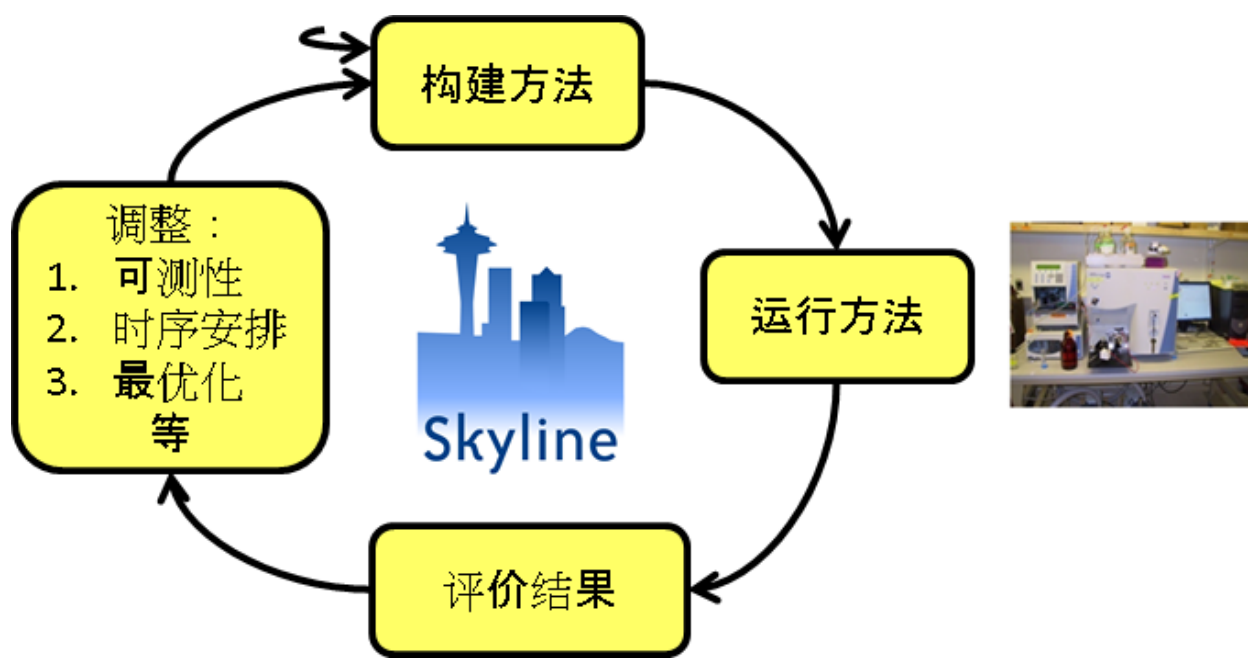


Skyline 靶向方法优化

本教程将介绍 Skyline 靶向蛋白质组环境中可用于优化选择性反应监测（简称 SRM；亦称为“多反应监测”，简称 MRM）质谱仪实验方法的功能。

当给定蛋白质的一组理想目标肽段没有或未知时，Skyline 能够简单创建可测量范围十分广泛的各种肽段的方法，以在样品基质中搜寻最适合测量的肽段。然后，将这些首次测试的结果导入 Skyline，Skyline 可以帮助您优化方法，以改进下一轮的测量。

