

Skyline 低分子の定量

Skyline ターゲット質量分析環境では、質量分析計の raw データを Skyline ドキュメントにインポートし、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、一般の低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、単一の低分子のターゲットを、外部校正曲線法と安定同位体標識の内部標準を用いて定量した比較的簡単な例を説明します。

本チュートリアルでは、みなさんが実施していそうな（薬物動態アッセイなどの）実験メソッドで、TQ-MS を用いて（この例では血漿から）取得したデータのターゲット定量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 での低分子の定量ワークフロー

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、低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 低分子ターゲット](#)」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 がどのように低分子の化学式や付加物を記述するのかに関するいくつかの基礎知識をご確認ください。

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

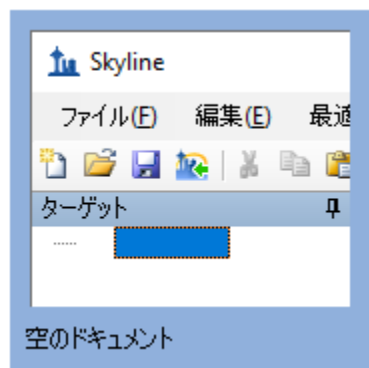
これにより以下の新しいフォルダが作成されます。

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。

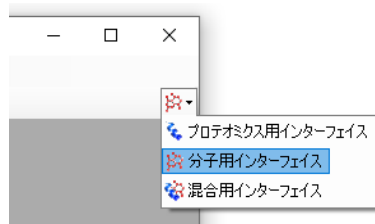



- [設定]メニューで、[デフォルト]をクリックします。
- 現在の設定を保存するかどうかを尋ねるフォームで[いいえ]をクリックします。

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低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。

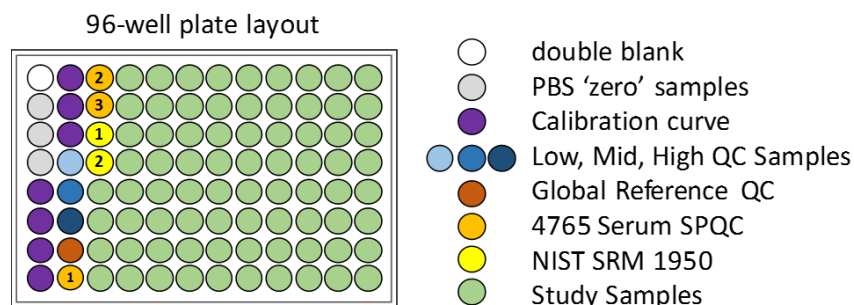
- Skyline ウィンドウの右上隅にあるユーザーインターフェイス管理をクリックし、[分子用インターフェイス]を選択します。



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、低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。

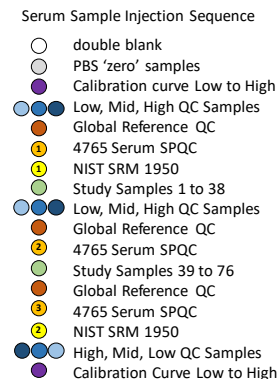
校正曲線試料 (Calibration curve) とは、校正曲線作成用の希釈系列です。

QC 試料は「よく知っている未知試料 (Known Unknowns)」です。これは品質管理用の比較対照試料であり、本研究では未知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 はプール QC 血清、全研究試料の混合物であり、実験開始時、中間点、実験終了時の複数ポイントで分析を実行して、研究を通して定量的再現性が一定しているかを確認します。

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異性体であり、このため両者は共溶出します。また、代理標準とする分子を設定することで、内部標準以外の他の分子と関連づけることもできます。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。

低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

低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の列が表示されているのがわかります。本チュートリアルでは、項目を取捨選択して、並び順も変えたほうが便利です。どちらの点も、簡単に変更できます。

- [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。

<input checked="" type="checkbox"/>	分子リスト名
<input checked="" type="checkbox"/>	プリカーサー名
<input type="checkbox"/>	プリカーサーイオンの式
<input type="checkbox"/>	プリカーサー付加物
<input checked="" type="checkbox"/>	プリカーサーm/z
<input checked="" type="checkbox"/>	プリカーサー電荷
<input type="checkbox"/>	プロダクト名
<input type="checkbox"/>	プロダクトイオン式
<input type="checkbox"/>	プロダクトの付加物
<input checked="" type="checkbox"/>	プロダクトm/z
<input checked="" type="checkbox"/>	プロダクト電荷
<input checked="" type="checkbox"/>	標識タイプ
<input checked="" type="checkbox"/>	明示的保持時間
<input type="checkbox"/>	明示的保持時間ウィンドウ
<input checked="" type="checkbox"/>	明示的衝突エネルギー
<input type="checkbox"/>	メモ
<input type="checkbox"/>	InChiKey
<input type="checkbox"/>	CAS
<input type="checkbox"/>	HMDB
<input type="checkbox"/>	InChi
<input type="checkbox"/>	SMILES
<input type="checkbox"/>	KEGG
<input type="checkbox"/>	S-レンズ
<input checked="" type="checkbox"/>	コロン電圧
<input type="checkbox"/>	明示的ドリフト時間(ミリ秒)
<input type="checkbox"/>	明示的ドリフト時間高エネルギーオフ
<input type="checkbox"/>	指定されたイオン移動度
<input type="checkbox"/>	指定されたイオン移動度の単位
<input type="checkbox"/>	指定されたイオン移動度の高エネルギー
<input type="checkbox"/>	衝突断面積(Sq A)
<input type="checkbox"/>	明示的補償電圧
<input type="checkbox"/>	明示的デクラスタリングポテンシャル

