

Skyline 小分子目标

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。Skyline 最初系为蛋白质组学应用而开发，其应用范畴现已延伸到普遍分子领域。您可以参阅多种教程，这些教程可帮助您将 Skyline 用于各种各样的分析（SRM、PRM、MS1 筛选、DIA 等）。本教程重点介绍对靶向非蛋白质组分子使用 Skyline 的差异。

在本教程中，您将针对一组甲硫氨酸代谢途径化合物建立 SRM 分析。

Skyline 旨在提供一个不区分质谱仪供应商且可用于靶向定量质谱研究的平台。该平台可以导入在不同仪器供应商的质谱仪上采集的原始数据，例如 Agilent、Bruker、SCIEX、Shimadzu、Thermo-Scientific 和 Waters。通过导入不同仪器平台的数据，可极大地促进可重现方法的传播、实验室间的技能转移、不同仪器之间的比较以及大型多站点研究。这种方法在蛋白质组学领域已使用多年，所以在将 Skyline 用于普遍的目标小分子时同样奏效。

入门指南

要开始本教程，请下载下列 ZIP 文件：

https://skyline.ms/tutorials/SmallMolecule_3_6.zip

将文件解压到您电脑上的某个文件夹，比如：

C:\Users\bspratt\Documents

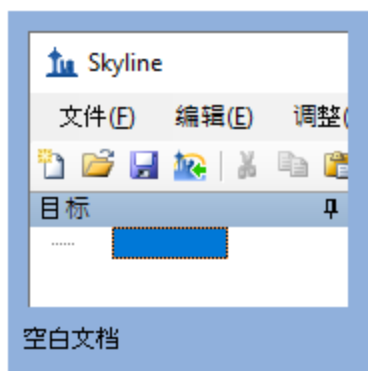
该操作将创建一个新文件夹：

C:\Users\bspratt\Documents\SmallMolecule

其中将包含本教程所需的所有文件。

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：

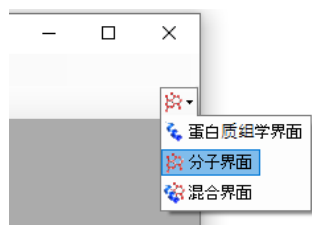



- 在**设置**菜单中单击**默认值**。
- 在询问您是否保存当前设置时，单击表单上的**否**。

该 Skyline 实例中的文档设置现已重置为默认值。

由于本教程涵盖小分子主题，您可以执行以下操作来选择分子界面：

- 单击 Skyline 窗口右上角的用户界面控件，然后单击类似于如下的**分子界面**：



Skyline 将在分子模式下运行，Skyline 窗口右上角随之显示分子图标 。原始蛋白质组学菜单和控件现已隐藏，便于您专心从事小分子分析。

将分子离子对列表导入 Skyline 文档

将分子离子对列表导入 Skyline 文档的捷径是从一个空白文档开始，然后使用**编辑 > 插入 > 离子对列表**菜单项。

注：也可以使用**文件 > 导入 > 离子对列表**菜单项，前提是您的数据中包含 Skyline 能够识别的列标题。有关可识别的列名称的列表，请在**编辑 > 插入 > 离子对列表**窗口中按“帮助”按钮。

Skyline 至少需要了解每个母离子和子离子的电荷数以及离子的分子式或**质荷比**。如果离子对列表中没有任何子离子信息，则视之为母离子目标列表。与肽段一样，Skyline 认为具有不同子离子信息的重复母离子信息表示单个母离子的多个离子对。

关于离子分子式和加合物描述的注释

在蛋白质组学应用中，Skyline 可以有把握地假定离子化通过质子化完成。因此，只需其序列和电荷数便足以描述带电荷的肽段。但普通分子可以通过多种方式（钠增加、氢损等）实现离子化。

在 Skyline 中，可以使用 <http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/Metabolomics/MS-Adduct-Calculator/> 中介绍的加合物样式描述指定这样的离子化模式，例如“[M+Na]”、“[M-2H]”、“[2M+ACN+H]”等。

