

# Skyline 小分子の定量化

---

Skyline ターゲット質量分析環境は、Skyline ドキュメントにインポートする質量分析計の raw データの情報を視覚的に表示します。本来プロテオミクスの使用目的で開発された Skyline ですが、一般化分子でも作業できるように拡張されています。本チュートリアルは、外部校正曲線と安定した同位体標識の内部標準を使用して単一の小分子のターゲット定量化に Skyline を使用する比較的簡単な例を説明します。

本チュートリアルでは、TQ-MS（この例ではクラッシュした血漿から）に基づいて、すでに実行している可能性のあるメソッド（薬物動態アッセイなど）から開始するターゲット定量化について学習します。本データセットの分析では、以下を学習します。

- 既知のトランジションの単純なセットの挿入
- 非プロテオミクス分子のデータ分析とピーク積分
- Skyline での小分子の定量化ワークフロー

また、このチュートリアルのベースとなっている [Skyline チュートリアルウェビナー16](#) の後半もご覧ください。

Skyline は、ターゲット定量的質量分析研究のためのメーカーに依存しないプラットフォームの提供を目指しており、Agilent、SCIEX、Bruker、Shimadzu、Thermo-Scientific、および Waters の各メーカーの装置から raw データをインポートできます。さまざまな装置プラットフォームからデータをインポートすることで、装置間の比較および複数施設間での共同研究や比較が容易になります。これは、プロテオミクスの分野で何年もそうであったように、小分子をターゲットとするために Skyline を使用する際も同様です。

まだ「[Skyline 小分子ターゲット](#)」チュートリアルをご覧になっていない場合はぜひご覧いただき、Skyline が化学式や付加物など、小分子の説明でどのように動作するか、複数の基本を取得してください。

## はじめに

チュートリアルを始める前に、以下の zip ファイルをダウンロードしてください。

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

この中のファイルを、以下のコンピュータ上のフォルダに解凍します。

C:\Users\bspratt\Documents

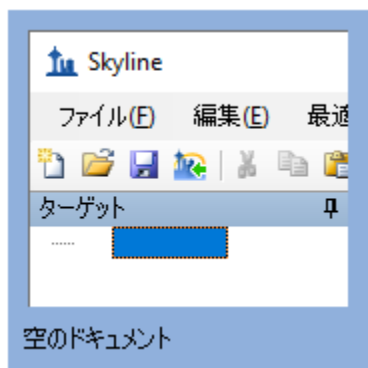
これにより以下の新しいフォルダが作成されます。

C:\Users\bspratt\Documents\SmallMoleculeQuant

フォルダには、このチュートリアルに必要なすべてのファイルが含まれています。

本チュートリアルを始める前に Skyline を使用していた場合には、Skyline をデフォルト設定に戻すことをお勧めします。デフォルト設定に戻すには、以下の操作を行います。

- Skyline を起動します。
- 開始ページで、以下のような空のドキュメントをクリックします。

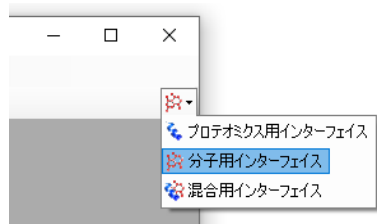



- [設定]メニューで、[デフォルト]をクリックします。
- 現在の設定を保存するかどうかを尋ねるフォームで[いいえ]をクリックします。

Skyline のこのインスタンスのドキュメント設定がデフォルトにリセットされました。

このチュートリアルは小分子に関するものであるため、以下のようにして分子用インターフェイスを選択できます。

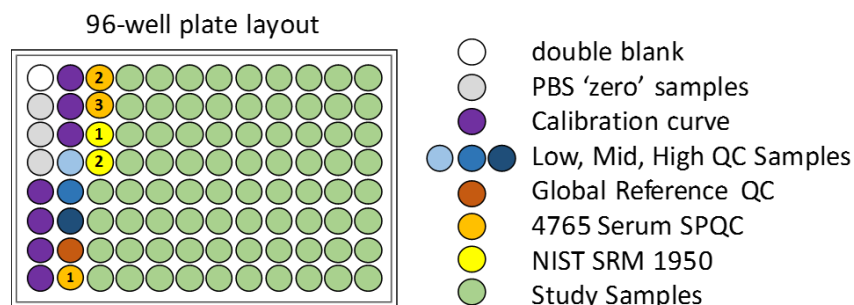
- Skyline ウィンドウの右上隅にあるユーザーインターフェイス管理をクリックし、[分子用インターフェイス]を選択します。



Skyline は、Skyline ウィンドウの右上隅の分子アイコン  で表示される分子モードで動作しています。元のプロテオミクスメニューやコントロールが表示されなくなり、小分子の分析に集中できます。

## 実験のレイアウト

本実験は、生物学的分析法の検証に関する FDA ガイダンスに従って設計されたため、研究試料以外のものも含まれています。プレートレイアウトに関する全説明や、このような研究で典型的に使用される実行順序が公開されています (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29039849>)。簡単に言うと、本データセットの試料は、以下のように 96 個のウェルプレートに配列されました。



ブランク、または「ゼロ」標準には内部標準のみが含まれており、ダブルブランクには標準が一切含まれていません。

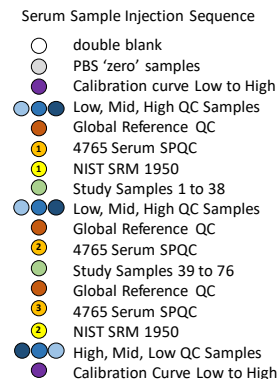
校正曲線試料は、校正の一連の希釈です。

QC 試料は、「既知の不明試料」です。これは品質用の比較対照試料であり、本研究では不明試料として扱われます。実際には、結果がどうなるかはわかっており、したがってそれを使用して測定の精度を確認することができます。

血清 SPQC は血清プールされた QC であり、研究を通して定量的再現性が一定しているかを確認するために実験開始時、中間点、実験終了時の複数ポイントで実行される全研究試料のプールです。

NIST SRM 1950 は、国立標準技術研究所 (National Institute for Standards and Technology、NIST) からのプールされた血漿標準であり、「正常な」血漿代謝産物測定の参照基準として全研究者が利用できるものです。これは、さまざまな研究所における研究での参照となります。

注入は以下のような順序で実行されました。



これらの試料の質量分析データの収集では、全部で **113** 回の注入が行われました。

## 内部標準

本研究では、分子と内部標準の **2** つのターゲットしかありません。内部標準とは、同位体で標識された分子の変異型であり、つまり共溶出です。また、分子の **1** つを代理標準として宣言することで関連していない分子間の関係を確立することもできます。代理標準法は、「[Skyline 高分解能メタボロミクス](#)」チュートリアルで取り上げています。

## 小分子トランジションリストの Skyline ドキュメントへのインポート

小分子トランジションリストを Skyline ドキュメントに取り込む最も簡単な方法は、空のドキュメントから始めて、**[編集]>[挿入]>[トランジションリスト]**メニュー項目を利用することです。

これを開始するには、以下の操作を行います。

- Skyline **[編集]**メニューで**[挿入]**を選択して、**[トランジションリスト]**をクリックします。

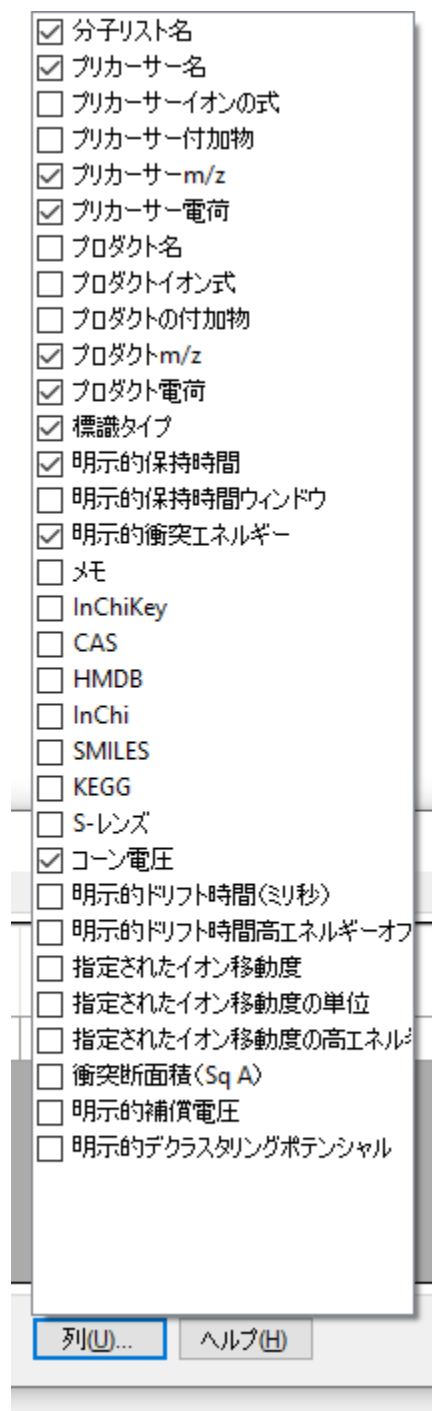
Skyline が [挿入] フォームを表示します。

分子リスト名	プリカーサー名	プリカーサーイオンの式	プリカーサー付加物	プリカーサー m/z	プリカーサー電荷	プロダクト名	プロダクトイオン式	プロダクトの付加物	プロダクト m/z	プロダクト電荷	標識タイプ	明示的保持時間	明示的保持時間ウィンドウ	明示的衝突エネルギー	メモ	InChIKey
▶*																