我们将这称为“靶向方法优化周期”，该方法经常以下图体现：



通过循环此周期，您可以从比较笼统的假设开始，包括您想监测的 100 多个蛋白质，快速缩小清单至最佳肽段、子离子和仪器设置以便达到您的实验目标。

本教程将引导您逐步完成此优化周期的两个半循环，以便让您知晓如何进行更多的循环来创建充分优化的定量方法。

入门指南

要开始本教程，请下载下列 ZIP 文件：

<https://skyline.gs.washington.edu/tutorials/MethodRefine.zip>

将文件解压到您的电脑的某个文件夹，比如：

C:\Users\brendanx\Documents

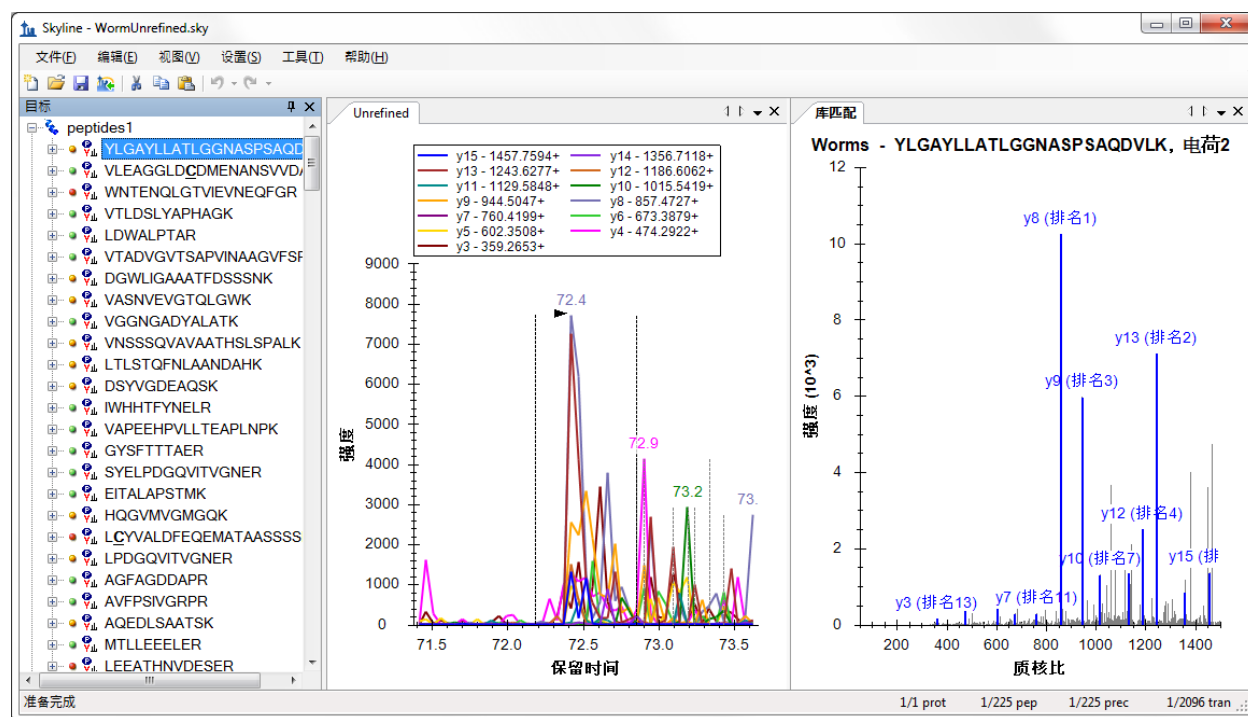
这将创建一个新文件夹：

C:\Users\brendanx\Documents\MethodRefine

现在通过双击，或使用一个正在运行的 Skyline 的“文件”菜单下的“打开”命令来打开新文件夹中的 WormUnrefined.sky 文件。

结果数据

选择文档中的第一个肽段 (YLGAYLLATLGGNASPSAQDVLK)。Skyline 将同时显示 图谱库中的 MS/MS 图谱和相应的在 MacCoss 实验室仪器上获得的肽段的子离子 y3 – y15 的时间-强度色谱图数据：



请注意，与每个肽段相关联的 MS/MS 谱图库通常来自于离子阱质谱仪进行的实验。

在左侧的肽视图中，Skyline 在肽段序列的左侧显示绿色、黄色和红色点。它们为峰质量图标，其含义分别如下：

- 绿色 — Skyline 选择的最佳峰的所有离子对形成一共洗脱峰。
- 黄色 — 至少一半的离子对形成一共洗脱峰。
- 红色 — 不到一半的离子对形成一共洗脱峰。

色谱图数据最初从 39 Thermo 原始文件导入该文档。若要了解为何此文档中对这些肽段的一次测量需要 39 次单独进样，首先请注意 Skyline 窗口右下角的数字。您可以看到该文档包含 225 个肽段和 2096 个离子对，涵盖各肽段的 y3 – y(n-1)子离子（其中 n 是整个肽段序列中氨基酸的个数）。