加合物描述也可用于指示同位素标记的分子。例如，加合物“[M3Cl374H2-Na]”表示该分子有三个由 ³⁷Cl 取代的 Cl 原子，四个由氘取代的 H 原子，并且该分子由于 Na 损失而离子化。

对于分子式未知的分子，可以通过加合物显示质量变化。例如，“[M(-1.23)+H]”表示该分子的质量比未改变的形式小 1.23 AMU，并且该分子通过获取氢而实现离子化。

对于离子化方式未知的分子，加合物可仅指示电荷。例如，“[M+3]”表示电荷数为三。*质荷比值*为分子质量的 1/3。尽管可以同时使用母离子和子离子的 *质荷比值* 完整描述离子对列表，但如果没有化学式，Skyline 就无法提供同位素分布。因此，最好提供中性分子和加合物描述的化学式。

插入离子对列表

要开始创建第一个以非蛋白质组分子为目标的 Skyline 文档，请执行以下操作：

- 在教程文件夹中找到“SMTutorial_TransitionList.csv”文件，然后在 Excel 中打开。
- 在 Skyline 编辑菜单上选择**插入**，然后单击**离子对列表**。

Skyline 将显示**插入**表单，该表单应如下所示：

分子列名称	母离子名称	母离子公式	母离子加合物	母离子质荷比	母离子电荷	子离子名称	子离子公式	子离子加合物	子离子质荷比	子离子电荷	标记类型	明确保留时间	明确保留时间窗口	明确碰撞能量	注释	InChIKe
▶*																

肽段(P) 分子(M) 列(U) 帮助(H) 检查错误(E) **插入(I)** 取消(C)

在您下载的离子对列表电子表格中，应当可以看到以下值：

Molecule List Name	Precursor Name	Precursor Formula	Precursor Adduct	Precursor Charge	Precursor RT	Precursor CE	Product m/z	Product Charge	Label
Amino Acid	Methionine	C5H11NO2S	[M+H]	1	2.5	15	104.07	1	
Amino Acid	Methionine	C5H8H'3NO2S	[M+H]	1	2.5	15	107.09	1	heavy
Amino Acid	Isoleucine	C6H13NO2	[M+H]	1	2.9	15	86.096	1	
Amino Acid	Leucine	C6H13NO2	[M+H]	1	3	15	86.096	1	
Amino Acid	Leucine	C6H10H'3NO2	[M+H]	1	3	15	89.1	1	heavy
Amino Acid	Phenylalanine	C9H11NO2	[M+H]	1	3.1	15	120.08	1	
Amino Acid	Phenylalanine	C9H11NO2	[M6C13+H]	1	3.1	15	126.11	1	heavy
Amino Acid	Arginine	C6H14N4O2	[M+H]	1	2.01	15	116.07	1	
Amino Acid	Arginine	C1C'5H14N4O2	[M+H]	1	2.01	15	121.11	1	heavy
Amino Acid	Ornithine	C5H12N2O2	[M+H]	1	0.85	15	70.07	1	
Amino Acid	Ornithine	C5H12N2O2	[M+H]	1	0.85	15	116.07	1	
Amino Acid	Ornithine	C5H10H'2N2O2	[M+H]	1	0.85	15	72.07	1	heavy
Amino Acid	Ornithine	C5H10H'2N2O2	[M+H]	1	0.85	15	118.07	1	heavy
Organic Acid	creatine	C4H9N3O2	[M+H]	1	1.1	15	90.06	1	
Organic Acid	creatine	C4H6H'3N3O2	[M+H]	1	1.1	15	93.06	1	heavy
5'-methylthioadenosine	MTA	C11H15N5O3S	[M+H]	1	3.4	15	136.1	1	
5'-methylthioadenosine	MTA	C11H12H'3N5O3S	[M+H]	1	3.4	15	136.1	1	heavy
S-adenosyl methionine	SAM	C15H22N6O5S	[M+H]	1	2.9	15	250.11	1	
S-Adenosyl homocysteine	SAH	C14H20N6O5S	[M+H]	1	2.9	15	136.08	1	
Polyamine	Spermidine	C7H19N3[M+H]		1	3.3	15	129.15	1	
Polyamine	Spermine	C10H26N4	[M+H]	1	3.5	15	112.112	1	