通常は、トランジションリストを Excel や他の外部ソースからコピーして貼り付けますが、この場合はトランジションリストが十分に小さいため、手作業で入力できます。

現在は [挿入] フォームにたくさん列があるのがわかります。本チュートリアルでは、異なる列順序によるメリットもあります。どちらの問題も、簡単に修正できます。

- [列] ボタンをクリックし、ポップアップリスト内のチェックボックスをクリックして以下のようにします。



次に、以下の操作を行って、[挿入]フォームの列を再度並べ替えます。

- 各列ヘッダーをクリック&ドラッグして、以下と順序が一致するように移動します。

挿入

トランジションリスト

	分子リスト名	プリカーサー名	標識タイプ	プリカーサーm/z	プリカーサー電荷	プロダクトm/z	プロダクト電荷	イオン電圧	明示的衝突エネルギー	明示的保持時間
*										

ペプチド(P)     分子(M)    列(U)...    ヘルプ(H)    エラーを確認(E)    **挿入(I)**    キャンセル(C)

[挿入]フォームに以下の値を入力します（またはこのPDFから値をコピーして貼り付けると更に簡単です）。

- 以下の2行を選択し、ドラッグしてコピー（Ctrl+C）します。

DrugX,Drug,light,283.04,1,129.96,1,26,16,2.7

DrugX,Drug,heavy,286.04,1,133.00,1,26,16,2.7

- [挿入]フォームの選択したセルが上記と同じように表示されていることを確認し（すべて青で点滅しているカーソルがない）、貼り付けます（Ctrl+V）。

誤って列の順序が違う場合は、この時点で誤りが確認できます。そうでなければ、[挿入]フォームは以下ようになります。

トランジションリストを挿入

エラーなし

トランジションリスト

	分子リスト名	プリカーサー名	標識タイプ	プリカーサーm/z	プリカーサー電荷	プロダクトm/z	プロダクト電荷	イオン電圧	明示的衝突エネルギー	明示的保持時間
▶	DrugX	Drug	light	283.04	1	129.96	1	26	16	2.7
	DrugX	Drug	heavy	286.04	1	133.00	1	26	16	2.7
*										

ペプチド(P)     分子(M)    **列(U)...**    ヘルプ(H)    エラーを確認(E)    挿入(I)    キャンセル(C)

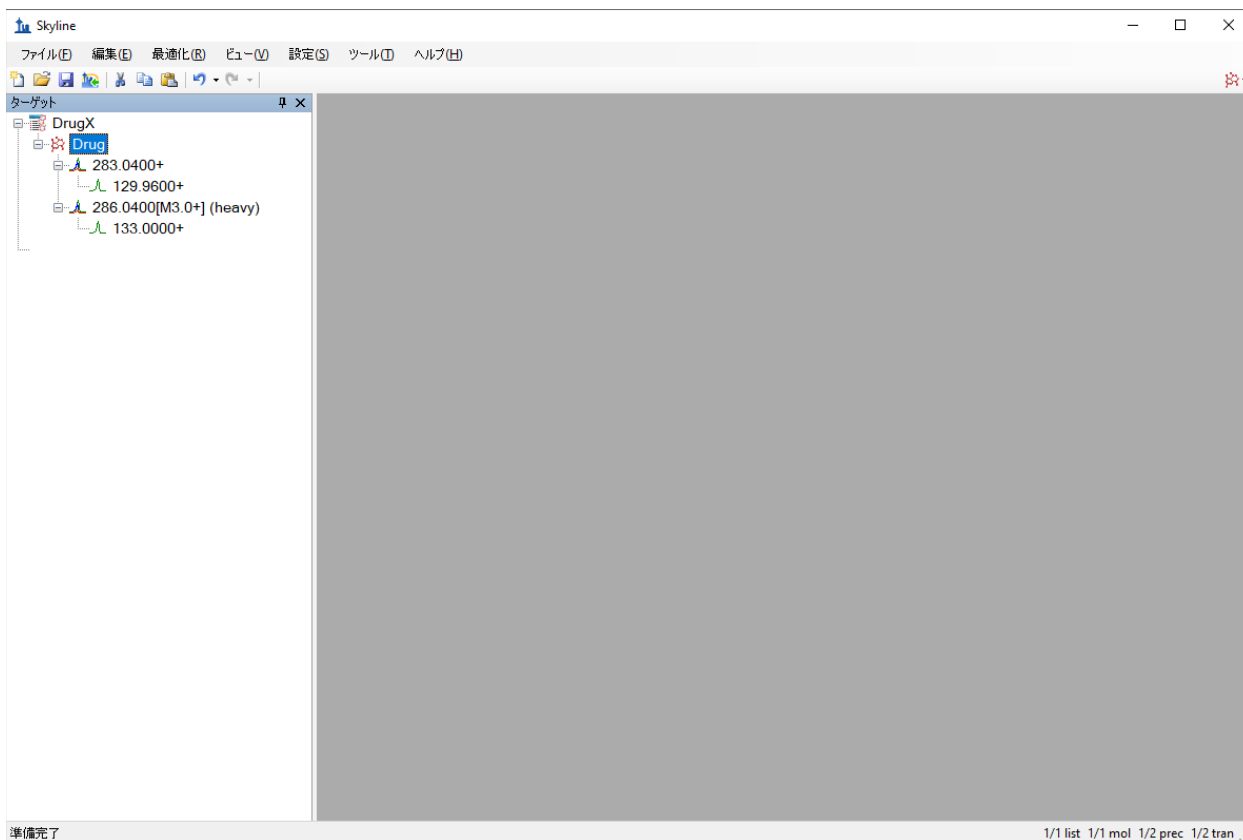
- [挿入]ボタンをクリックします。

注：本チュートリアルでは、このターゲットに対して  $m/z$  と電荷値のみを提供しています。Skyline は、化学式やヘビー同位体標識など、さらに高レベルの説明も受け入れられます。フルスキャンや高分解能データを使って作業するときには、化学式があると Skyline が同位体分布を計算できるため特に有用ですが、今回のような SRM データの場合は、 $m/z$  と電荷を使用するのが適切です。

新たにインポートされたターゲットを詳細まですべて見るには、以下の操作を行います。

- [編集]メニューで[すべて展開]を選択して、[プリカーサー]をクリックします。

これで Skyline ウィンドウは以下のようになります。



## トランジションの設定

次の手順は、トランジション設定が実験的な質量分析計の結果をインポートするのに正しいことを確認するものです。これには、以下の手順を実行します。

- [設定]メニューで[トランジション設定]をクリックします。
- [予測]タブの[衝突エネルギー]ドロップダウンリストで、「Waters Xevo」を選択します。
- [最適化値が存在する場合に使用する]チェックボックスをオンにします。



- これによって表示される [以下により最適化] ドロップダウンリストでは、[トランジション] を選択します。

[トランジション設定] フォームは以下のようになります。

トランジションの設定

予測 フィルタ ライブラリ 装置 フルスキャン

プリカーサー質量(P):  
モノアイソトピック

プロダクトイオン質量(Q):  
モノアイソトピック

衝突エネルギー(C):  
Waters Xevo

デクラスティングポテンシャル(D):  
なし

最適化ライブラリ(O):  
なし

補償電圧(V):  
なし

最適化値が存在する場合に使用する(U)