列(U)... ヘルプ(H)

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。

	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	コーン電圧	明示的衝突エネルギー	明示的保持時間
*										

[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）。

列の順序が違う誤った場合は、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。

	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	コーン電圧	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
*										

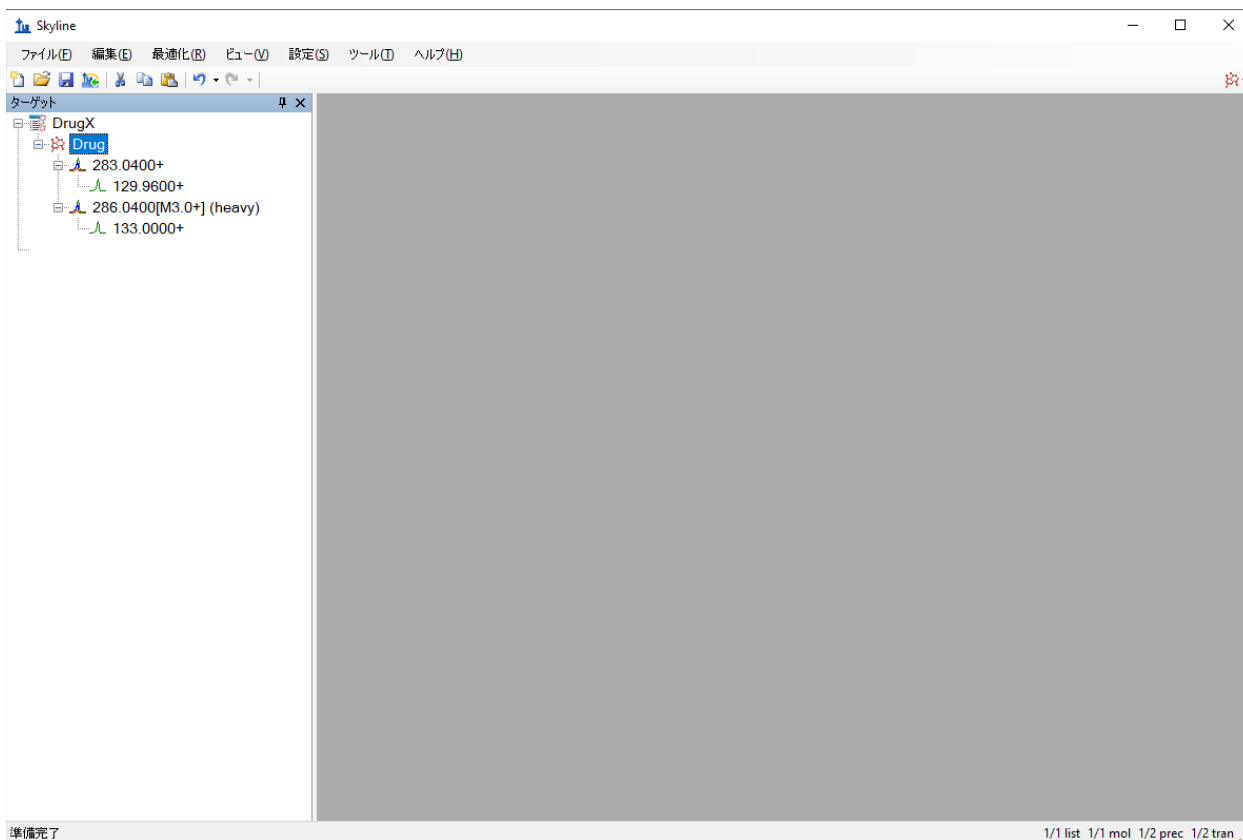
- [挿入]ボタンをクリックします。

注：本チュートリアルでは、このターゲットに対して m/z と電荷値のみを設定しています。Skyline は、化学式や同位体標識など、さらに高レベルの記述も取り扱うことができます。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、今回実験的に用いる質量分析結果をインポートできるように、「トランジションの設定」が正しく設定されている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。

- [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。これは試験で使用する元の 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 113 個の質量分析計データファイルが含まれます。このような場合、まずごく一握りの未知試料ランと、校正曲線作成用ランと品質管理 (QC) 用ラン全部のデータファイルをインポートすると有用です。さらにより単純なドキュメントから開始して、まずは数回のランと、たとえば校正曲線作成用ランの最も高濃度なもののデータファイルだけをインポートして、データ品質を確認するところから開始したいこともあるでしょう。