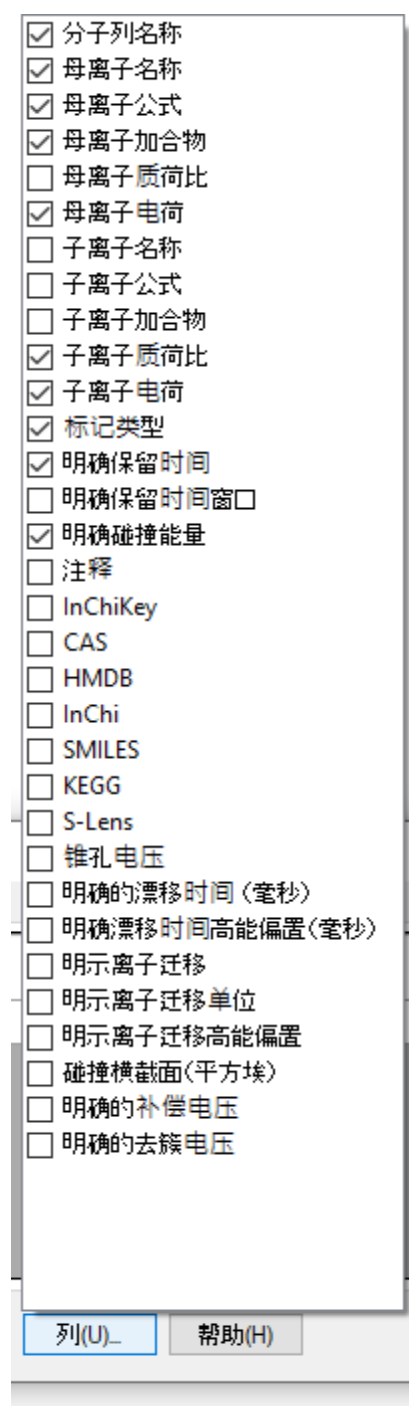
关于离子的分子式和加合物描述的进一步注释

本例中有一些成对的轻/重同位素标记，例如 Methionine 和 d3-Methionine。在离子对列表中，它们描述为 **C5H11NO2S [M+H]** 和 **C5H8H'3NO2S [M+H]**，但也可以使用加合物描述的方式描述为 **C5H11NO2S [M+H]** 和 **C5H11NO2S [M3H2+H]**。您可以在轻/重 Phenylalanine 对中看到这样一个这样的例子：虽然分子式相同，但重加合物描述指定了 6 个碳原子由 C13 取代。注意，加合物列供选填：例如在 Spermidine 的例子中，加合物可以作为离子分子式的一部分提供。还要注意，Precursor Charge 列其实并无存在的必要：从加合物描述中就可以推断出电荷数。严格来说，Label 列也并无存在的必要：从母离子分子式和/或加合物可以推断出 heavy 标记。

可以看到，插入表单中还有一些额外的列标题，并且表单中的列序与电子表格中的列序不同。通过执行以下步骤，可以很容易地解决这两个问题：

- 单击列按钮。

此时会显示列选择菜单，如下所示：



- 取消选中未出现在电子表格中的列。

接下来执行以下操作，以重新排列**插入**表单中的列：

- 单击并拖动每个列标题，使之匹配电子表格中的顺序。

选择并排列各列后，插入表单应如下所示：

	分子列名称	母离子名称	母离子公式	母离子加合物	母离子电荷	明确保留时间	明确碰撞能量	子离子质荷比	子离子电荷	标记类型
*										

要添加电子表格中指定的离子对，请执行以下操作：

- 选择电子表格的内容，但不要包含标题所在的第一行。
- 单击工具栏上的复制按钮（或按键盘上的 Ctrl-C）。
- 切换回 Skyline。
- 将表单中的第一个单元格突出显示为蓝色，然后按键盘上的 Ctrl-V 进行粘贴。
- 单击检查错误按钮。

