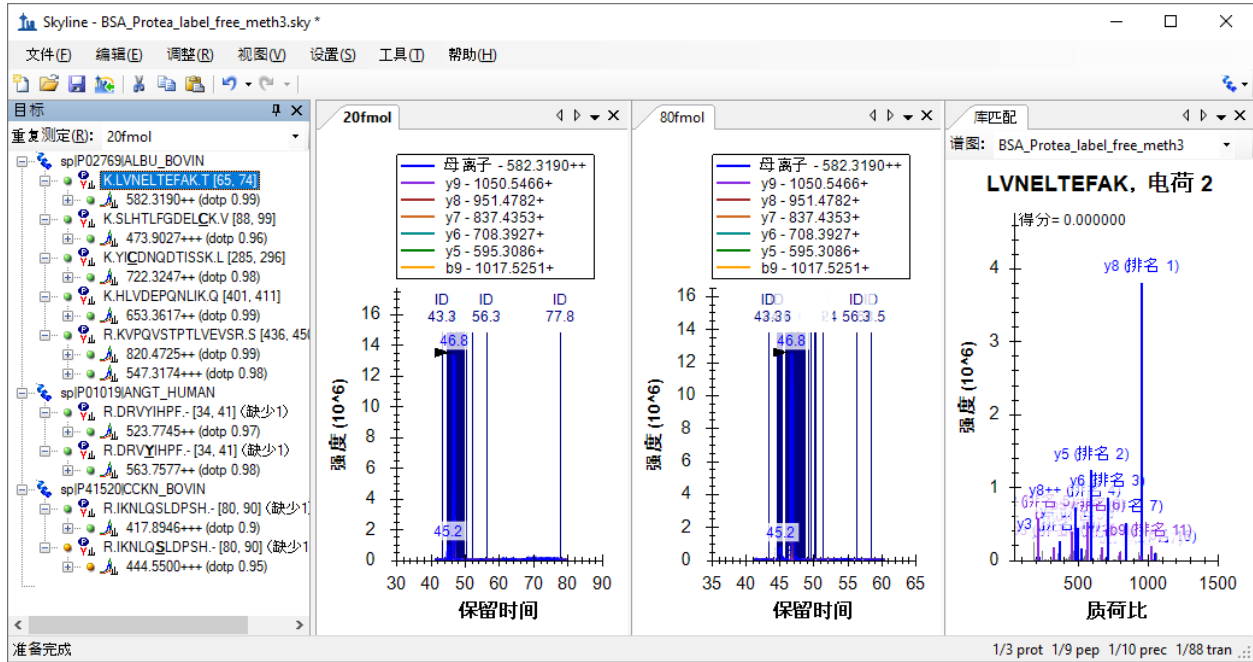


审查数据

在提取靶向色谱图并分析峰的过程中，您可执行以下操作，准备查看所提取的色谱图：

- 在**视图**菜单中选择**排列图**，然后单击**平铺** (Ctrl-T)。
- 在**编辑**菜单上选择**全部折叠**，然后单击**母离子** (Ctrl-Shift-W)。

导入完成后，Skyline 窗口将显示如下：



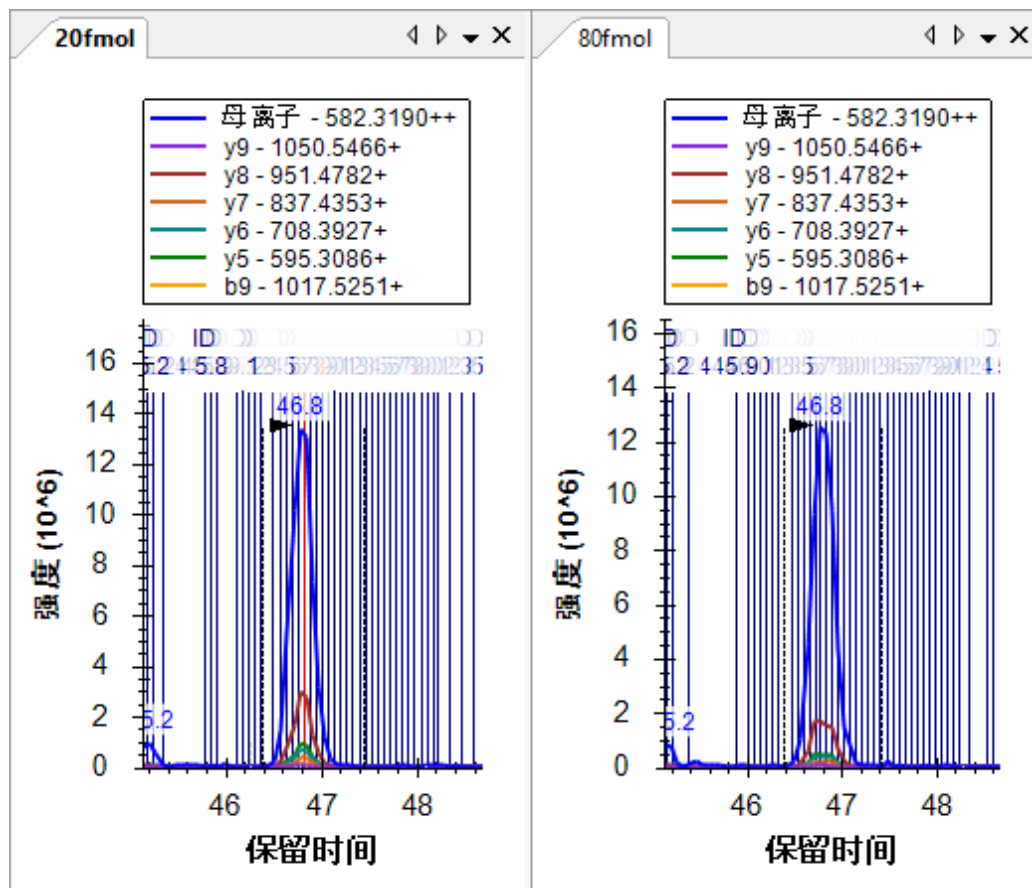
查看此视图中的色谱图可能有些困难，因为谱图 ID 数量较多，这些 ID 全部标注了深蓝色的垂直线、已确认谱图的字母“ID”和以分钟为单位的色谱保留时间。所选的色谱峰显示在这些 ID 中间，并带有一个指向其顶点的黑色箭头。

您可能会注意到，色谱峰强度 (1.4×10^7) 看起来与 4:1 稀释的样品的色谱峰强度比较接近。这是因为 BSA 蛋白质酶解被用作文档中其它两种蛋白质稀释的恒定背景。