以下により最適化(P):  
トランジション

OK キャンセル

- [フィルタ] タブをクリックします。
- [プリカーサー付加イオン] フィールドで、テキストを「[M+H]」に変更します。
- [フラグメント付加イオン] フィールドで、テキストを「[M+]」に変更します。

[トランジション設定] フォームは以下のようになります。

トランジションの設定

予測 フィルタ ライブラリ 装置 フルスキャン

分子

プリカーサー付加イオン(A):  
[M+H]

フラグメント付加イオン(N):  
[M+]

イオンタイプ(I):  
f

プリカーサーm/zのexclusionウィンドウ(X):  
 m/z

OK キャンセル

[イオンタイプ] フィールドの値「f」は、フラグメントイオンのトランジションのみが測定されることを示します。プリカーサーイオンも測定したい場合には、「f,p」を使用します。

[装置] タブは、この実験に対してはデフォルト値でうまく行きます。ただし皆さん自身の作業においては、最小/最大  $m/z$  値が実際の装置の状況に合うことを確認してください。この設定の目的は、使用している質量分析計が実際に測定できないターゲットトランジションを追加できないようにすることです。

[装置] タブのもう1つの重要な設定が[メソッド許容誤差]です。これは、raw データファイルに保存される装置メソッドの  $m/z$  値が Skyline ターゲットリストの  $m/z$  値とどのくらいよく適

合する必要があるかを決定します。Skyline でのデフォルト値は 0.055 です。これは試験で使用される元の SRM ファイルが小数第 1 位（たとえば 784.3）まで指定されていたものの、多少の丸め誤差を含んでいたためです。Skyline からメソッドをエクスポートする場合は、もっと許容誤差を小さくできる可能性があります。

- [OK] ボタンをクリックします。

次の手順は、実験的な質量分析計結果のインポートです。

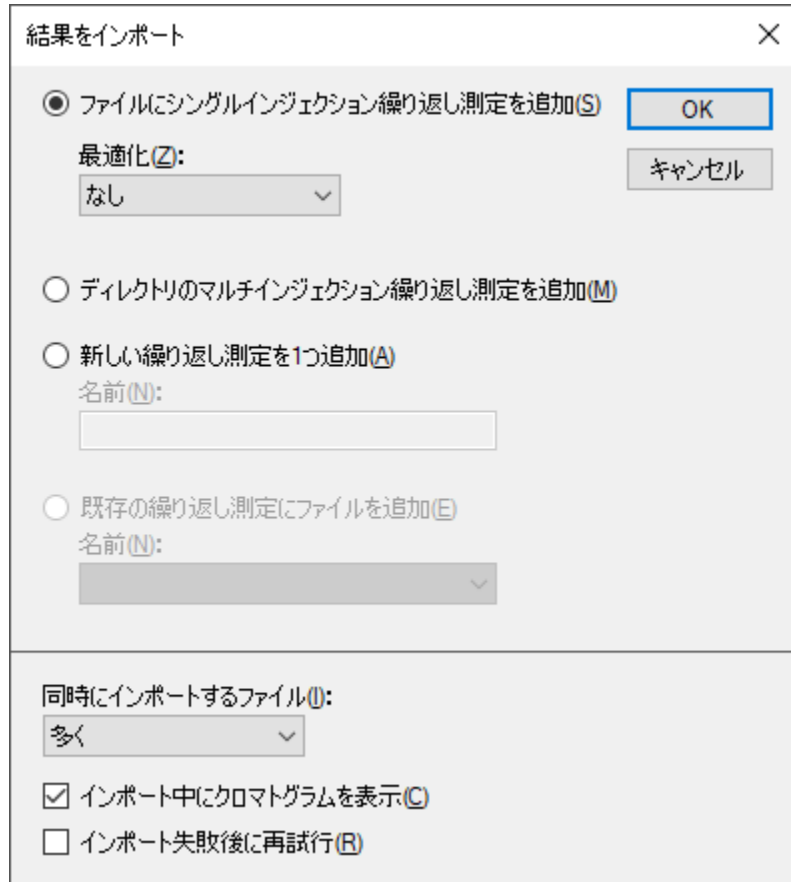
## 質量分析計実行のインポート

この実験には、関連する質量分析計データファイルが 113 個あります。このような場合は、校正曲線実行と品質管理 (QC) 実行すべてと併せてまず一握りの不明データをインポートすると有用です。しかしながら、もっと簡潔なドキュメントで開始してデータ品質を確認し、まずは数回の実行のみ、たとえば濃度が最も高い校正曲線の実行などをインポートして開始したいこともあるでしょう。

ここでは、以下の手順を実行してより曖昧なアプローチを取ります。

- [ファイル]メニューで、[保存]をクリックします。(Ctrl+S)
- このドキュメントを、「SMQuant\_v1.sky」という名前で本チュートリアル用に作成したフォルダに保存します。
- [ファイル]メニューで、[インポート]を選択して[結果]をクリックします。
- [結果をインポート]フォームで、[ファイルにシングルインジェクション繰り返し測定を追加]を選択します。フォームの下部にある[同時にインポートするファイル]ドロップダウンリストで、最良のインポートパフォーマンスを提供する[多く]を選択します。

[結果をインポート] フォームは以下ようになります。



結果をインポート

ファイルにシングルインジェクション繰り返し測定を追加(S)

最適化(O):   
なし

ディレクトリのマルチインジェクション繰り返し測定を追加(M)

新しい繰り返し測定を1つ追加(A)  
名前(N):

既存の繰り返し測定にファイルを追加(E)  
名前(N):

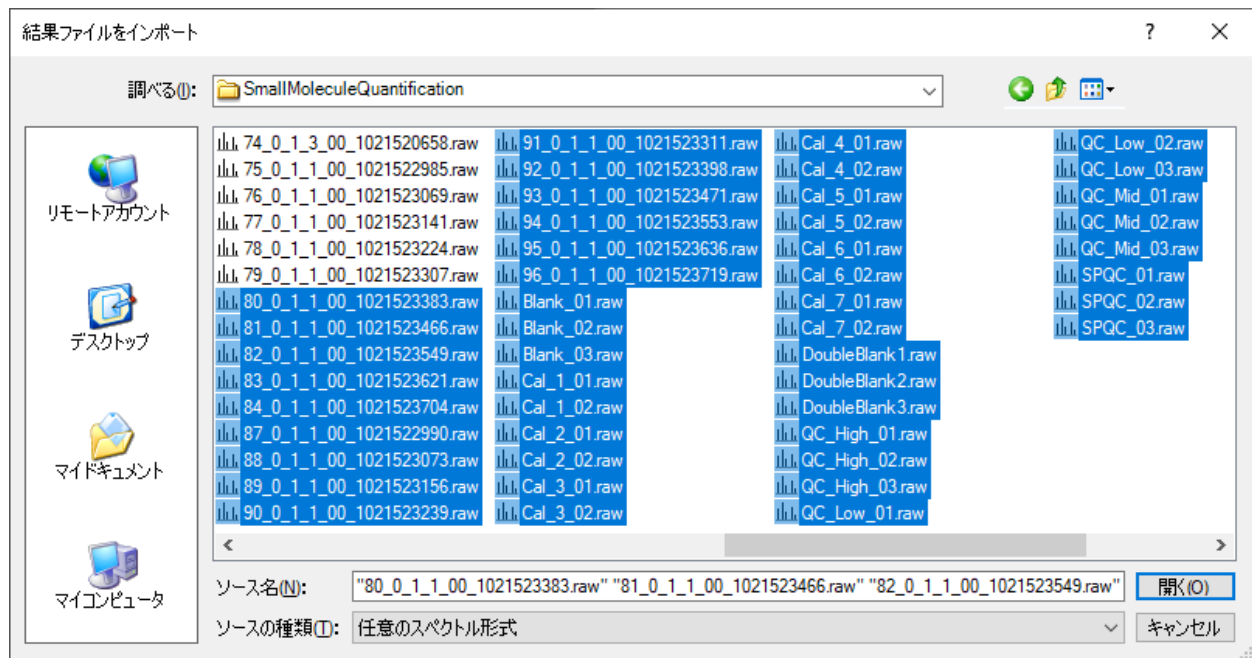
同時にインポートするファイル(F):  
多く

インポート中にクロマトグラムを表示(C)

インポート失敗後に再試行(R)