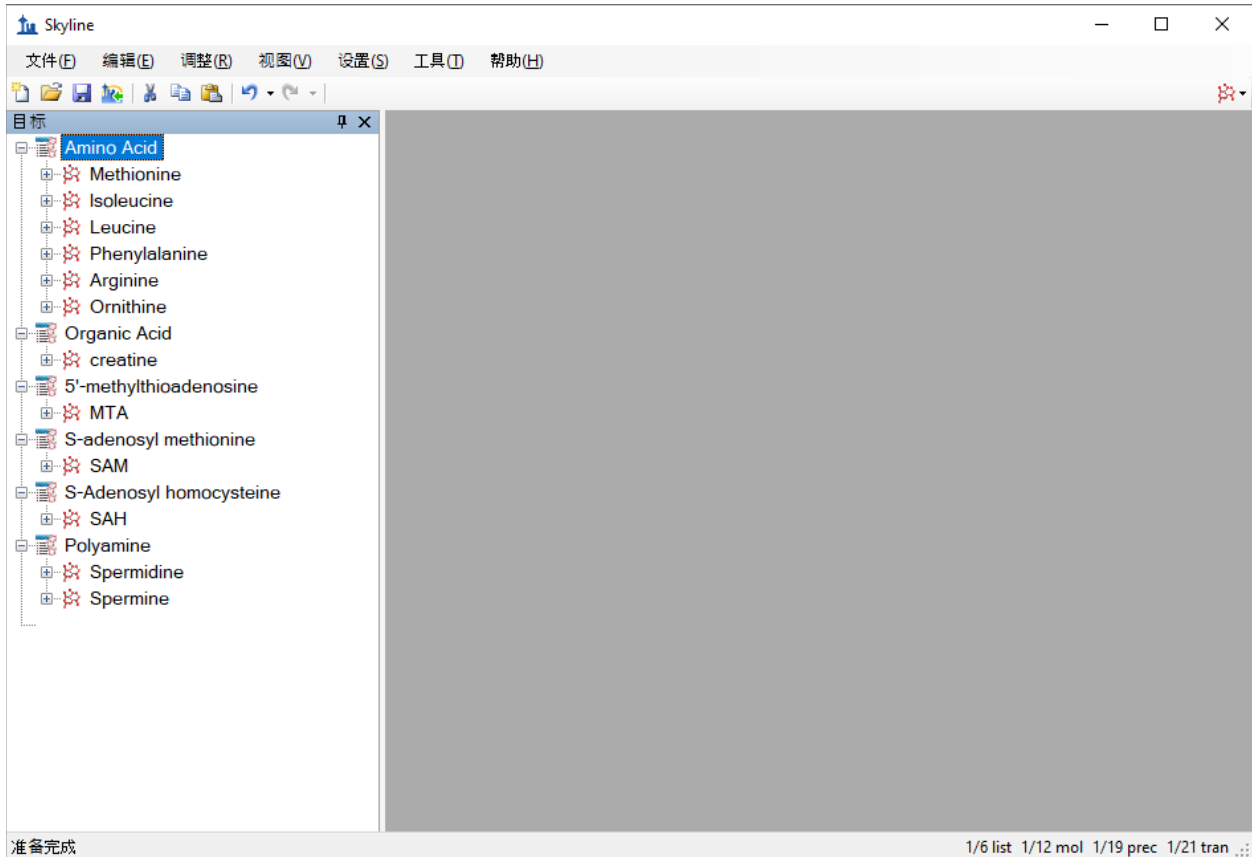
注：如果您不小心复制了标题行或弄错了列序，此时会显示错误消息。

插入表单应显示如下：

	分子列名称	母离子名称	母离子公式	母离子加合物	母离子电荷	明确保留时间	明确碰撞能量	子离子质荷比	子离子电荷	标记类型
▶	Amino Acid	Methionine	C5H11NO2S	[M+H]	1	2.5	15	104.07	1	
	Amino Acid	Methionine	C5H8H'3N...	[M+H]	1	2.5	15	107.09	1	heavy
	Amino Acid	Isoleucine	C6H13NO2	[M+H]	1	2.9	15	86.096	1	
	Amino Acid	Leucine	C6H13NO2	[M+H]	1	3	15	86.096	1	
	Amino Acid	Leucine	C6H10H'3...	[M+H]	1	3	15	89.1	1	heavy
	Amino Acid	Phenylalani...	C9H11NO2	[M+H]	1	3.1	15	120.08	1	