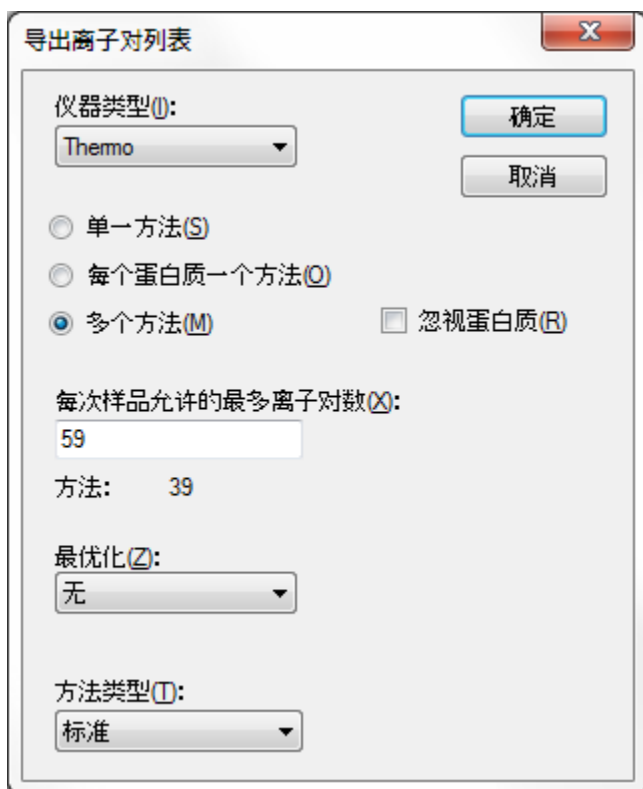
您正在查看的 Skyline 文档旨在帮助您确定在特定目标基质中哪些肽段是可以测量的，以及哪些是可测肽段的最佳离子对。每个肽段都拥有大量的离子对可以使我们获得对给定的峰确实是在测量目标肽段的置信度。这种置信度是通过计算所研究的肽段的离子对峰强度和相同肽段的谱图库^{1,2}之间的点积值相关性来测定的。

未优化的方法

若要了解本文档中测量肽段所需的离子对列表生成方法，请按照如下步骤操作：

- 在“文件”菜单上，选择“导出”，并单击“离子对列表”。
- 选择“多个方法”。
- 在“每次进样允许的最多离子对数”中输入“59”。

“导出离子对列表”表单应如下所示：



导出离子对列表

仪器类型(I): Thermo

确定

取消

单一方法(S)

每个蛋白质一个方法(O)

多个方法(M) 忽视蛋白质(R)

每次样品允许的最多离子对数(X): 59

方法: 39

最优化(Z): 无

方法类型(I): 标准

- 单击“确定”按钮。
- 找到下一表单中的 MethodRefine 文件夹。
- 在“文件名”中输入“worm”。
- 单击“保存”按钮。

如果您使用 Windows Explorer 查看 MethodRefine 文件夹的内容，您将看到现在它包含了 39 个新的 CSV 文件 (worm_0001.csv – worm_0039.csv)。每个文件大小约为 4K，且包含一个最多不超过 59 个离子对的列表，用于导入到一个未安排时序的 Thermo TSQ 方法。

选择 59 这个数字可能显得有点奇怪，但是这对于获得与原始实验匹配的离子对列表很有必要。原始实验选择的数字为 60。遗憾的是，Skyline 曾经存在一个只能允许少于最大值的离子对数量的漏洞（现已修复）。

导入多个进样数据

如果您想要学习如何导入这个实验的初始仪器输出文件的方法，您必须下载另一个 ZIP 格式的补充文件 (36M)。该 ZIP 文件包含 MacCoss 实验室收集的 39 个 Thermo 原始文件（161M，未压缩），用于测定您在上节刚刚导出的离子对列表。

您下载的原始 MethodRefine.zip 文件包含高性能数据缓存文件 WormUnrefined.skyd，该文件已经具有 Skyline 所要求这些文件具有的所有数据。如果您想继续使用现有数据缓存文件，您可以跳至下一节。