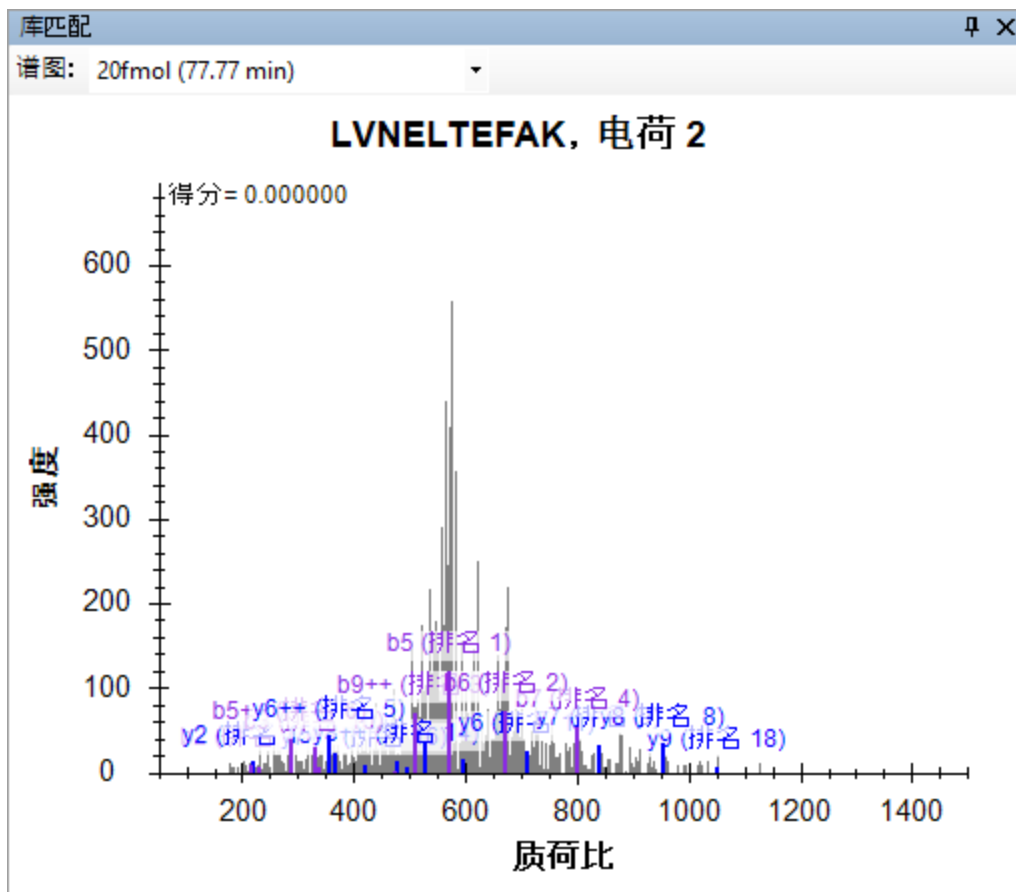
如果您真的在 Skyline 中看到这种完整色谱视图，接下来可以执行以下操作，来放大色谱图中的整合峰：

- 在视图菜单中选择自动缩放，然后单击最佳峰值 (F11)。

执行此操作后色谱图显示如下：



现在，您可以看到一条条竖线，每一条竖线代表一个被确认为目标肽段的谱图，仔细观察会发现20fmol样品的色谱峰中间有一条红线。这是**库匹配**视图中当前显示的谱图，并且是BiblioSpec库生成工具所认为的“最佳谱图”。您可以单击色谱图中的竖线，或单击**库匹配**视图顶部的下拉列表并从长长的谱图时间列表中进行选择，以查看**库匹配**视图中的其它谱图。肽段搜索引擎能够从众多色谱峰中识别包含此肽段的谱图，这点可能有些令人惊奇。而且，从整合的色谱峰边界以外的谱图来看，其信噪比非常低。




不过，它是在 FASTA 文件中通过未指定的酶切执行搜索的，该 FASTA 文件包含三种预期蛋白质以及整个反向 Uniprot FASTA。

- 单击库匹配视图右上角的“X”将其关闭。

此外，在检查色谱图时，如此多的肽段 ID 注释可能有些过量：

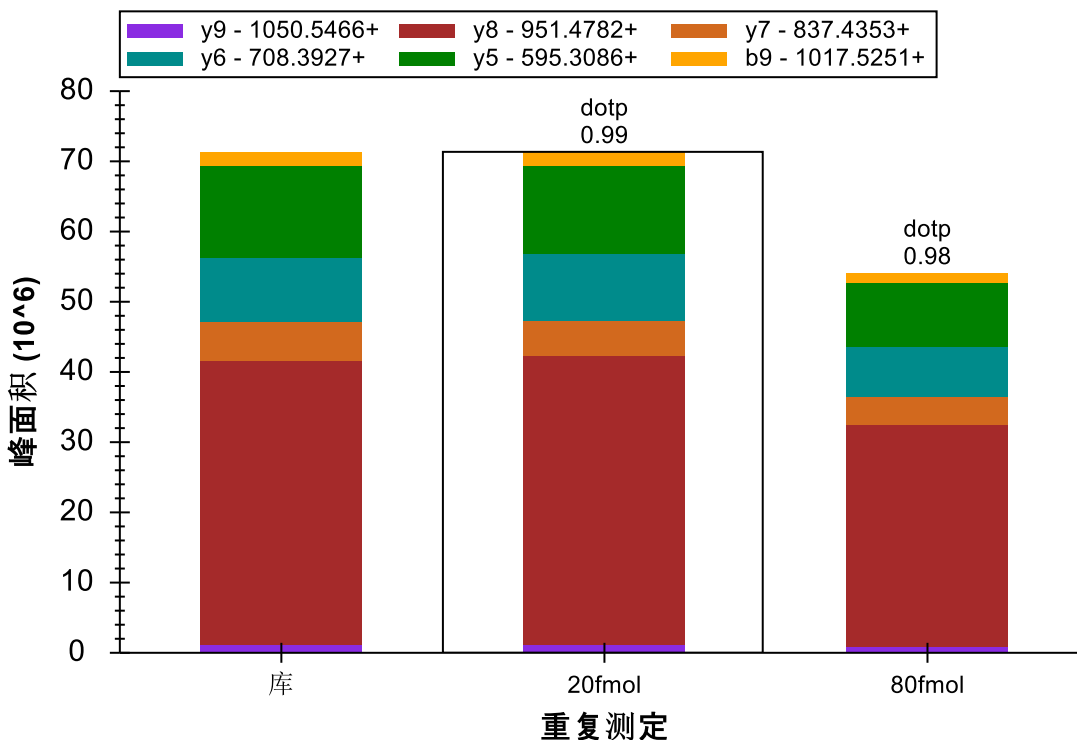
- 右键单击色谱图，选择肽段 ID 次数并单击匹配（如果已选中）。

将您的注意力转移到目标视图，此时会看到所有目标肽段均有匹配的串联质谱谱图，并在右下角显示带有小谱图的图标。您会看到 0.84 为最低点积分分数（标有“点积”），其为母离子“417.8946+++ (dotp 0.84)”提供测定的子离子峰面积和谱图库中片段离子强度之间的相关分数。目标视图仅显示当前活动的重复测定“20fmol”的点积分数。您可以区分活动的重复测定，因为其选项卡文本采用粗体，可从目标视图顶部的下拉列表中选择。单击重复测定“80fmol”的色谱图，或在下拉列表中选择它，以查看其点积分数。