	Amino Acid	Phenylalani...	C9H11NO2	[MGC13+H]	1	3.1	15	126.11	1	heavy
	Amino Acid	Arginine	C6H14N4O2	[M+H]	1	2.01	15	116.07	1	
	Amino Acid	Arginine	C1C'5H14N...	[M+H]	1	2.01	15	121.11	1	heavy
	Amino Acid	Ornithine	C5H12N2O2	[M+H]	1	0.85	15	70.07	1	
	Amino Acid	Ornithine	C5H12N2O2	[M+H]	1	0.85	15	116.07	1	

- 单击**插入**按钮。

现在 Skyline 窗口将显示如下：



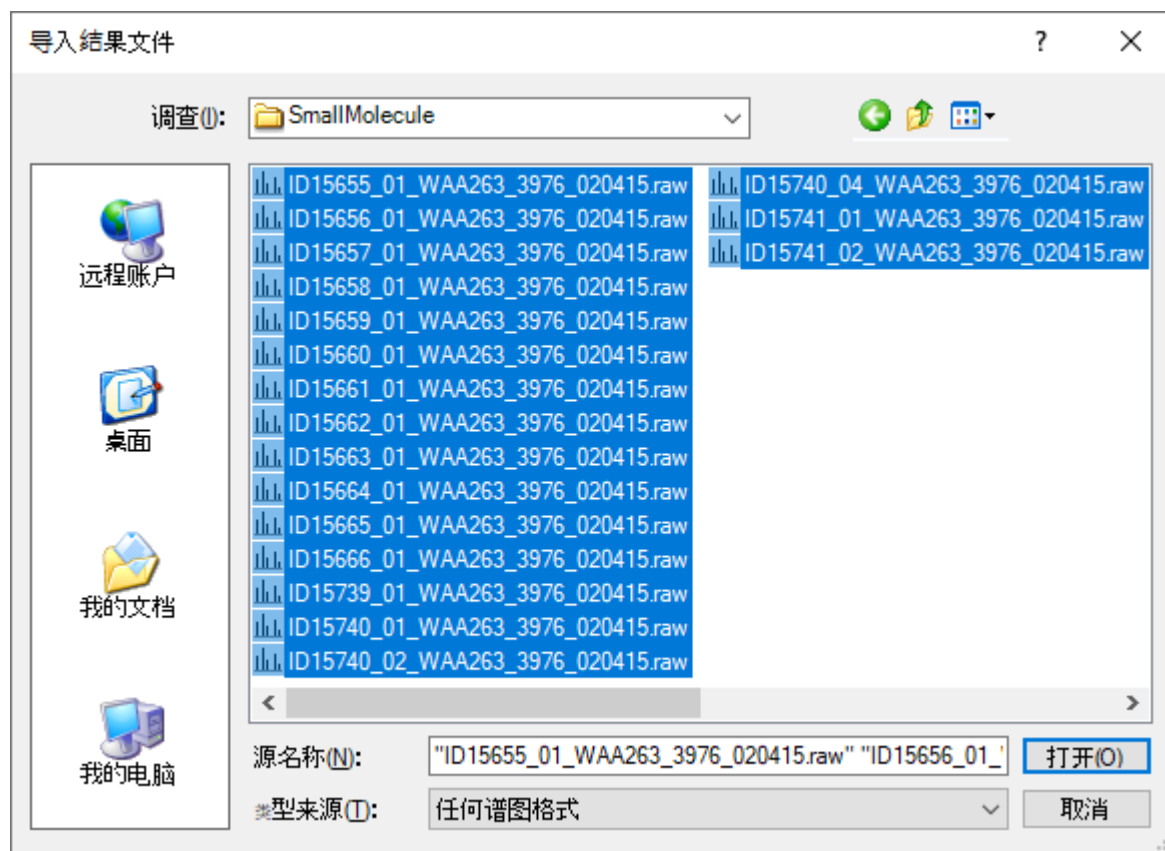
此时可以导出原生仪器方法、母离子分离列表（用于 PRM）或离子对列表（用于 SRM）。有关如何执行此步的更多详细信息，请参见[靶向方法编辑](#)、[现有实验与定量实验](#)或[靶向 MS/MS \(PRM\)](#) 教程。