如果您想亲自重新导入数据，请下载 ZIP 文件：

<https://skyline.gs.washington.edu/tutorials/MethodRefineSupplement.zip>

将文件解压缩到您之前使用的文件夹。这将创建一个新文件夹，如：

C:\Users\brendanx\Documents\MethodRefineSupplement

在 Skyline 中，按照以下步骤操作，删除以前缓存的数据：

- 在“编辑”菜单中，单击“管理结果”。
- 单击“删除”按钮。
- 单击“确定”按钮。

色谱图表和峰质量图标已经从 Skyline 界面中删除。

- 在“文件”菜单中，单击“保存”(Ctrl-S)。

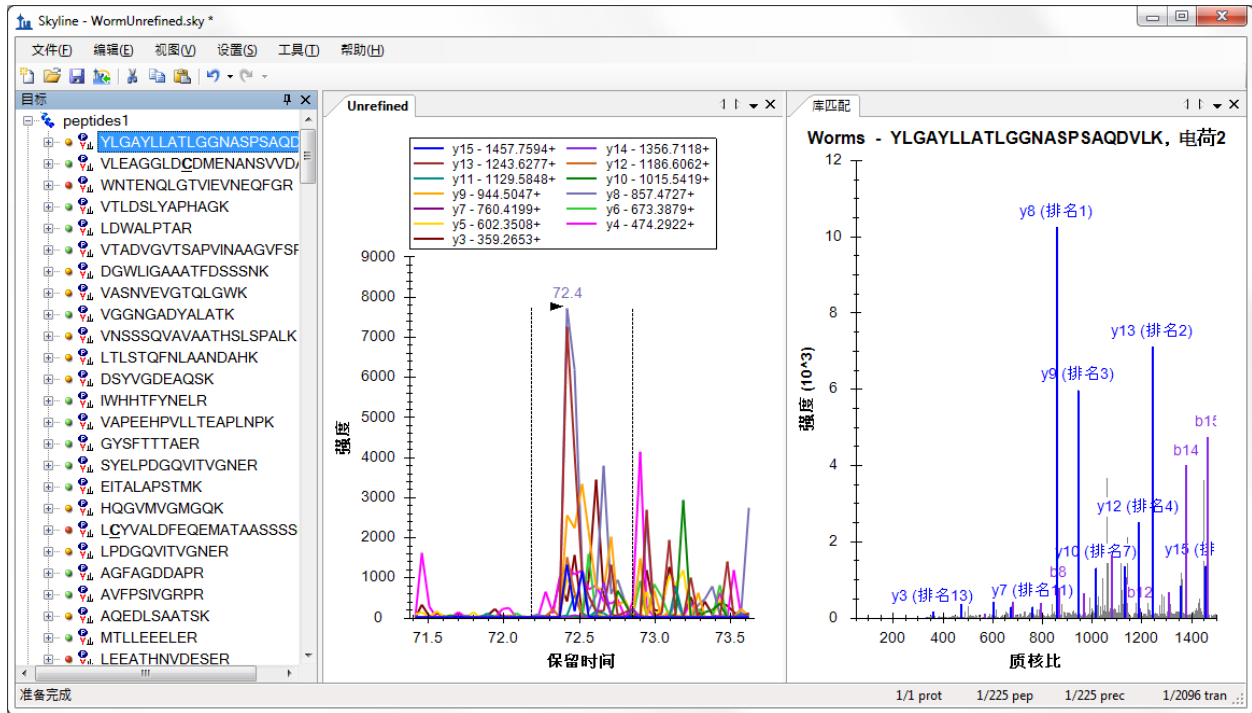
现在您可以亲自导入原始数据了。您无需一次导入所有数据。这对于在数据采集完成之前，对从这些较大，未优化的文档中导出的所有离子对列表进行检查是有帮助的。在本教程中，您将分两批导入数据。

首先，执行下列步骤：

- 在“文件”菜单中，选择“导入”，并单击“结果”。
- 选择“添加一个新的重复测定”。
- 在“名称”中输入“未调整”。

- 单击“确定”按钮。
- 找到 MethodRefineSupplement 文件夹。
- 单击“worm_0001.RAW”文件。
- 按 Shift 并单击“worm_0015.RAW”文件，选择前面的 15 个文件。
- 单击“打开”按钮。

Skyline 将开始导入 15 个文件，您可以在 Skyline 窗口的底部状态栏中查看显示的进度，以及峰质量图标返回至肽段视图中的肽段，如下所示：



Skyline 将该数据缓存至高性能数据文件中时，您可以继续随意检查结果。您甚至可以开始优化文档，但是对于本教程，您应该执行下列步骤来完成导入所有 39 个结果文件：

- 在“文件”菜单中，选择“导入”，并单击“结果”。
- 选择“将文件添加至当前重复测定”。
- 单击“确定”按钮。
- 找到 MethodRefineSupplement 文件夹。
- 单击“worm_0016.RAW”文件。
- 按 Shift 并单击“worm_0039.RAW”文件，选择剩下的所有文件。
- 单击“打开”按钮。

Skyline 完成导入后，您就可以使用与本教程来源匹配的数据缓存文件进行下一节的操作。

简单手动优化

开始优化文档的一种方法是通过目测检查每个肽段，并根据 Skyline 提供的丰富信息决定将要保留和删除的内容。这就是 ASMS 2009 海报中本教程的 Skyline 文档最初优化的方法。浏览这些肽段只需要不到一小时，并选择和库谱图相匹配的轮廓清晰的峰的最佳三个离子对。