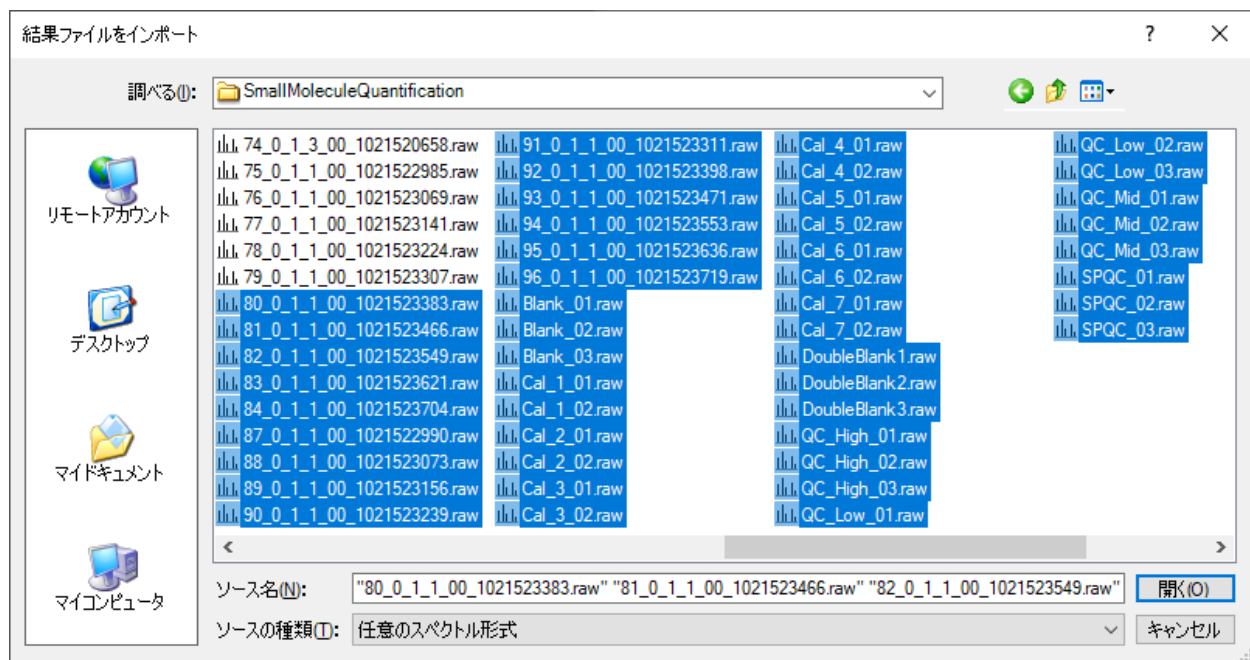
ここでは、より野心的なアプローチを取って以下の手順を実行します。

- [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、インポート速度が最速となる[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。

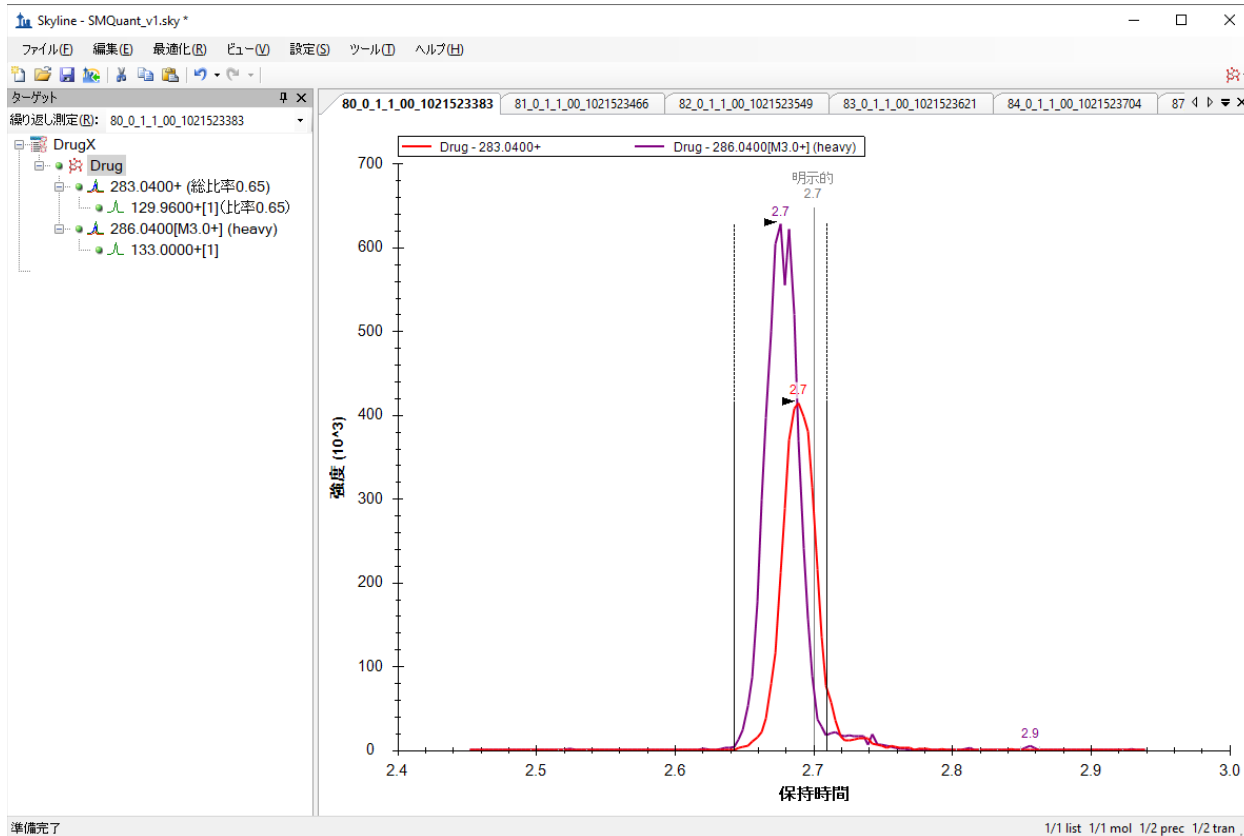
- [OK] ボタンをクリックします。
- 表示される [結果ファイルをインポート] フォームで、「80_0_1_1_00_1021523383.raw」ファイルをクリックし、Shift キーを押したままリストの最後のファイルをクリックして最後の 16 個の未知試料とすべての QC 試料を選択します。