要同时查看所有重复测定的信息，请执行下列操作：

- 在视图菜单中选择峰面积，并单击重复测定比较 (F7)。
- 在视图菜单中选择离子对，并单击子离子 (Ctrl-Alt-F10)。

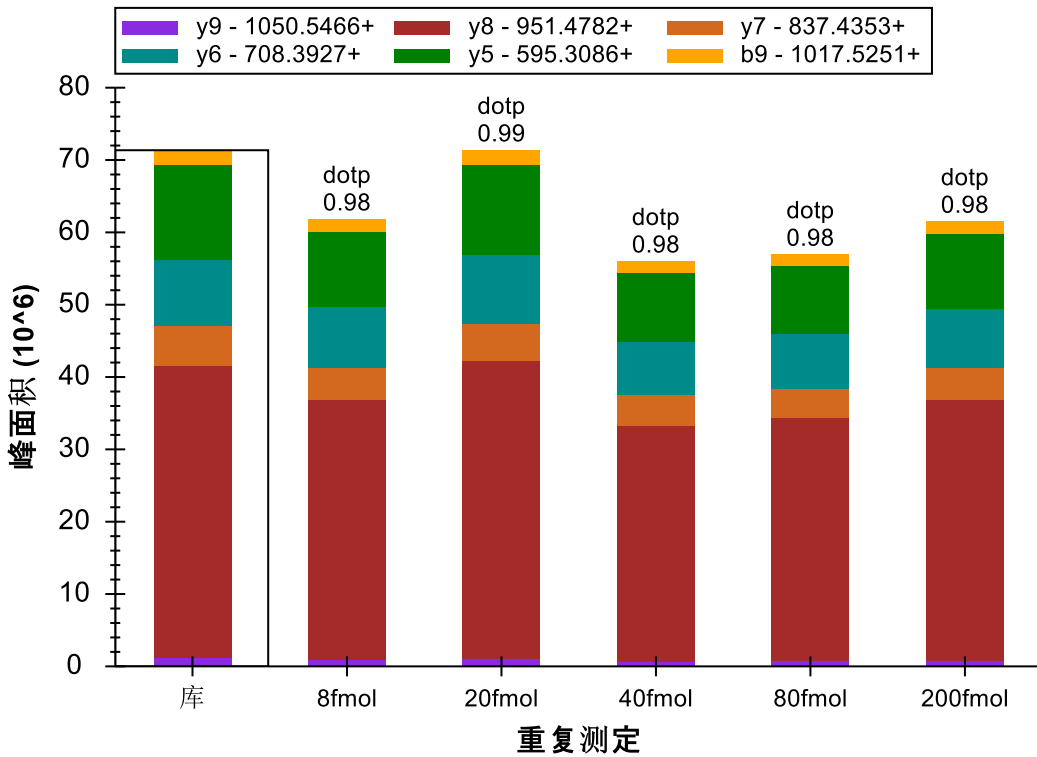
峰面积图将显示如下：



如果不是这样显示，可能仍需执行以下某个步骤：

- 右键单击峰面积图，选择归一化，然后单击无。
- 右键单击峰面积图，然后单击显示库。
- 右键单击峰面积图，然后单击显示点积。

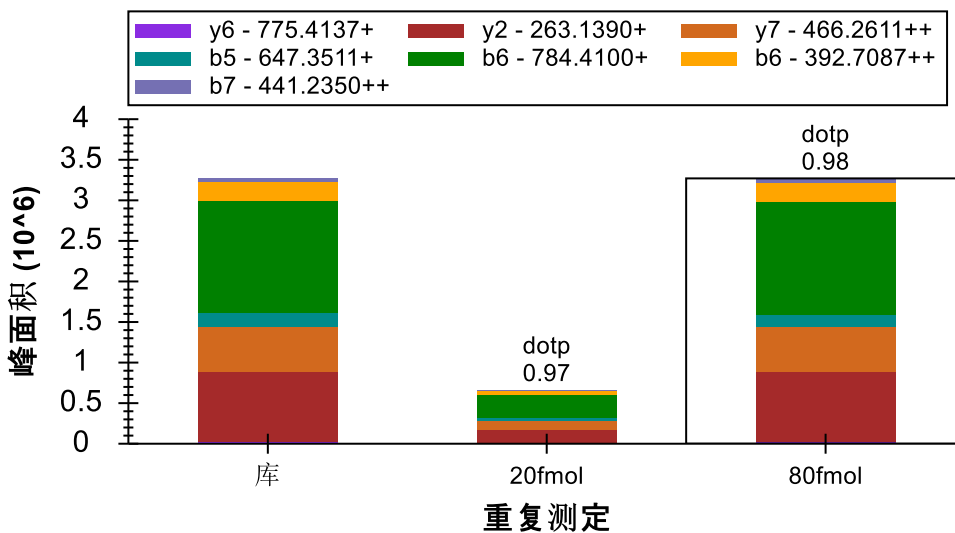
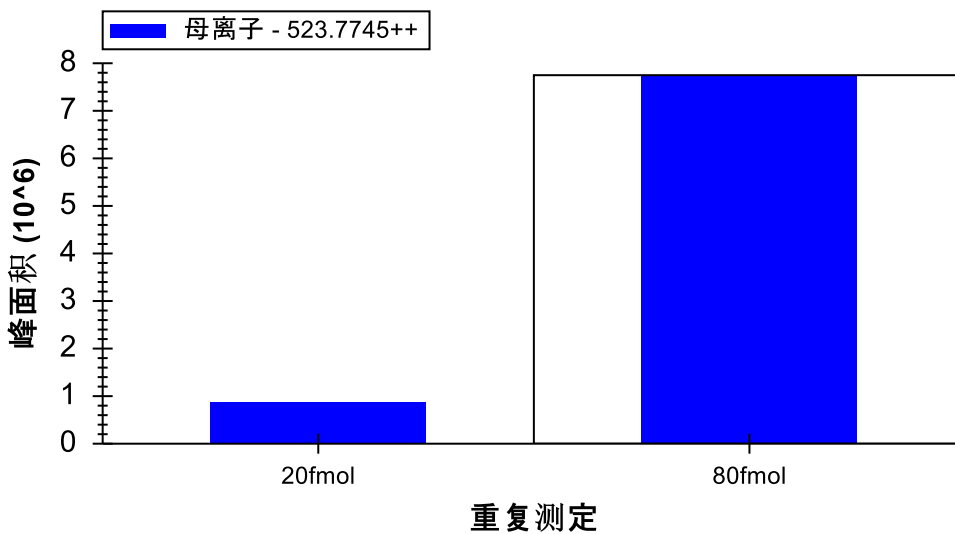
您可查看具有这些设置的所有目标肽段，可以看到它们与搜索谱图非常匹配，并且样品中 BSA 肽段的浓度保持相对恒定。一些 BSA 肽段在 20 fmol 样品中显示更高的峰面积，而有些肽段则在 80 fmol 样品中显示更高的峰面积，这是由于测量存在一定的误差。对于这 5 个浓度稀释点，上述肽段 LVNELTEFAK 的峰面积图显示如下：