导入质谱仪运行结果

在本教程中，您只需导入在 Waters Xevo TQS 仪器上使用 Skyline 导出的 MassLynx 仪器方法获取的原始数据。若现在要导入，请执行下列步骤。

- 在**文件**菜单上，单击**保存**。(Ctrl-S)
- 将该文档以名称“Amino Acid Metabolism.sky”另存到您创建的教程文件夹中。
- 在**文件**菜单中选择**导入**，然后单击**结果**。
- 在**导入结果**表单中，选择在**文件中导入** **单次进样重复测定**。
- 在表单底部的**要同时导入的文件**下拉列表中，单击**许多个**，使用该选项可以提供最佳导入性能。
- 单击**确定**按钮。
- 单击列出的第一个文件夹，然后在按住 **Shift** 键的情况下单击最后一个文件夹，即可将教程文件夹中的 18 个原始数据文件夹全部选定。

导入结果文件表单应显示如下：



- 单击**打开**按钮。
- 在**导入结果**表单中，当系统询问您是否删除公共前缀时，选择**请勿删除**选项。
- 单击**确定**按钮。

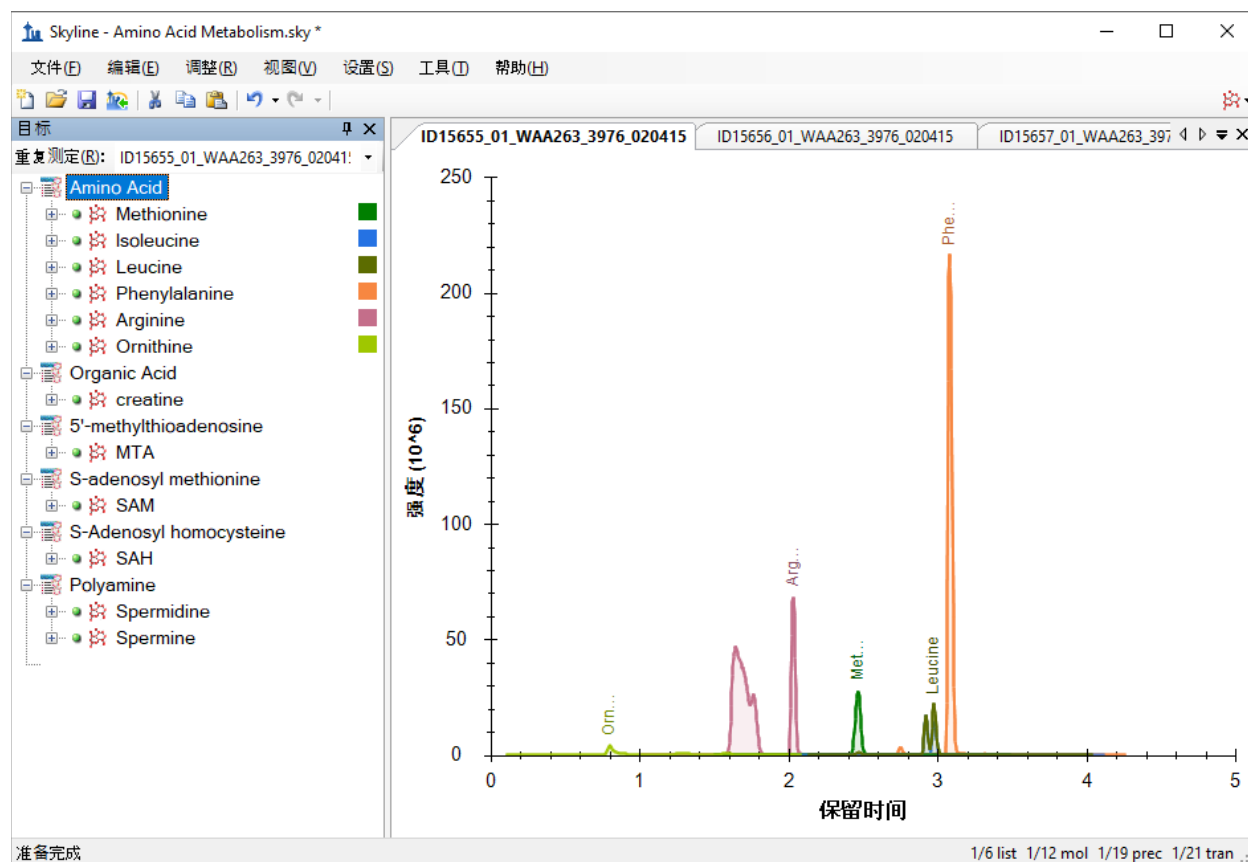
这些文件包含在去除特定氨基酸条件下，从癌细胞系中提取的代谢产物。与对照（所有氨基酸）相比，细胞缺少了氨基酸甲硫氨酸或精氨酸，或二者皆已去除，持续时间为 3 小时。¹