[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。

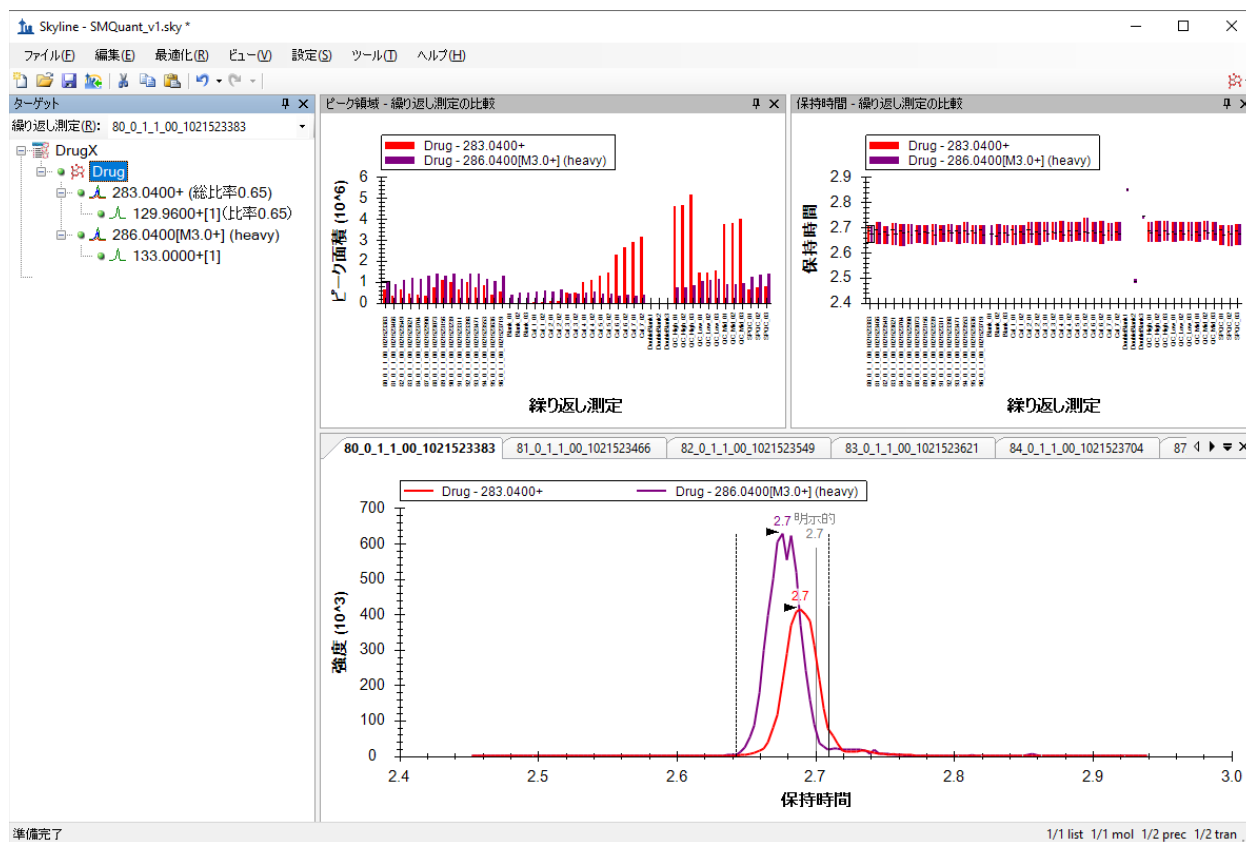
当該ファイルは 30 秒程度でインポートされ、Skyline ウィンドウは以下ようになります。