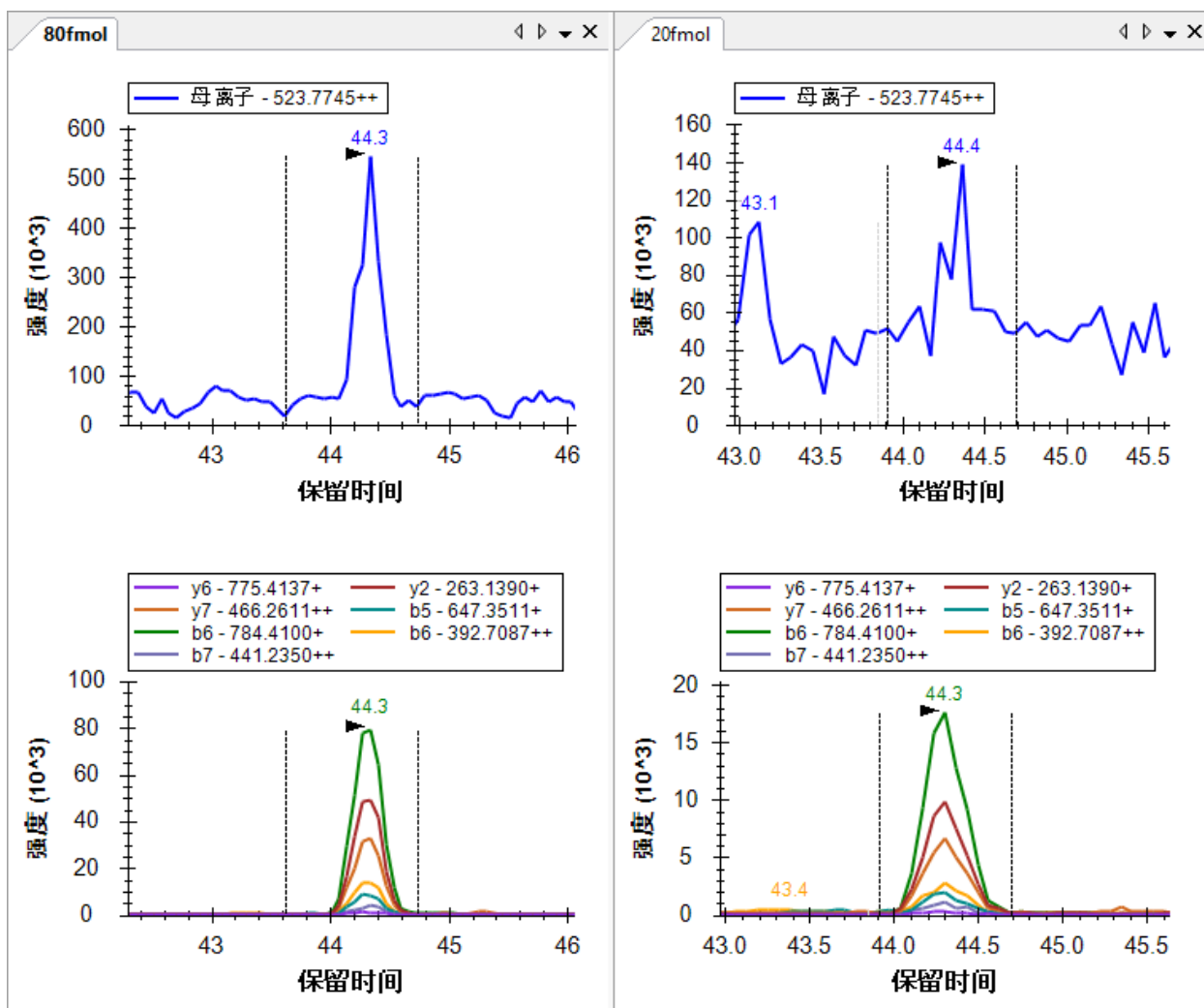
接下来，对于人源肽段 DRVYIHPF，从中可以看到由样品名 80 fmol 和 20 fmol 所表示的 4:1 浓度比值的测定结果。为了更好地查看 Skyline 的测定结果，请执行以下步骤：

- 右键单击峰面积图，选择离子对，然后单击全部。
- 右键单击峰面积图，选择离子对，然后单击分割图。

峰面积图显示如下：



80 fmol 子离子峰面积之和约为 3×10^6 ，20 fmol 子离子峰面积之和约为 0.7×10^6 ，接近预期的 4:1 的比例，但对于从 MS1 扫描提取的母离子而言，80 fmol 面积约为 8×10^6 ，20 fmol 面积接近 0.9×10^6 ，其比例约为 9:1。我们来看一下色谱图，以了解出现比例差异的来源。



可以看到，子离子色谱图比从 MS1 中提取的色谱图的噪声少得多。通过 Skyline 应用的背景减法，背景上方 20 fmol 的母离子面积相当低。来自串联质谱的子离子色谱图比来自相同分辨率的 MS1 的母离子色谱图更具选择性，并且子离子色谱显示的背景更少。

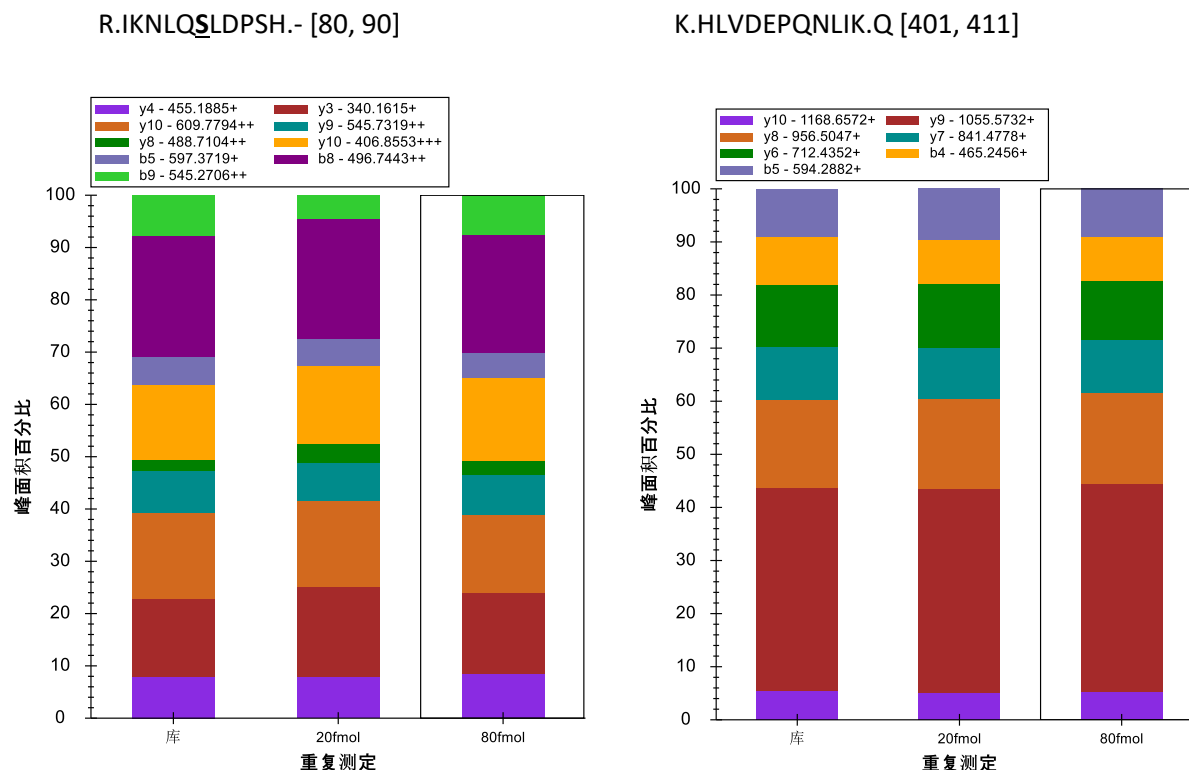
如果此时查看其余 4 种肽段，则不出所料，所有 4 种肽段在 80 fmol 和 20 fmol 样品之间的强度比约为 4:1。（数据为从稀释系列选择的两个点。出于对文件大小的考虑，本教程中只包括了两个点。）