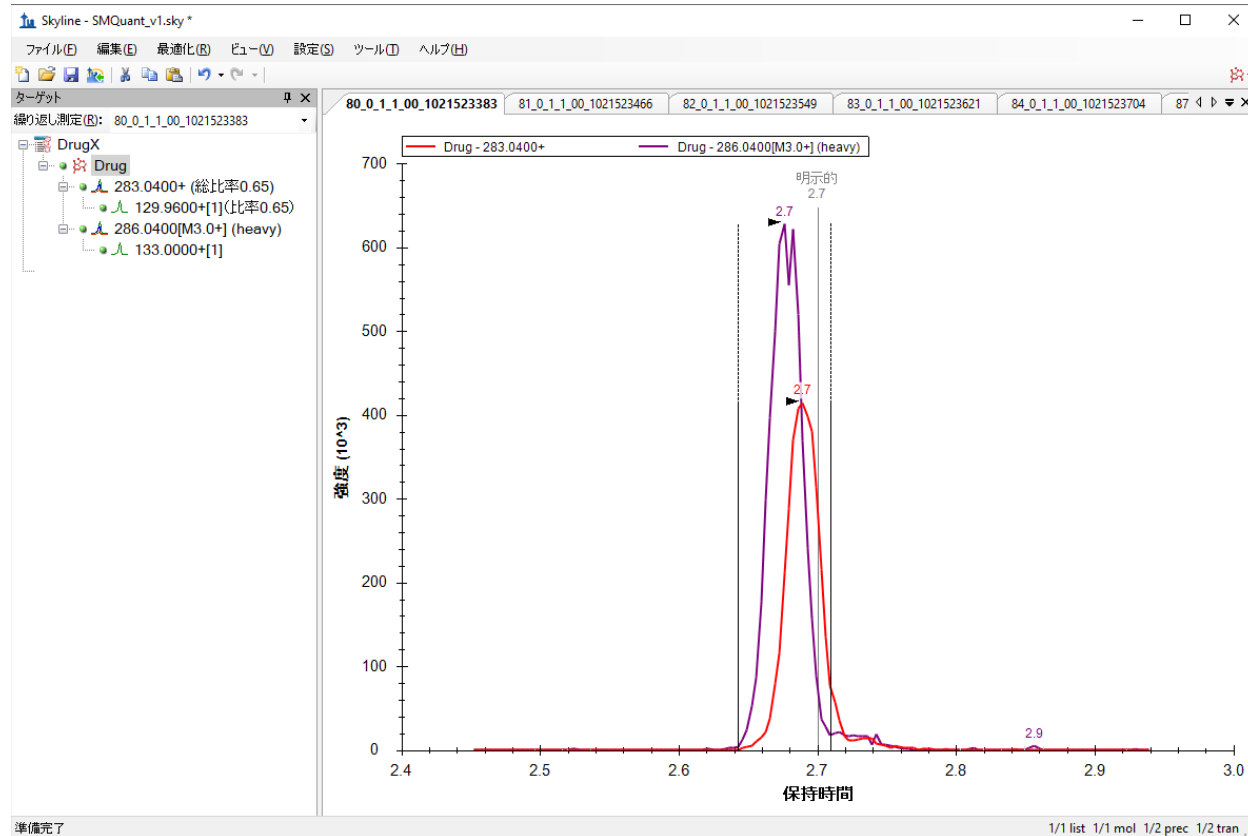
- [OK] ボタンをクリックします。
- 表示される [結果ファイルをインポート] フォームで、「80\_0\_1\_1\_00\_1021523383.raw」ファイルをクリックし、Shift キーを押したままリストの最後のファイルをクリックして最後の 16 個の不明試料とすべての QC 試料を選択します。

[結果ファイルをインポート] フォームは以下ようになります。



- [開く] ボタンをクリックします。

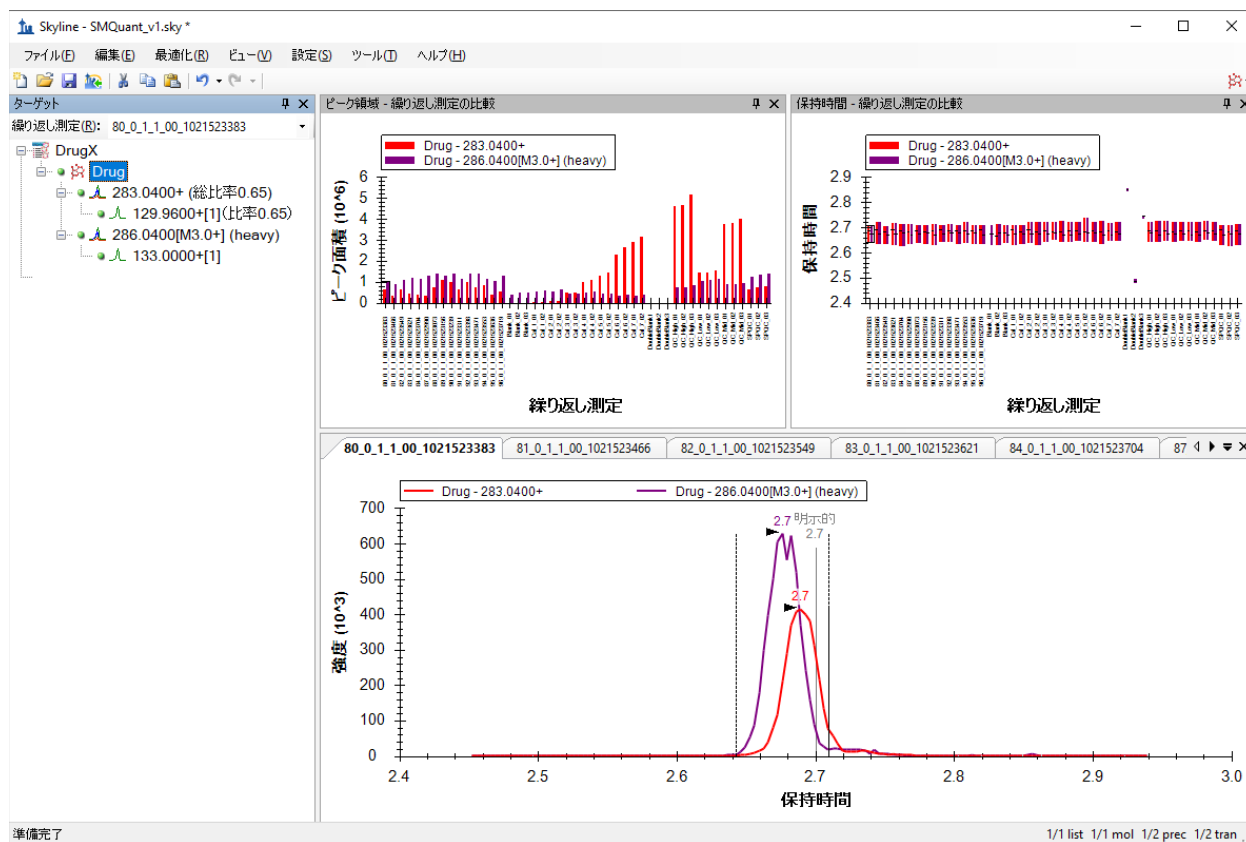
当該ファイルは 30 秒程度でインポートされ、Skyline ウィンドウは以下ようになります。



Skyline 概要グラフを利用して個別のターゲットを表示するには、以下の操作を行います。

- [ビュー]メニューで、[ピーク面積]を選択して[繰り返し測定の比較]をクリックします。
- [ビュー]メニューで、[保持時間]を選択して[繰り返し測定の比較]をクリックします。
- これらのビューをクリック&ドラッグして、クロマトグラムグラフの上にドックします。
- [ターゲット]ビューで最初のターゲット「Drug」を選択します。

これで Skyline ウィンドウは以下ようになります。



## ピーク積分の確認

[保持時間 - 繰り返し測定の比較] ウィンドウを見ると、Skyline が他の繰り返し測定と一致する保持時間でピークを選択していない、名前に「DoubleBlank」がある繰り返し測定に異常値があるのがわかります。

これらの実行の 1 つのクロマトグラムを詳しく見るには、以下の操作を行います。

- [保持時間 - 繰り返し測定の比較] ビューで、最初の異常値である DoubleBlank1 の棒をクリックします。

「DoubleBlank」という言葉は、どちらも試料内に存在しないことを意味するため、皆さんも Skyline がこの繰り返し測定の薬物のライトまたはヘビー形態のいずれかの優れたピークを検出するとは期待しないでしょう。クロマトグラムグラフは、今度は Skyline が選ばなければならなかったピークを示します。