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、「DoubleBlank」という名前の繰り返し測定に異常値があり、Skyline が他の測定と同一の保持時間でピークを選択していないことがわかります。

これらのランから1つ選び、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。

皆さんも Skyline がこの繰り返し測定から、測定ターゲットの薬物と同位体標識物のきれいなピークを見つけるとは期待していないでしょう。なぜなら「DoubleBlank」という用語は、どちらも試料内に存在しないことを意味しているからです。現在表示しているクロマトグラムグラフには、Skyline がその代わりに選ぶしかなかったピークが示されています。



- [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。

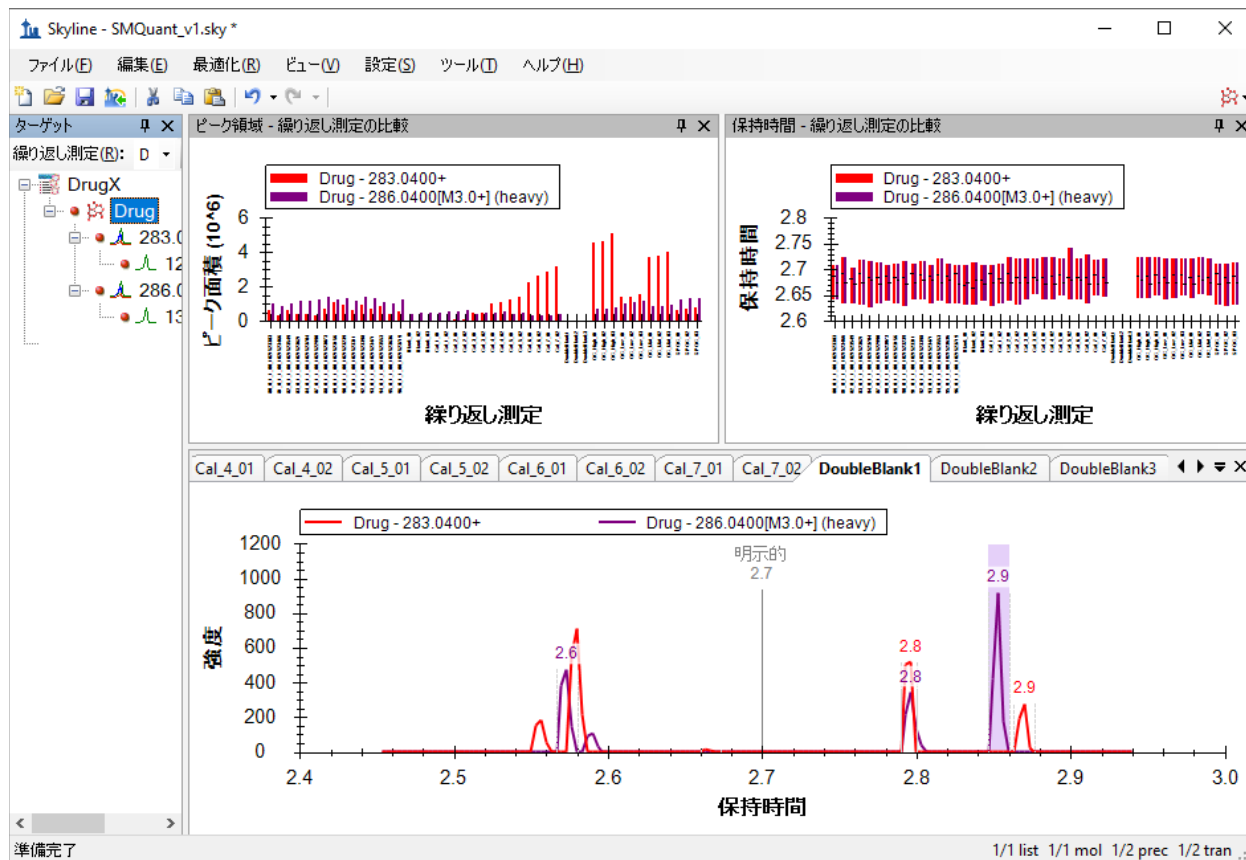
これによって DoubleBlank2 および DoubleBlank3 も「明示的」という注釈が付いている時間 2.7 の辺りに明確なピークがないことが明らかになります。これはメソッドが 2.7 分を予想される溶出時間として明示的に指定していることを意味します。これらもダブルブランクであるため、繰り返し測定には実際のピークは一切期待されません。次は、2.7 分で低信号領域が中心となるように手作業でダブルブランク繰り返し測定それぞれの積分を調整します。