这些数据和其它实验表明，低分辨率 LTQ 完全可以进行串联质谱扫描并提取片段离子的色谱图来进行定量分析¹。

您还可以执行以下操作，来对比各重复测定的相对离子丰度：

- 右键单击峰面积图，选择离子对，然后单击子离子。
- 右键单击峰面积图，选择归一化，然后单击总数。

在此模式中，您可以审查文档中的所有肽段，会看到重复测定之间片段离子的相对丰度非常相似，并且与谱图库中片段离子的强度也极为相似。



处理高分辨率质谱

本教程所涉及的另一个数据集是 BSA 酶解肽段进行一系列稀释并由 Agilent 6500 Q-TOF 测量所得的数据集。虽然 Skyline 全扫描筛选适用于轮廓扫描，但为了保证为本教程下载的数据足够小，因而对高分辨率谱图中的所有谱峰采用质心格式。因为我们发现 Skyline 对供应商的质心谱图效果相当好，现在有一个选项，强制使用质心谱图，即使是在轮廓谱图可用的情况下也是如此。

接下来开始使用 Q-TOF 数据。请保存您正在处理的文件，并打开所创建教程文件夹的“TOF”子文件夹中的“BSA_Agilent.sky”文件。

为高分辨率 PRM 配置 Skyline 文档

此外，这是针对“TOF”文件夹中包含的原始数据文件的完整 Skyline 文档，但其当前设置仅允许导入 SRM 数据。如果您在此尝试导入本教程中包含的任何 TOF 质谱数据文件，系统会出现以下错误消息：



如果您确实尝试了该操作，则请执行以下操作将文档恢复到原始状态。

- 单击**关闭**按钮。
- 在**编辑**菜单中，单击**撤销** (Ctrl-Z)。

您可以调整文档设置，通过执行以下操作使之与在本教程数据文件中的 PRM 实验兼容：

- 在**设置**菜单中单击**离子对设置**。
- 单击**全扫描**选项卡。
- 对于 MS1 筛选：
 - 从**同位素峰值包含**下拉列表中选择“计数”。
 - 在**峰**字段中输入“3”。
 - 从**母离子质量分析仪**下拉列表中选择“Centroided”。
 - 在**质量误差**字段中输入“20”ppm。
- 对于串联质谱筛选：
 - 从**采集方法**下拉列表中选择“Targeted”。
 - 从**子离子质量分析仪**下拉列表中选择“Centroided”。
 - 在**质量误差**字段中输入“20”ppm。

此时，**全扫描**选项卡将显示如下：

离子对设置

预测 过滤器 库 仪器 全扫描

MS1 筛选(M)

同位素峰值包含(I): 计数

母离子质量分析仪(P): Centroided

峰(K): 3

质量准确度(A): 20 ppm

同位素标记富集(B): 默认

串联质谱筛选(S)

采集方法(C): Targeted

子离子质量分析仪(M): Centroided

隔离方案(L):

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 5 MS/MS ID 的分钟

仅使用 5 预测保留时间的分钟

包含所有匹配的扫描

确定 取消

对于此数据集，没有肽段搜索结果可从中获取串联质谱 ID，这就是为什么该选项显示为红色的原因。在导入任何数据之前，您也无法预测肽段的洗脱保留时间。由于缺乏串联质谱 ID，如果按照这样的设置，Skyline 将从所有匹配的扫描提取色谱图。您也可以执行以下操作明确选择此项：

- 针对**保留时间筛选**选择**包含所有匹配的扫描**选项。

Skyline 会将此选项显示为红色。如果将鼠标光标悬停在红色文本上方，会看到提示“全梯度色谱图将花费更长的时间来导入、占用更多磁盘空间，并且可能导致峰选择不太有效。”然而，在这种情况下，数据是用预定的 PRM 方法获取的，并且 Skyline 将自动调整色谱图的长度至仅获取串联质谱谱图的时间范围，尽管 MS1 谱图是在整个梯度上获取的。

- 单击**确定**按钮。

要确保此时每个肽段母离子项包含母离子离子对，请执行以下操作：

- 在**编辑**菜单上选择**全部展开**，然后单击**母离子** (Ctrl-W)。

此时，您会看到所有肽段包含 3 个母离子离子对 (M、M+1、M+2)，只有高分辨率 MS1 扫描才可能出现这种情况。目标视图中的离子对显示如下：



因为未手动编辑肽段，它们均处于自动选择模式，因此将自动添加母离子离子对。同样，Skyline 自动在**过滤器**选项卡中添加了“p”离子类型，因为您选择了 MS1 筛选。

Skyline 正在使用正交排名排列母离子同位素峰（针对离子对节点的同位素排名）和子离子峰（排名）。母离子同位素峰根据预期的同位素分布进行排列。子离子峰则按照其在匹配库谱图中的相对强度排列。

导入并检查高分辨率全扫描数据

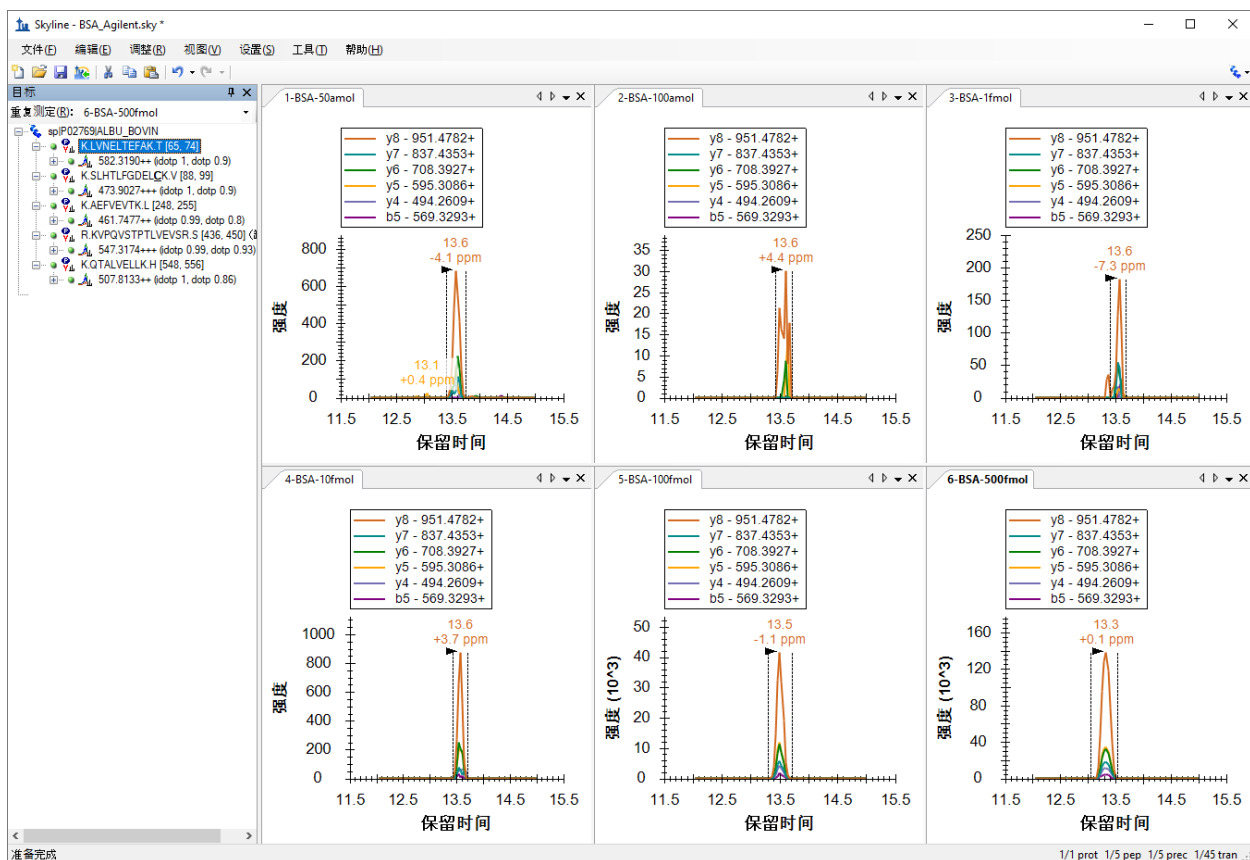
通过执行下列步骤，将稀释系列中的最高浓度数据导入本文档：

- 在**文件**菜单中选择**导入**，然后单击**结果**。
- 单击**导入结果**表单中的**确定**按钮。
- 单击所有以 .d 结尾的 6 个数据文件并拖动它们周围的矩形。
- 单击**导入结果文件**表单中的**打开**按钮。