文件名与条件：

ID15739_01_WAA263_3976_020415 – 双空白
ID15740_01_WAA263_3976_020415 – 提取空白（含 SIL 标准品）
ID15740_02_WAA263_3976_020415 – 提取空白（含 SIL 标准品）
ID15740_04_WAA263_3976_020415 – 提取空白（含 SIL 标准品）
ID15655_01_WAA263_3976_020415 – 全部 AA 样品 1
ID15656_01_WAA263_3976_020415 – 全部 AA 样品 2
ID15657_01_WAA263_3976_020415 – 全部 AA 样品 3
ID15658_01_WAA263_3976_020415 – Minus Met 样品 1
ID15659_01_WAA263_3976_020415 – Minus Met 样品 2
ID15660_01_WAA263_3976_020415 – Minus Met 样品 3
ID15661_01_WAA263_3976_020415 – Minus Arg 样品 1
ID15662_01_WAA263_3976_020415 – Minus Arg 样品 2

ID15663_01_WAA263_3976_020415 – Minus Arg 样品 3
 ID15664_01_WAA263_3976_020415 – Minus Arg, Minus Met 样品 1
 ID15665_01_WAA263_3976_020415 – Minus Arg, Minus Met 样品 2
 ID15666_01_WAA263_3976_020415 – Minus Arg, Minus Met 样品 3
 ID15741_01_WAA263_3976_020415 – 储集的 QC 样品 1
 ID15741_02_WAA263_3976_020415 – 储集的 QC 样品 2