- [ 保持時間 – 繰り返し測定の比較 ] ビューで、他の2つの異常値の棒をクリックします。

これによって DoubleBlank2 および DoubleBlank3 も「明示的」という注釈が付いている時間 2.7 の辺りに明確なピークがないことが明らかになります。これはメソッドが 2.7 分を予想される溶出時間として明示的に指定したことを意味します。これらもダブルブランクであるため、繰り返し測定には実際のピークは一切期待されません。次は、2.7 分で低信号領域が中心となるように手作業でダブルブランク繰り返し測定それぞれの積分を調整します。

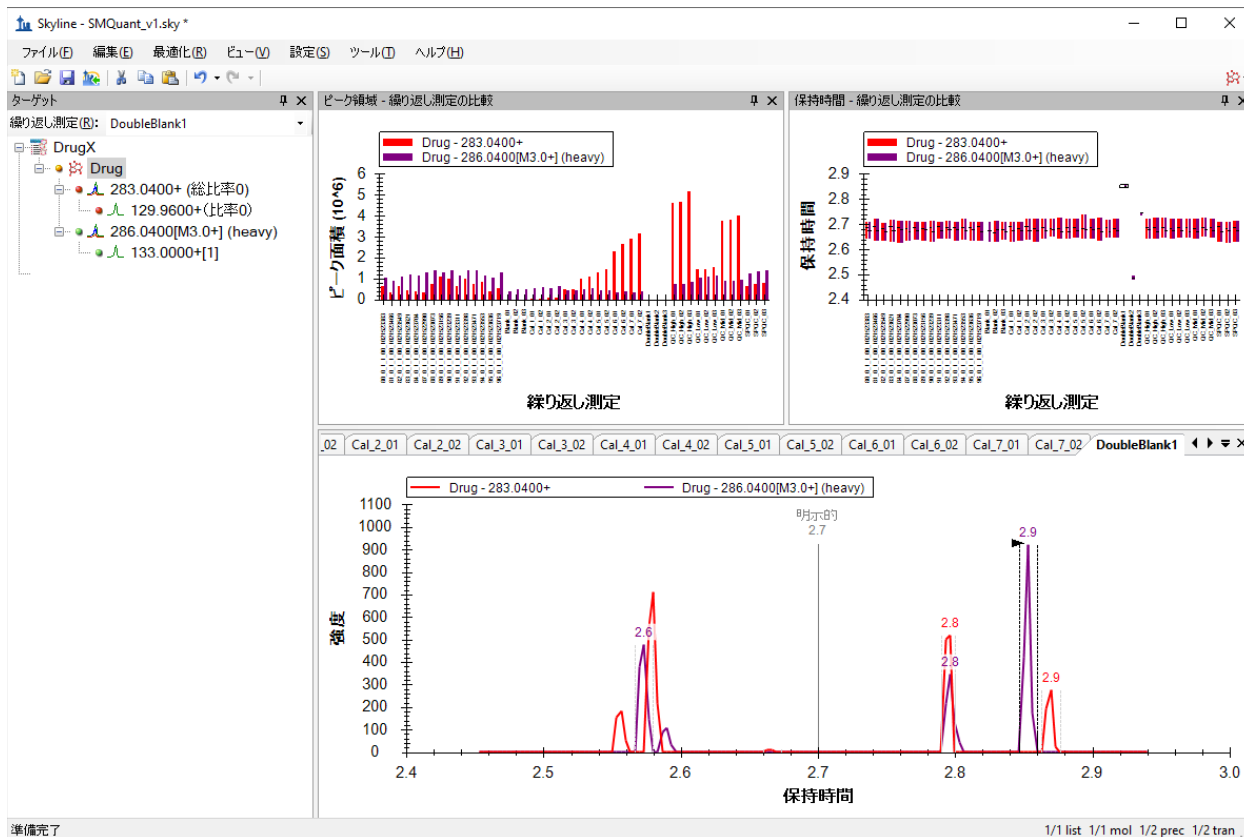
## ピーク積分の調整

ピーク積分を調整するには、この手順を実行します。

- [ターゲット]ビューの[繰り返し測定]ドロップダウンリストで、「DoubleBlank1」繰り返し測定を選択します。
- マウスのカーソルを保持時間軸の下に合わせます（カーソルは左右の矢印➡に変わります）。
- 保持時間軸の下、2.65 分あたりをクリックし、2.75 分あたりにドラッグします。



ピーク境界はこの新しい値に変わり、元の範囲は以下のように斜線部分でマークされます。



上記の手順を、他の2つの「DoubleBlank」繰り返し測定に繰り返します。

## 定量化の準備

次に定量化校正を設定するには、以下の手順を実行します。

- [設定]メニューで[分子設定]をクリックします。
- [定量化]タブをクリックします。
- [回帰適合]ドロップダウンリストで「線形」を選択します。
- [正規化メソッド]ドロップダウンリストで、「Heavy に対する比率」を選択します。
- [回帰の重み]ドロップダウンリストで、「 $1/(x*x)$ 」を選択します。
- [MS レベル]ドロップダウンリストは「すべて」のままでかまいません。
- [単位]フィールドに「uM」と入力します。

[分子設定] フォームは以下ようになります。

分子設定

予測 ライブラリ 標識 定量化

回帰適合(F):  
線形

正規化メソッド(N):  
Heavyに対する比率

回帰の重み(W):  
1 / (x \* x)

MSレベル(L)  
すべて

単位(U)  
uM

性能指数

最大LOQバイアス(B): [ ] %      最大LOQ CV(V): [ ] %

LOD計算基準(C):  
なし

OK      キャンセル

この実験は線形回帰適合を使用し、ヘビー標識の薬物に対して正規化します。Skyline は、 $x$  : なし、 $1/x$ 、 $1/(x*x)$ に応じて、曲線全体で重みを付けるオプションを提供します。本チュートリアルは、濃度の低い校正試料の重みを増加する、回帰の重み「 $1/(x*x)$ 」を使用します。[単位] フィールドは表示目的であり、実験の状況にかなうあらゆる値に設定できます。本実験における濃度はマイクロモルで校正されたため、[単位] フィールドは「uM」に設定されます。

- [OK] ボタンをクリックします。

校正曲線は、まだ表示できません。まず、さまざまな繰り返し測定の試料タイプと校正された濃度を宣言する必要があります。

## 校正曲線を表示するための試料タイプの宣言

さまざまな繰り返し測定に関する情報を調べ、追加するには、ドキュメントグリッドを使用します。ドキュメントグリッドは Skyline の非常に有用なツールであり、多数のドキュメント詳細をスプレッドシート状のビューで提供します。その多くは、グリッド内でそのまま編集できます。この場合は、以下のようにさまざまな繰り返し測定の詳細を提供する必要があります。

- [ビュー]メニューで、[ドキュメントグリッド]をクリックします。
- グリッドの左上隅にある[レポート]をクリックして、[繰り返し測定]を選択します。

ドキュメントグリッドは以下のようにになります。

繰り返し測定	試料タイプ	アナライズ濃度
80 0 1 1 00 1...	不明	
81 0 1 1 00 1...	不明	
82 0 1 1 00 1...	不明	
83 0 1 1 00 1...	不明	
84 0 1 1 00 1...	不明	
87 0 1 1 00 1...	不明	
88 0 1 1 00 1...	不明	
89 0 1 1 00 1...	不明	
90 0 1 1 00 1...	不明	
91 0 1 1 00 1...	不明	
92 0 1 1 00 1...	不明	
93 0 1 1 00 1...	不明	
94 0 1 1 00 1...	不明	
95 0 1 1 00 1...	不明	
96 0 1 1 00 1...	不明	
Blank_01	不明	
Blank_02	不明	

- 必要であれば、ドキュメントグリッドを拡大して画面が十分に大きければすべての繰り返し測定が同時に表示できるようにします。
- 「繰り返し測定」列ヘッダーをクリックし、「昇順にソート」を選択してリストをアルファベット順に並べ替えます。

デフォルトでは、すべての繰り返し測定に「不明」の試料タイプ値が与えられています。これは、数字で始まる名前を持つすべての繰り返し測定に希望されるタイプです。これ以降は、以下の操作を行います。