在提取靶向色谱图和分析峰的过程中，您可执行以下操作，准备查看提取的色谱图：

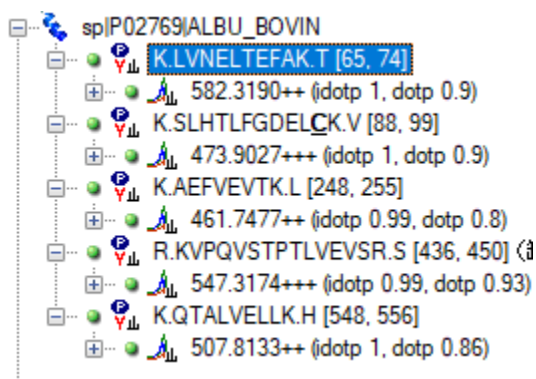
- 选择**目标视图**中的第一个肽段 (K.LVNELTEFAK.T [65, 74])。
- 在**编辑**菜单上选择**全部折叠**，然后单击**母离子** (Ctrl-Shift-W)。
- 单击**库匹配**视图右上角的“X”将其关闭。
- 在**视图**菜单中选择**排列图**，然后单击**平铺**。

导入完成后，Skyline 窗口将显示如下：



首先，您会发现色谱图中的色谱只覆盖 3 分钟的范围，而在上图中覆盖 12 到 15 分钟。

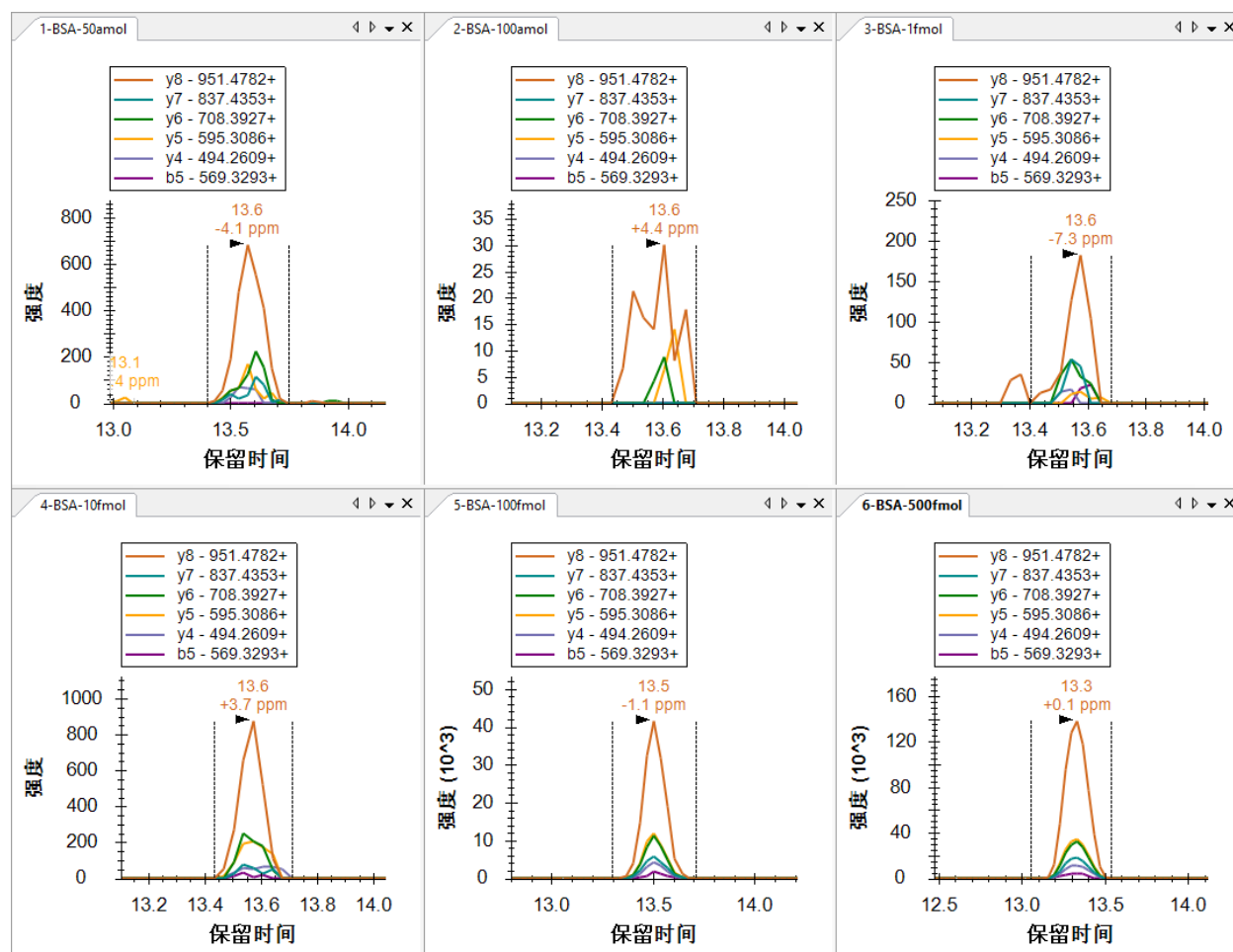
将目标视图放大，可以看到此时已为母离子同位素分布和子离子强度分别添加了两个正交点积值：同位素点积和点积。这些值表明最高浓度 (500 fmol) 数据中肽段色谱峰与预期的相对强度之间良好的相关性。