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 \leftrightarrow 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。

定量の準備

次に定量用校正曲線を設定するには、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):
 $1/(x \cdot x)$

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

この実験では、線形回帰を用いて同位体標識化合物に対する正規化を行っています。Skyline は、 x : なし、 $1/x$ 、 $1/(x \cdot x)$ 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「 $1/(x \cdot x)$ 」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、試料タイプと校正曲線作成用試料の濃度を設定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:

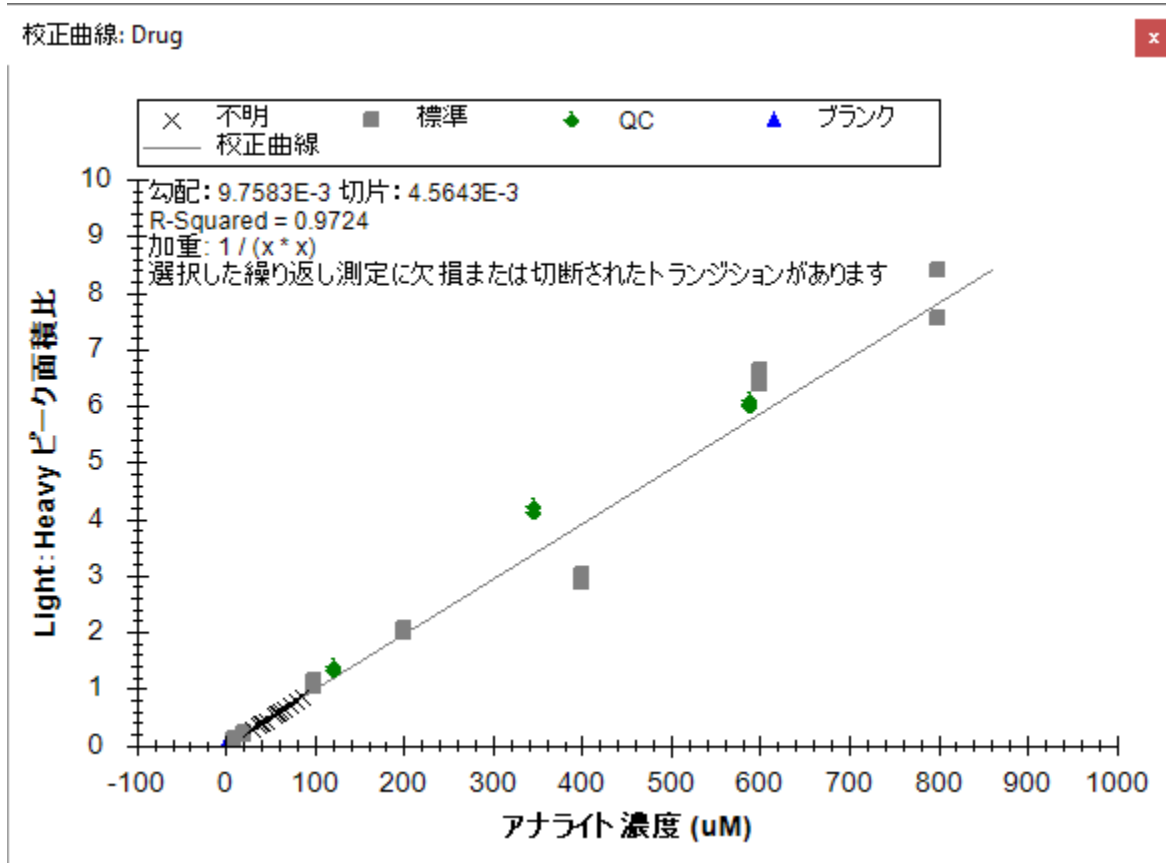
繰り返し測定	試料タイプ	アナライト濃度
94_0_1_1_00_1...	不明	
95_0_1_1_00_1...	不明	
96_0_1_1_00_1...	不明	
Blank_01	ブランク	
Blank_02	ブランク	
Blank_03	ブランク	
Cal_1_01	標準	10
Cal_1_02	標準	10
Cal_2_01	標準	20
Cal_2_02	標準	20
Cal_3_01	標準	100
Cal_3_02	標準	100
Cal_4_01	標準	200
Cal_4_02	標準	200
Cal_5_01	標準	400
Cal_5_02	標準	400
Cal_6_01	標準	600
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	

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。
- [レポートをカスタマイズ] フォームの上にある [レポート名] 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: 