- 「Blank\_01」の[試料タイプ]フィールドをクリックします。
- 「不明」の値を「ブランク」に変更します。

- 今度は Shift キーを押しながら「Blank\_03」の[試料タイプ]をクリックして3つのブランク繰り返し測定すべてを同時に選択します。
- 選択を右クリックし、[フィルダウン]をクリックします。

複数選択すべてが、選択の最初の項目と同じ値になります。

必要に応じてこれを繰り返します（または下表まで進みます）。

- 「Cal\_」繰り返し測定を「標準」試料タイプに設定します。
- 「DoubleBlank\_」繰り返し測定を「ダブルブランク」試料タイプに設定します。
- 「QC\_」繰り返し測定を「QC」試料タイプに設定します。

「SPQC\_」繰り返し測定は違う意味で品質管理であることを思い出しましょう（全研究資料のプーリング）。したがって、これは「不明」のまま残します。

アナライト濃度は手作業で入力できますが、コピーしてグリッドに貼り付ける方がずっと簡単です。


- 「SmallMoleculeQuant」フォルダに移動し、Excel またはテキストエディタで「Concentrations.xlsx」ファイルを開きます。これは以下のようになります。

Blank_01	ブランク	
Blank_02	ブランク	
Blank_03	ブランク	
Cal_1_01	標準	10
Cal_1_02	標準	10
Cal_2_01	標準	20
Cal_2_02	標準	20
Cal_3_01	標準	100
Cal_3_02	標準	100
Cal_4_01	標準	200
Cal_4_02	標準	200
Cal_5_01	標準	400
Cal_5_02	標準	400
Cal_6_01	標準	600
Cal_6_02	標準	600
Cal_7_01	標準	800
Cal_7_02	標準	800
DoubleBlank1	ダブルブランク	
DoubleBlank2	ダブルブランク	
DoubleBlank3	ダブルブランク	
QC_High_01	QC	589
QC_High_02	QC	589
QC_High_03	QC	589
QC_Low_01	QC	121
QC_Low_02	QC	121
QC_Low_03	QC	121
QC_Mid_01	QC	346
QC_Mid_02	QC	346
QC_Mid_03	QC	346
SPQC_01	不明	
SPQC_02	不明	
SPQC_03	不明	

- 列ヘッダーがドキュメントグリッドと一致することを確認します。
- Excel で、[すべて選択] (Ctrl+A) 、[コピー] (Ctrl+C) を選択します。
- ドキュメントグリッドで、「Blank\_01」セルをクリックし、[貼り付け] (Ctrl+V) をクリックします。

完了すると、ドキュメントグリッドは以下のようになります。

ドキュメントグリッド: 繰り返し測定

レポート ▾ | 🔍 | ⏪ | ⏩ | 47 of 47 | 📄 エクスポート... 操作 ▾ | 検索: 

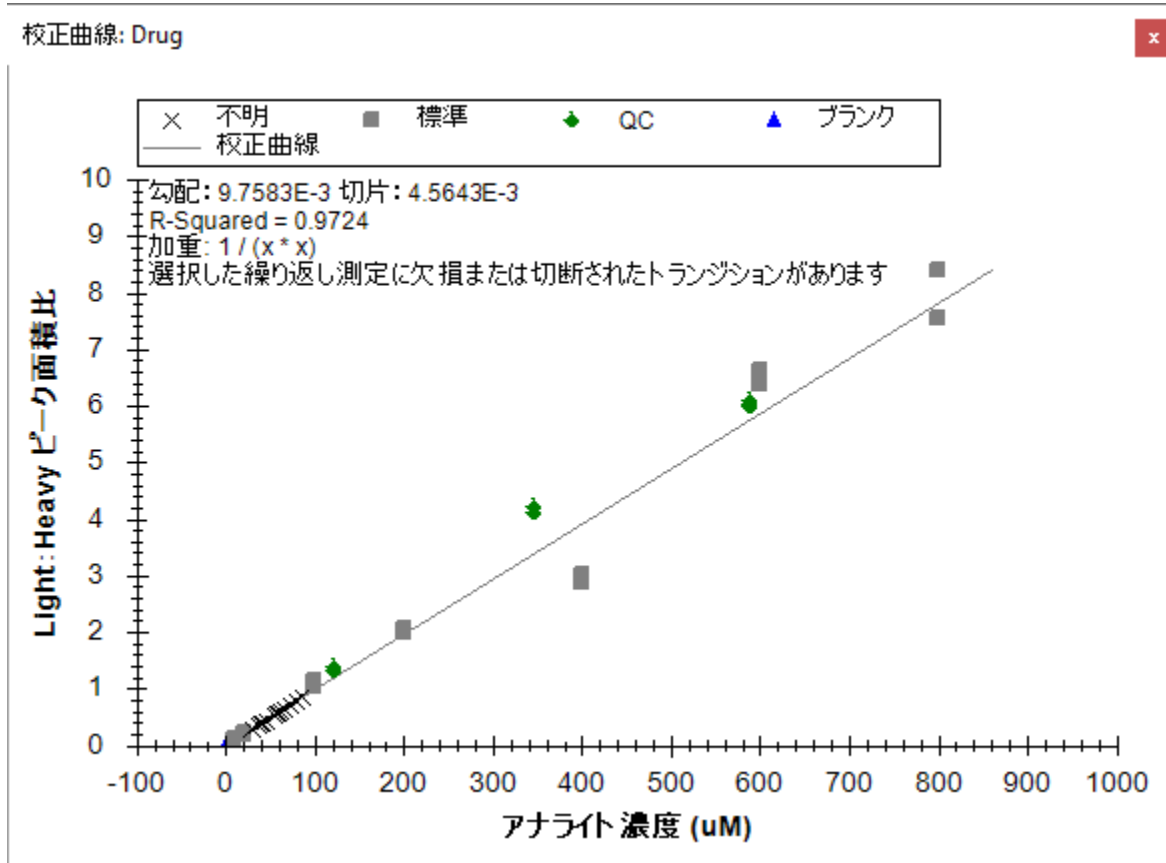
繰り返し測定	試料タイプ	アナライト濃度
<a href="#">94_0_1_1_00_1...</a>	不明	
<a href="#">95_0_1_1_00_1...</a>	不明	
<a href="#">96_0_1_1_00_1...</a>	不明	
<a href="#">Blank_01</a>	ブランク	
<a href="#">Blank_02</a>	ブランク	
<a href="#">Blank_03</a>	ブランク	
<a href="#">Cal_1_01</a>	標準	10
<a href="#">Cal_1_02</a>	標準	10
<a href="#">Cal_2_01</a>	標準	20
<a href="#">Cal_2_02</a>	標準	20
<a href="#">Cal_3_01</a>	標準	100
<a href="#">Cal_3_02</a>	標準	100
<a href="#">Cal_4_01</a>	標準	200
<a href="#">Cal_4_02</a>	標準	200
<a href="#">Cal_5_01</a>	標準	400
<a href="#">Cal_5_02</a>	標準	400
<a href="#">Cal_6_01</a>	標準	600
<a href="#">Cal_6_02</a>	標準	600
<a href="#">Cal_7_01</a>	標準	800
<a href="#">Cal_7_02</a>	標準	800
<a href="#">DoubleBlank1</a>	ダブルブランク	
<a href="#">DoubleBlank2</a>	ダブルブランク	
<a href="#">DoubleBlank3</a>	ダブルブランク	
<a href="#">QC_High_01</a>	QC	589
<a href="#">QC_High_02</a>	QC	589
<a href="#">QC_High_03</a>	QC	589
<a href="#">QC_Low_01</a>	QC	121
<a href="#">QC_Low_02</a>	QC	121
<a href="#">QC_Low_03</a>	QC	121
<a href="#">QC_Mid_01</a>	QC	346
<a href="#">QC_Mid_02</a>	QC	346
<a href="#">QC_Mid_03</a>	QC	346
<a href="#">SPQC_01</a>	不明	
<a href="#">SPQC_02</a>	不明	
<a href="#">SPQC_03</a>	不明	