若要放大所有图上的所选峰值，请执行下列操作：

- 在视图菜单中选择自动缩放，然后单击最佳峰值 (F11)。

执行这项操作后色谱图将显示如下：

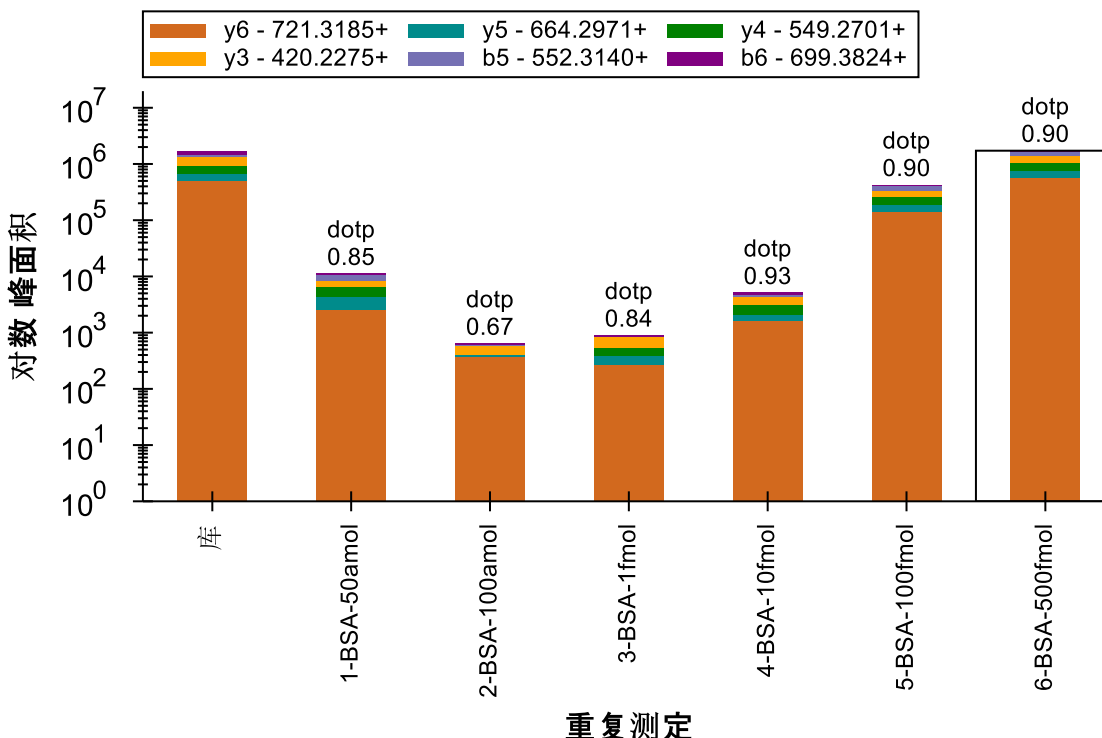


您可能会发现，在 6 个色谱图中，50 amol 的样品强度更大 (700)，比 100 amol 样品 (40) 形成的峰图更佳。所有峰值的保留时间都非常相似，因此发生这种情况的原因不大可能是 Skyline 选择了错误的 100 amol 峰值。另外请注意，对于高分辨率数据，Skyline 在峰保留时间注释下方显示了一个质量误差值，表示预期质荷比值和峰值中各点加权平均值之间的差异。上图显示的整体趋势相当不错，较高强度的数据倾向于比较低强度的数据更加精确，这可能是由于噪声引起的强度变化比例造成的。

您可以执行下列操作，更加深入地了解 50 amol 样品的强度方面的问题：

- 在视图菜单中选择峰面积，并单击重复测定比较 (F7)。
- 右键单击峰面积图，然后单击对数尺度。

执行这项操作后峰面积图将显示如下：



在此视图中，50 amol 样品似乎比 100 amol 样品更加接近 10 fmol 样品。如果查看其它 4 个肽段，会发现在 (SLHTLFGDELCK 和 KVPQVSTPTLVEVSR) 这两个肽段中，50 amol 样品的总峰值强度实际大于 10 fmol 样品，不过另外两个峰值较小。显然，此样品的浓度实际并不是 50 amol。反应介于 10 fmol 和 100 fmol 之间的两个肽段给人的印象是其实际浓度介于这些浓度之间，但在这种情况下其它 3 个肽段较弱。

值得检查的另一件事为样品实际是否是以数字前缀 (1, 2, 3 ... 6) 显示的顺序进行测定的。要完成此检查，请执行下列步骤：

- 右键单击峰面积图，选择**顺序**，然后单击**采集时间**。

您会看到图形不会发生变化，这意味着样品确实是以指示的顺序采集的。为了减少交叉污染带来的影响，这种响应曲线通常是从最低浓度到最高浓度采集。

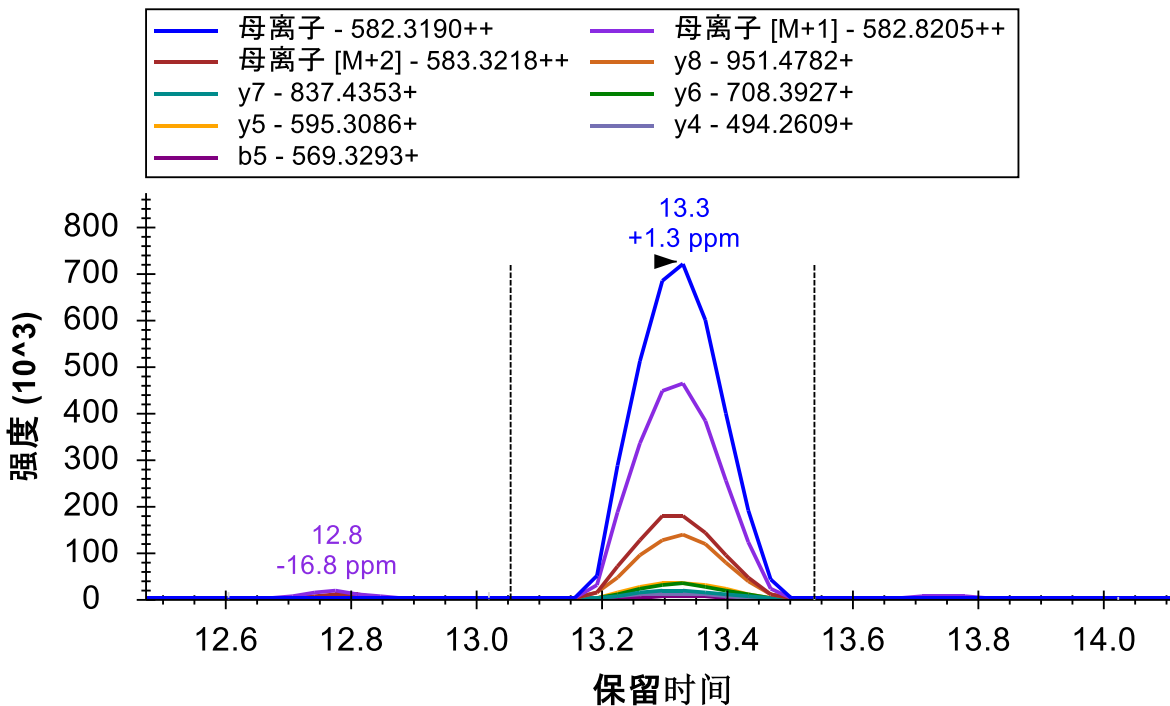
通过 Skyline，您可以非常快速地深入了解浓度曲线数据的质量。

作为最后的验证步骤，您可能需要查看经 MS1 筛选的母离子峰值，以确定它们是否相似。要查看 MS1 峰值，请执行下列步骤：

- 在**视图菜单**中选择**离子对**，然后单击**全部** (Shift-F10)。
- 在**视图菜单**上选择**离子对**，然后单击**分割图**。

此时，色谱图将显示如下：

K.LVNELTEFAK.T (500 fmol)