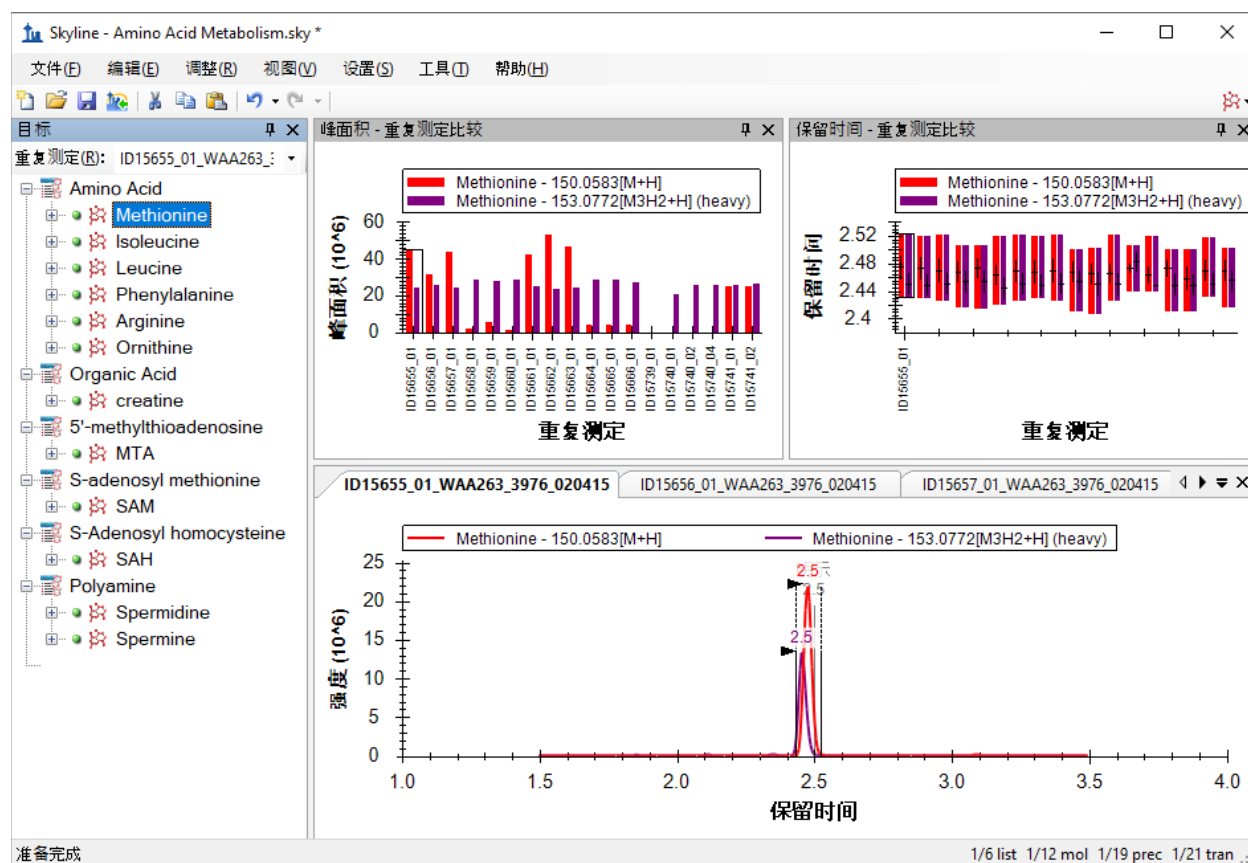
这些文件应在短短数秒内导入，之后 Skyline 窗口将显示如下：



要利用 Skyline 摘要图查看各个目标，请执行以下操作：

- 在视图菜单中选择峰面积，然后单击重复测定比较。
- 在视图菜单中选择保留时间，然后单击重复测定比较。
- 单击并拖动这些视图，以将其停靠在色谱图上方。
- 在目标视图中，选择第一个目标“Methionine”。

此时 Skyline 窗口将显示如下：



结语

在本教程中，您了解了如何创建以分子为目标的 Skyline 文档，这些小分子被它们的母离子分子式、加合物以及子离子质荷比值所标识。您导入了由代谢组学研究人员收集的多重重复测定数据集，了解了最初为靶向蛋白质组学应用而创建的 Skyline 功能中，有多少现成的功能可以应用于非蛋白质组分子数据。

参考书目

1. Tang, X. *et al.* Comprehensive Profiling of Amino Acid Response Uncovers Unique Methionine-Deprived Response Dependent on Intact Creatine Biosynthesis. *PLoS Genet* **11**, e1005158 (2015).