## 校正曲線の検査

今度は、校正曲線グラフを調べます。

- [ドキュメントグリッド]を閉じます。
- [ビュー]メニューで、[校正曲線]をクリックします。

[校正曲線] フォームは、以下のように表示されます。



現在選択されている繰り返し測定がダブルブランクの場合は、選択されている繰り返し測定でトランジションがないものについての注記が予想されます。

グラフを見ると、「不明」がXマークとしてほとんどがライトとヘビーの比率 1.0 から 0 の間に表示されるのがわかります。


また、校正試料には希望したほどは回帰線に近くないものがあることにも気付かれるでしょう。ドキュメントグリッドを使用してどの程度かけ離れているかに定性的な意味を持たせることで、適切でない試料をすべて除外することができます。そのためには、以下の手順を実行します。

- [ビュー]メニューで、[ドキュメントグリッド]をクリックします。
- グリッドの左上隅にある[レポート]をクリックし、続いて[繰り返し測定]をクリックします。
- グリッドの左上隅にある[レポート]をもう一度クリックし、それから[レポートをカスタマイズ]をクリックします。
- 検索ボタン をクリックし、[検索]フィールドに「精度」と入力します。

- [次を検索] ボタンをクリックします。
- [列を検索] フォームの [閉じる] ボタンをクリックします。
- [レポートをカスタマイズ] フォームでは、[定量化] サブカテゴリの下にある精度が強  
調表示されます。
- [精度] チェックボックスをオンにします。
- [分子結果] ([定量化] のすぐ上) で、[校正から除外] ボックスをオンにします。
- [ビューをカスタマイズ] フォームの上にある [ビュー名] フィールドに、  
「Replicates\_custom\_quant」と入力します。
- [OK] ボタンをクリックします。

ドキュメントグリッドは以下のようになります。

ドキュメントグリッド: Replicates\_custom\_quant

レポート ▾ | 47 of 47 | エクスポート... 操作 ▾ | 検索: 

繰り返し測定	試料タイプ	アナライต์濃度	精度	校正から除外
<a href="#">94_0_1_1_00_1...</a>	不明		#N/A	<input type="checkbox"/>
<a href="#">95_0_1_1_00_1...</a>	不明		#N/A	<input type="checkbox"/>
<a href="#">96_0_1_1_00_1...</a>	不明		#N/A	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Blank_01</a>	ブランク		#N/A	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Blank_02</a>	ブランク		#N/A	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Blank_03</a>	ブランク		#N/A	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Cal_1_01</a>	標準	10	103%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Cal_1_02</a>	標準	10	97.4%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Cal_2_01</a>	標準	20	95.7%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Cal_2_02</a>	標準	20	100.5%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Cal_3_01</a>	標準	100	114.6%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Cal_3_02</a>	標準	100	106.4%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Cal_4_01</a>	標準	200	105.1%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Cal_4_02</a>	標準	200	101.8%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Cal_5_01</a>	標準	400	73.4%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Cal_5_02</a>	標準	400	76.6%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Cal_6_01</a>	標準	600	108.9%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Cal_6_02</a>	標準	600	112.8%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Cal_7_01</a>	標準	800	107.5%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">Cal_7_02</a>	標準	800	96.5%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">DoubleBlank1</a>	ダブルブランク		#N/A	<input type="checkbox"/>
<a href="#">DoubleBlank2</a>	ダブルブランク		#N/A	<input type="checkbox"/>
<a href="#">DoubleBlank3</a>	ダブルブランク		#N/A	<input type="checkbox"/>
<a href="#">QC_High_01</a>	QC	589	104.2%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">QC_High_02</a>	QC	589	104.4%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">QC_High_03</a>	QC	589	106%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">QC_Low_01</a>	QC	121	116.6%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">QC_Low_02</a>	QC	121	111.2%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">QC_Low_03</a>	QC	121	111.1%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">QC_Mid_01</a>	QC	346	121.4%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">QC_Mid_02</a>	QC	346	125%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">QC_Mid_03</a>	QC	346	121.6%	<input type="checkbox"/>
<a href="#">SPQC_01</a>	不明		#N/A	<input type="checkbox"/>
<a href="#">SPQC_02</a>	不明		#N/A	<input type="checkbox"/>
<a href="#">SPQC_03</a>	不明		#N/A	<input type="checkbox"/>

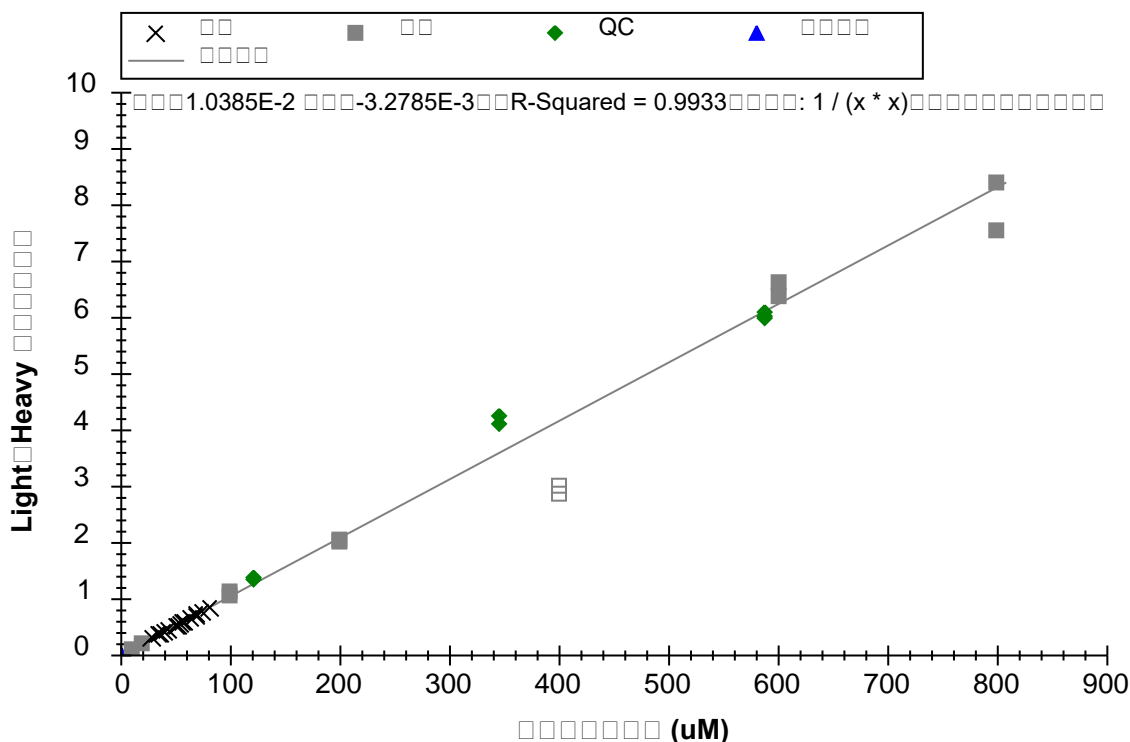
このアッセイが基にしている FDA ガイダンスは、校正点には既知濃度と校正曲線から背景計算された濃度との間に 15%未満のバイアス（精度 85%から 115%）が必要であると記述しています。[精度]列は、「Cal\_5」がその基準を満たしていないことを示しています。これらの繰り返し測定は、ドキュメントグリッドの[校正から除外]列のチェックボックスを使用するか、



[校正曲線] フォームの異常値を右クリックして [校正から除外] チェックボックスをオンにして考慮から除外できます。これらの手順を実行して、校正回帰から Cal\_5 繰り返し測定を除去します。

- ドキュメントグリッドで、[校正から除外] 列の「Cal5\_01」繰り返し測定のチェックボックスをクリックし、下向き矢印キーを押します。
- 「Cal5\_02」にも繰り返します。

校正曲線は、下図のようになります。異常値である「Cal\_5」値を除外することで、R の二乗値が 0.97 から 0.99 超に改善することに注意します。



次に、以下の手順を実行して、不明試料の残りをインポートします。

- [ファイル]メニューで、[インポート]を選択して [結果]をクリックします。
- [結果をインポート]フォームで、[ファイルにシングルインジェクション繰り返し測定を追加]を選択します。
- フォームの下部にある [同時にインポートするファイル] ドロップダウンリストで、最良のインポートパフォーマンスを提供する [多く] をクリックします。
- [OK] ボタンをクリックします。
- [結果ファイルをインポート] フォームが表示され、収集された raw データファイルが表示されます。ファイル名が 80 未満、つまりプリフィックスが「79\_」までの数字で始