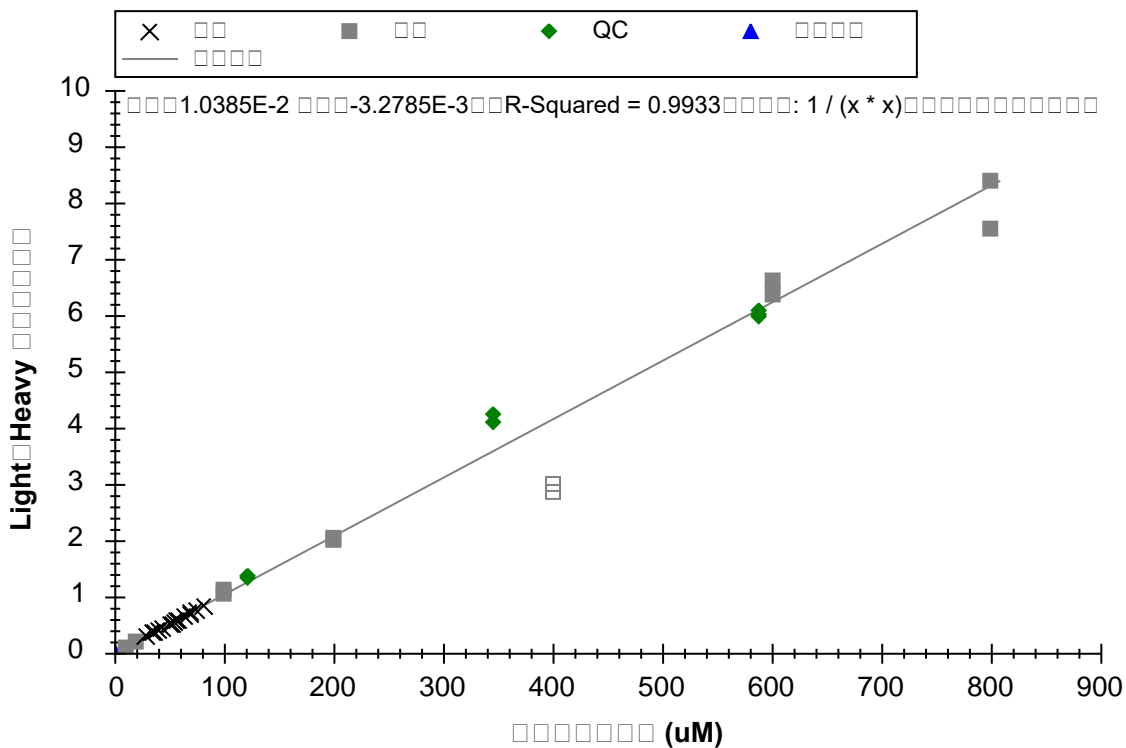
繰り返し測定	試料タイプ	アナライト濃度	精度	校正から除外
94_0_1_1_00_1...	不明		#N/A	<input type="checkbox"/>
95_0_1_1_00_1...	不明		#N/A	<input type="checkbox"/>
96_0_1_1_00_1...	不明		#N/A	<input type="checkbox"/>
Blank_01	ブランク		#N/A	<input type="checkbox"/>
Blank_02	ブランク		#N/A	<input type="checkbox"/>
Blank_03	ブランク		#N/A	<input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

このアッセイが基にしている FDA ガイダンスでは、校正点の既知濃度と校正曲線から逆に計算した濃度との間のバイアスは 15%以下（精度 85%から 115%）であるべきと述べてきます。[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、インポート速度が最速となる [多く] を選択します。
- [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ファイルを選択します。（注：Skyline はすでにインポートしたファイルをオーバーラップして再インポートしようとしても、すべて無視します。）

- [OK] ボタンをクリックします。

定量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もう一度使用して、今度は[ペプチド比率結果]ビューを用いることです。

- [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:

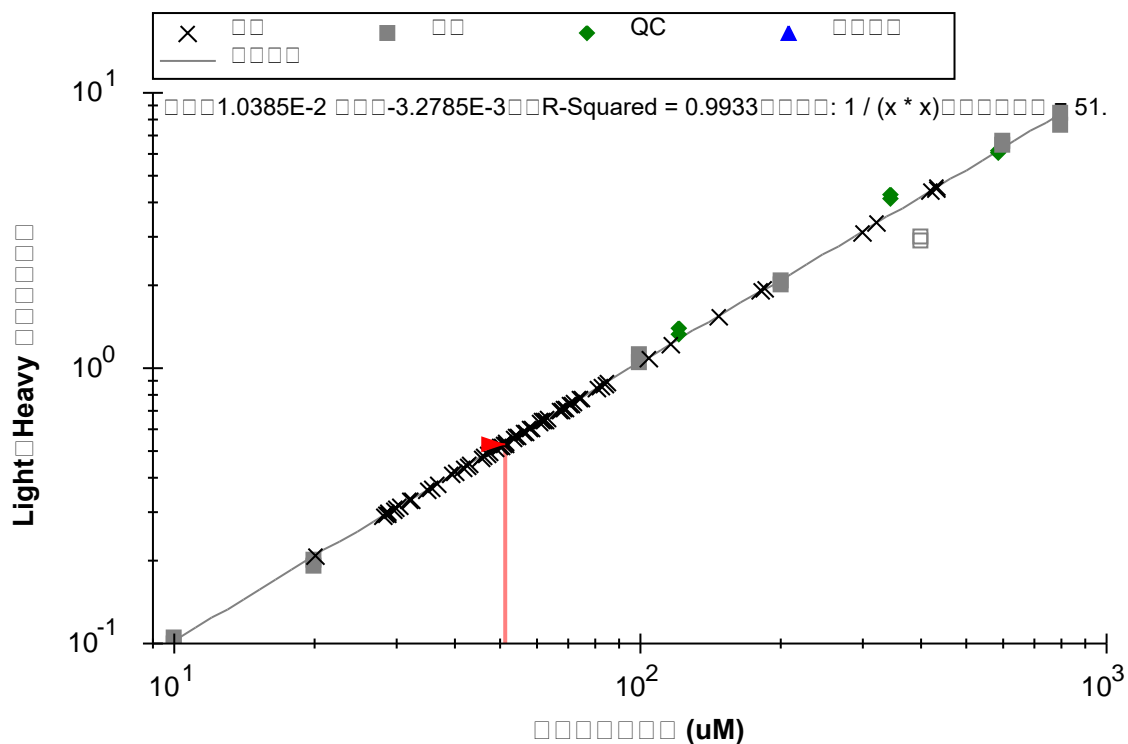
ペプチド	タンパク質	繰り返し測定	ペプチドピーク検出率	ペプチド保持時間	標準に対する比率	定量化
Drug	DrugX	95.0.1.1.00.1...	1	2.68	0.3779	36.7044 uM
Drug	DrugX	96.0.1.1.00.1...	1	2.68	0.4428	42.957 uM
Drug	DrugX	Blank_01	0.5	2.68	0	0.3157 uM
Drug	DrugX	Blank_02	1	2.67	0.002	0.5048 uM
Drug	DrugX	Blank_03	1	2.68	0.0011	0.4218 uM
Drug	DrugX	Cal_1_01	1	2.68	0.105	10.4297 uM
Drug	DrugX	Cal_1_02	1	2.68	0.0996	9.9036 uM
Drug	DrugX	Cal_2_01	1	2.68	0.1913	18.7352 uM
Drug	DrugX	Cal_2_02	1	2.68	0.2007	19.6453 uM
Drug	DrugX	Cal_3_01	1	2.68	1.1231	108.4626 uM
Drug	DrugX	Cal_3_02	1	2.68	1.0426	100.7119 uM
Drug	DrugX	Cal_4_01	1	2.68	2.0557	198.2779 uM
Drug	DrugX	Cal_4_02	1	2.68	1.9907	192.0188 uM
Drug	DrugX	Cal_5_01	1	2.68	2.8707	276.759 uM
Drug	DrugX	Cal_5_02	1	2.68	2.9928	288.5146 uM
Drug	DrugX	Cal_6_01	1	2.68	6.3822	614.9043 uM
Drug	DrugX	Cal_6_02	1	2.68	6.6078	636.6334 uM
Drug	DrugX	Cal_7_01	1	2.68	8.3953	808.7618 uM
Drug	DrugX	Cal_7_02	1	2.68	7.5365	726.0585 uM
Drug	DrugX	DoubleBlank1	0	#N/A	#N/A	#N/A
Drug	DrugX	DoubleBlank2	0	#N/A	#N/A	#N/A
Drug	DrugX	DoubleBlank3	0	#N/A	#N/A	#N/A
Drug	DrugX	QC_High_01	1	2.68	5.9928	577.41 uM
Drug	DrugX	QC_High_02	1	2.68	6.0076	578.8339 uM
Drug	DrugX	QC_High_03	1	2.68	6.0969	587.4288 uM
Drug	DrugX	QC_Low_01	1	2.68	1.3809	133.2886 uM
Drug	DrugX	QC_Low_02	1	2.68	1.3179	127.2255 uM
Drug	DrugX	QC_Low_03	1	2.68	1.3159	127.0333 uM
Drug	DrugX	QC_Mid_01	1	2.68	4.1029	395.4108 uM
Drug	DrugX	QC_Mid_02	1	2.68	4.2251	407.1797 uM
Drug	DrugX	QC_Mid_03	1	2.68	4.1094	396.0431 uM
Drug	DrugX	SPQC_01	1	2.68	0.5318	51.5299 uM
Drug	DrugX	SPQC_02	1	2.68	0.5545	53.7163 uM
Drug	DrugX	SPQC_03	1	2.68	0.586	56.7468 uM
Drug	DrugX	94.0.1.1.00.1...	1	2.68	0.5302	51.3013 uM

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 (QC) 試料 (known unknown、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、低分子をターゲットとする、プリカーサーイオンの化学式および付加物、そしてプロダクトイオンの m/z 値を設定した Skyline ドキュメントの作成方法を学びました。三連四重極 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、ターゲットプロテオミクス用に作成された既存の Skyline 機能のいくつかを、低分子データに適用できることを理解しました。