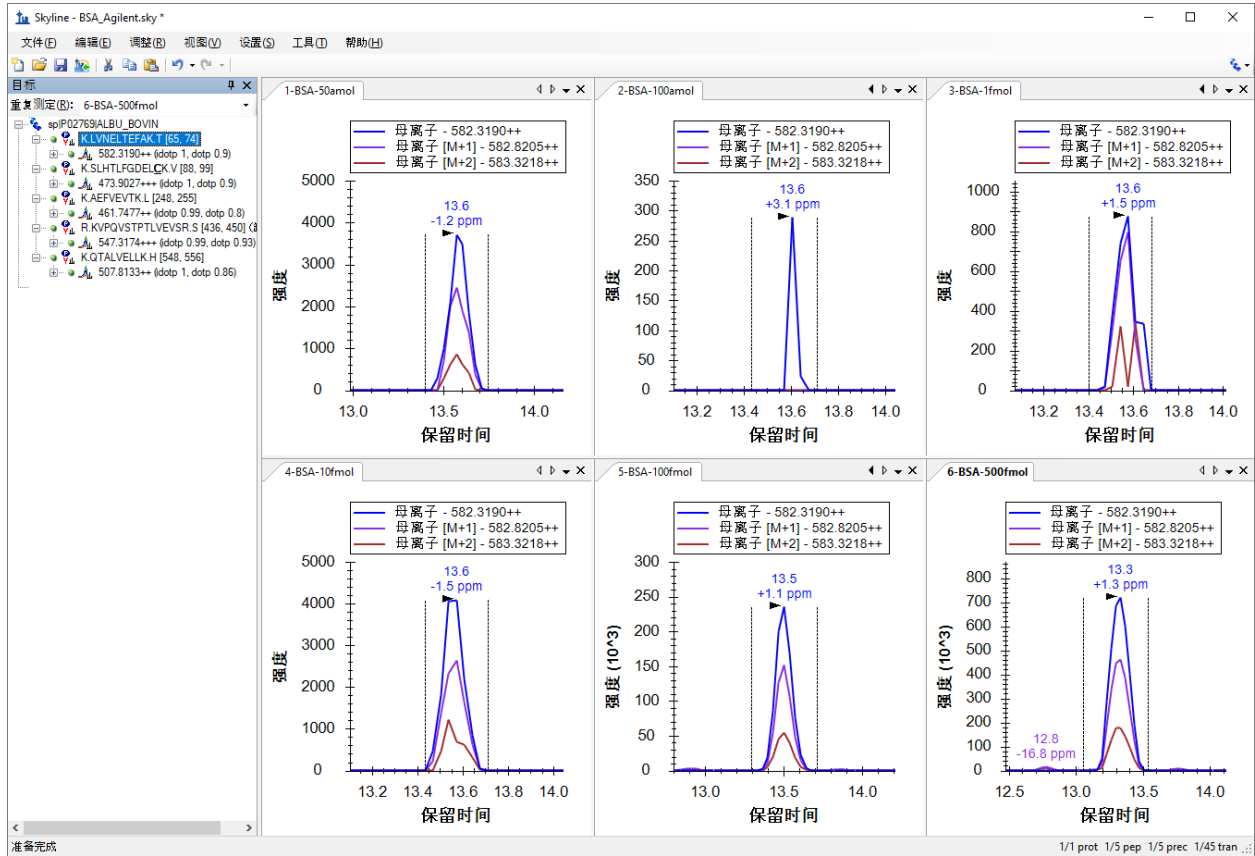


与以前一样，您可以查看最强的子离子 (y8)，它达到了单一同位素母离子强度的 1/5 (1.4×10^5 v. 7.2×10^5)，不过 M+2 峰值仍比 y8 峰值更强。

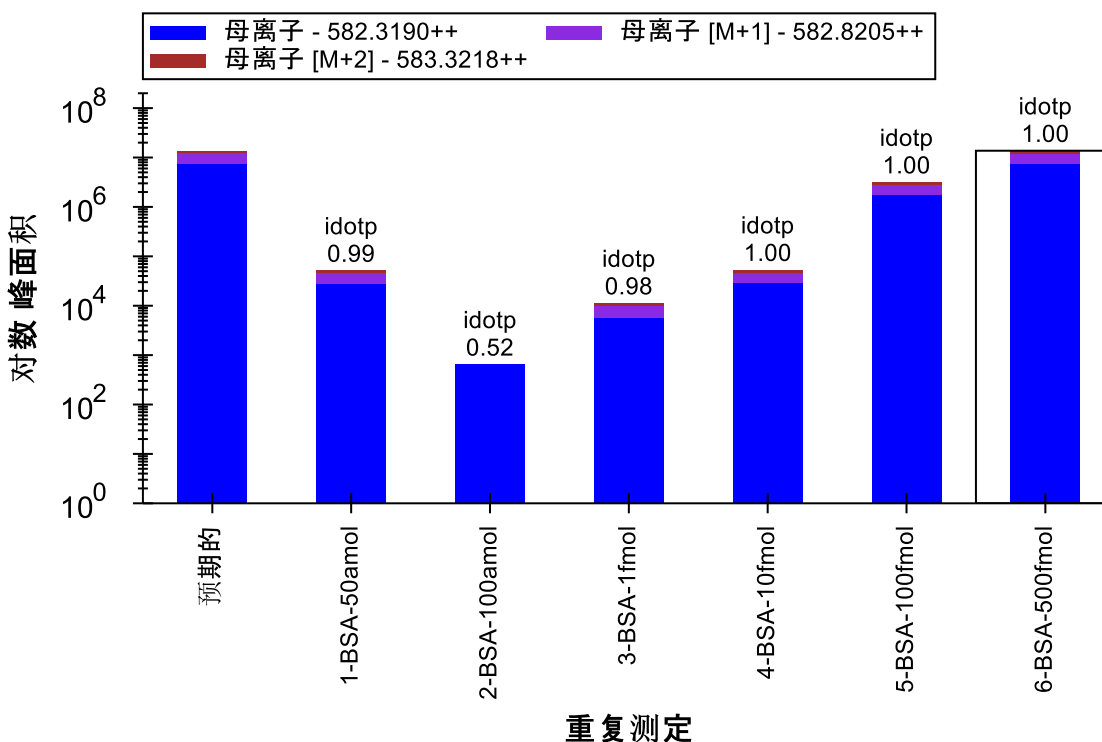
要单独查看母离子峰值，请执行下列步骤：

- 在视图菜单中选择离子对，并单击母离子 (Alt-F10)。

此操作过后 Skyline 应显示如下：



峰面积图将显示如下：



此时再次分别查看这 5 个肽段，可以发现各浓度点的相对强度与通过子离子比较得到的强度非常相似。

结语

在本教程中，您学习了如何设置 Skyline 文档以执行 PRM 实验。设置后就可以在离子阱和 Q-TOF（以及 Q-Orbitrap）仪器上执行类似 SRM 的实验。您也可使用这种技术在全扫描仪器上定期进行系统适用性、质量控制或诊断测试。您学习了如何导出目前适用于 Thermo、SCIEX 和 Bruker 仪器的 PRM 方法，如何使用 Skyline 报告获取适用于那些目前尚不支持方法导出的仪器的目标母离子质荷比值列表。（备注：Skyline 现在可以导出 Agilent、SCIEX、Thermo 和 Waters 仪器的 PRM 分离列表。）您学习了如何导入本地结果文件，还学习了如何从这些文件中可能包括的 MS1 扫描中提取色谱图。导入后将出现一些新的注释，如所含 MS1 扫描的针对离子对节点的同位素排名和同位素分布点积，并且您可以选择仅查看 MS1 或串联质谱扫描中的信息。否则，应从三重四级杆 SRM 实验或教程熟悉了解 Skyline 为帮助您理解数据而提供的色谱图、摘要图和报告。

参考文献

1. Stacy D. Sherrod *et al.* Label-Free Quantitation of Protein Modifications by Pseudo-Selected Reaction Monitoring with Internal Reference Peptides. *J. Proteome Res.* (submitted)
2. Schilling, B. *et al.* Platform Independent and Label-Free Quantitation of Proteomic Data Using MS1 Extracted Ion Chromatograms in Skyline. Application to Protein Acetylation and Phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* (2012).doi:10.1074/mcp.M112.017707