まる不明な実行を選択します。（注：Skyline はすでにインポートしたファイルとのオーバーラップをすべて無視します。）

- [OK] ボタンをクリックします。

定量化データを表示する便利な方法は、ドキュメントグリッドを、今度は[ペプチド比率結果]ビューでもう一度使用することです。

- [ビュー]メニューで、[ドキュメントグリッド]をクリックします。
- [レポート]ドロップダウンリストで、[ペプチド比率結果]をクリックします。
- [繰り返し測定]列ヘッダーをクリックし、[昇順にソート]を選択します。

ドキュメントグリッドは以下のようになります。

ドキュメントグリッド: ペプチド比率結果

レポート ▾ | 47 of 113 | エクスポート... 操作 ▾ | 検索:

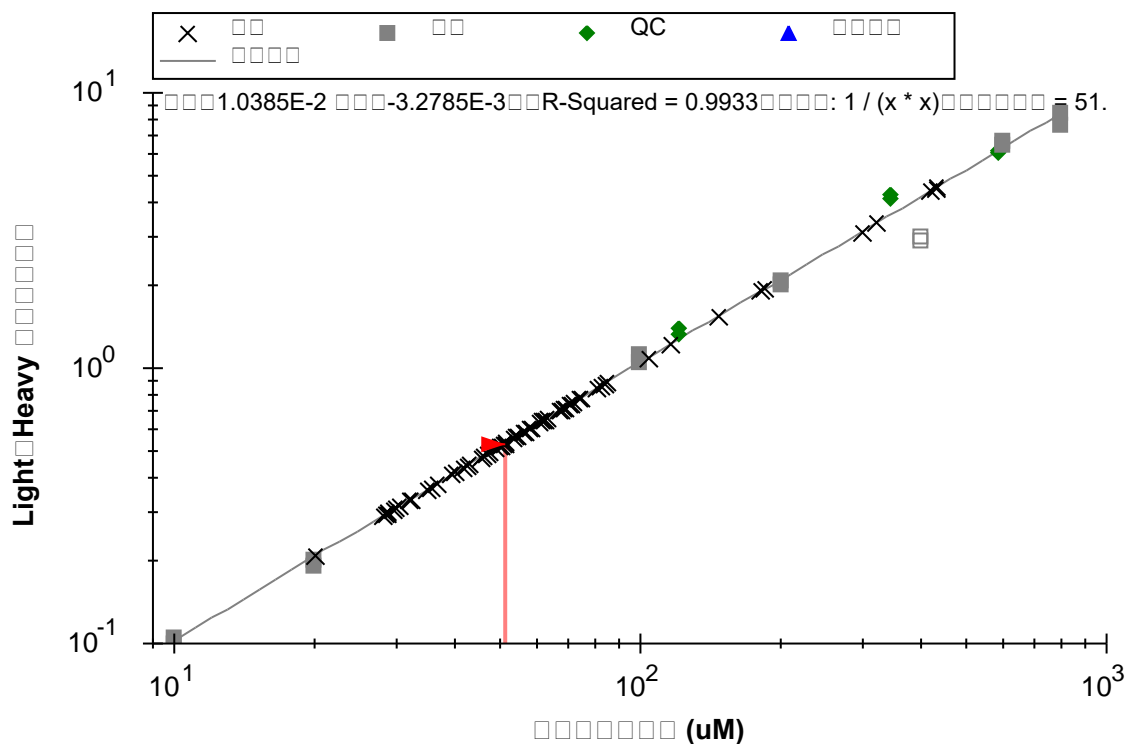
	ペプチド	タンパク質	繰り返し測定 ▲	ペプチドピーク 検出率	ペプチド保持 時間	標準に対する 比率	定量化
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">95.0.1.1.00.1...</a>	1	2.68	0.3779	<a href="#">36.7044 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">96.0.1.1.00.1...</a>	1	2.68	0.4428	<a href="#">42.957 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Blank_01</a>	0.5	2.68	0	<a href="#">0.3157 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Blank_02</a>	1	2.67	0.002	<a href="#">0.5048 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Blank_03</a>	1	2.68	0.0011	<a href="#">0.4218 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Cal_1_01</a>	1	2.68	0.105	<a href="#">10.4297 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Cal_1_02</a>	1	2.68	0.0996	<a href="#">9.9036 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Cal_2_01</a>	1	2.68	0.1913	<a href="#">18.7352 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Cal_2_02</a>	1	2.68	0.2007	<a href="#">19.6453 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Cal_3_01</a>	1	2.68	1.1231	<a href="#">108.4626 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Cal_3_02</a>	1	2.68	1.0426	<a href="#">100.7119 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Cal_4_01</a>	1	2.68	2.0557	<a href="#">198.2779 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Cal_4_02</a>	1	2.68	1.9907	<a href="#">192.0188 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Cal_5_01</a>	1	2.68	2.8707	<a href="#">276.759 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Cal_5_02</a>	1	2.68	2.9928	<a href="#">288.5146 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Cal_6_01</a>	1	2.68	6.3822	<a href="#">614.9043 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Cal_6_02</a>	1	2.68	6.6078	<a href="#">636.6334 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Cal_7_01</a>	1	2.68	8.3953	<a href="#">808.7618 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">Cal_7_02</a>	1	2.68	7.5365	<a href="#">726.0585 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">DoubleBlank1</a>	0	#N/A	#N/A	#N/A
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">DoubleBlank2</a>	0	#N/A	#N/A	#N/A
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">DoubleBlank3</a>	0	#N/A	#N/A	#N/A
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">QC_High_01</a>	1	2.68	5.9928	<a href="#">577.41 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">QC_High_02</a>	1	2.68	6.0076	<a href="#">578.8339 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">QC_High_03</a>	1	2.68	6.0969	<a href="#">587.4288 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">QC_Low_01</a>	1	2.68	1.3809	<a href="#">133.2886 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">QC_Low_02</a>	1	2.68	1.3179	<a href="#">127.2255 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">QC_Low_03</a>	1	2.68	1.3159	<a href="#">127.0333 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">QC_Mid_01</a>	1	2.68	4.1029	<a href="#">395.4108 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">QC_Mid_02</a>	1	2.68	4.2251	<a href="#">407.1797 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">QC_Mid_03</a>	1	2.68	4.1094	<a href="#">396.0431 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">SPQC_01</a>	1	2.68	0.5318	<a href="#">51.5299 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">SPQC_02</a>	1	2.68	0.5545	<a href="#">53.7163 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">SPQC_03</a>	1	2.68	0.586	<a href="#">56.7468 uM</a>
	<a href="#">Drug</a>	<a href="#">DrugX</a>	<a href="#">94.0.1.1.00.1...</a>	1	2.68	0.5302	<a href="#">51.2813 uM</a>

2つの「Cal\_5」データポイントの削除後、データを更に調べると、「Cal\_7」の点の1つの精度が85%未満であることがわかりますので、これも削除します。「Cal\_6」のレベルを超える試料はなく、また「Cal\_4」と「Cal\_6」の間のレベルの試料は4つしかないため、これによって試料の測定が影響を受けることはほとんどありません。

校正曲線に沿って試料のダイナミックレンジを簡単に視覚化するには、以下の操作を行います。

- 校正曲線ウィンドウ内を右クリックし、[Log X 軸]をクリックします。
- 校正曲線ウィンドウ内を右クリックし、[Log Y 軸]をクリックします。
- 最小および最大の標準点周囲の長方形（グレーの長方形）をクリックしてドラッグし、間の範囲を拡大します。

校正曲線は以下のようになります。



これを見ると、試料の大半が「Cal\_2」（20 uM）と「Cal\_3」（100 uM）の間にあり、アッセイの線形校正範囲に十分収まっていることが一目でわかります。品質管理試料（既知の不明試料、グラフ内の緑色のひし形）はすべて、測定された精度が85から115%の間にあり、FDA ガイダンス基準を満たしています。

ここからの次の手順は、外部統計処理用にデータをエクスポートするか、本ドキュメント内で生物学的なグループ分けを確立し、Skyline 内の複数の統計的分析ツールやプラグインを利用することです。これらのオプションは、別のチュートリアルで取り上げます。

## まとめ

本チュートリアルでは、プリカーサーイオン化学式および付加物、そしてプロダクトイオン  $m/z$  値で指定した小分子をターゲットとする Skyline ドキュメントの作成方法を学びました。三連四重極で LC-MS/MS を使用して収集された複数の繰り返し測定データセットをインポートし、元はターゲットプロテオミクスに使用するために作成された既存の Skyline 機能のいくつを今度は小分子データに適用できるかを理解しました。