查看本教程的 Skyline 文档时，您可能会问到关于第一个肽段的问题，即 Skyline 是否错过了比当前放大显示的峰更好的峰。要回答这个问题，您可以执行下列步骤，进行缩小：

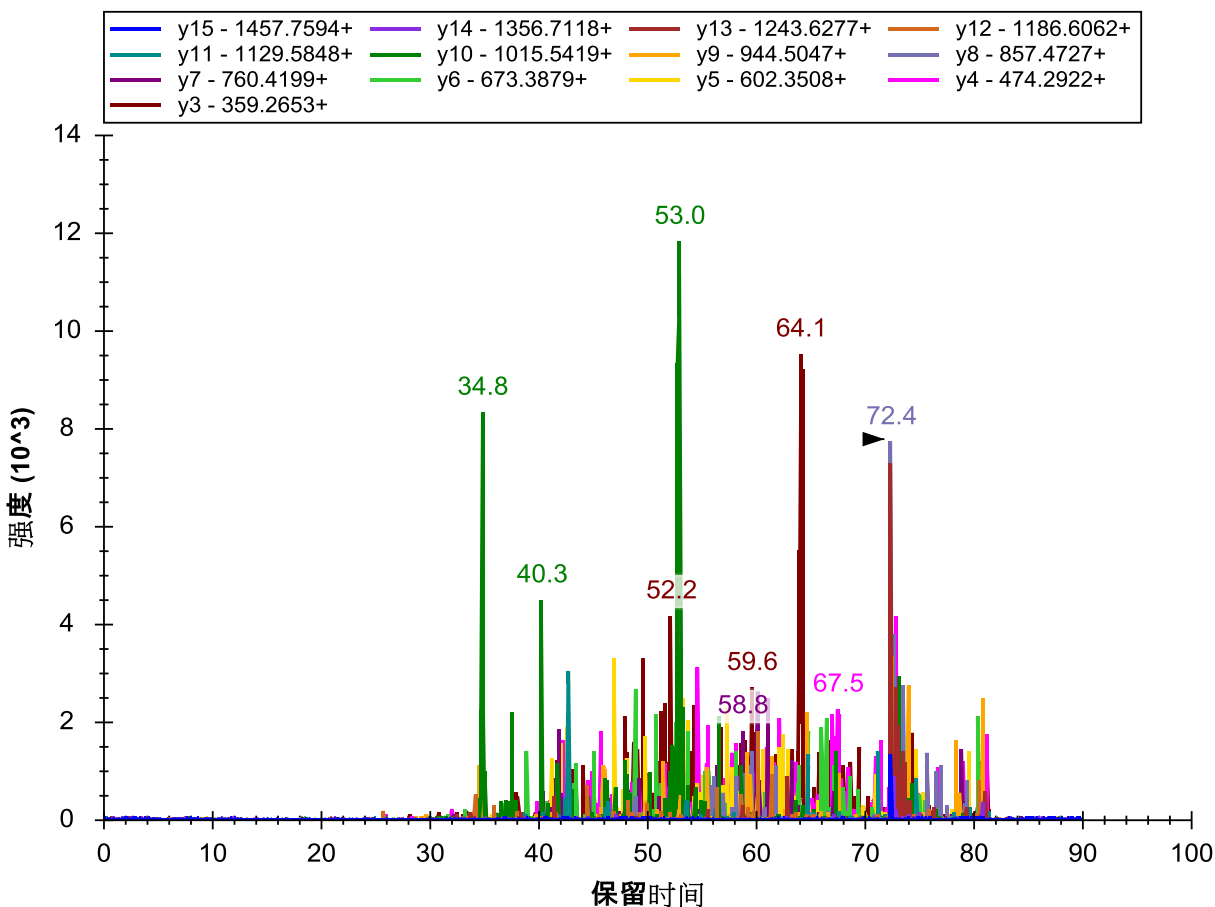
- 在“视图”菜单中，选择“自动缩放”，并单击“无”(Shift-F11)。

您应该在此暂停，花些时间记住以下快捷键：

- “视图/自动缩放/最佳峰”- F11
- “视图/自动缩放/无”- Shift - F11

这些快捷方式允许您在当前选择的峰特写视图和您正在检查的仪器测量的离子对的整个时间范围之间迅速切换。

对于文档中的第一个肽段，整个范围如下所示：



乍一看这很像有大量噪音的数据，但是如果您想看更多的细节，您可以对标有保留时间的任何较大峰附近单击并拖曳出一个方框来放大该区域。

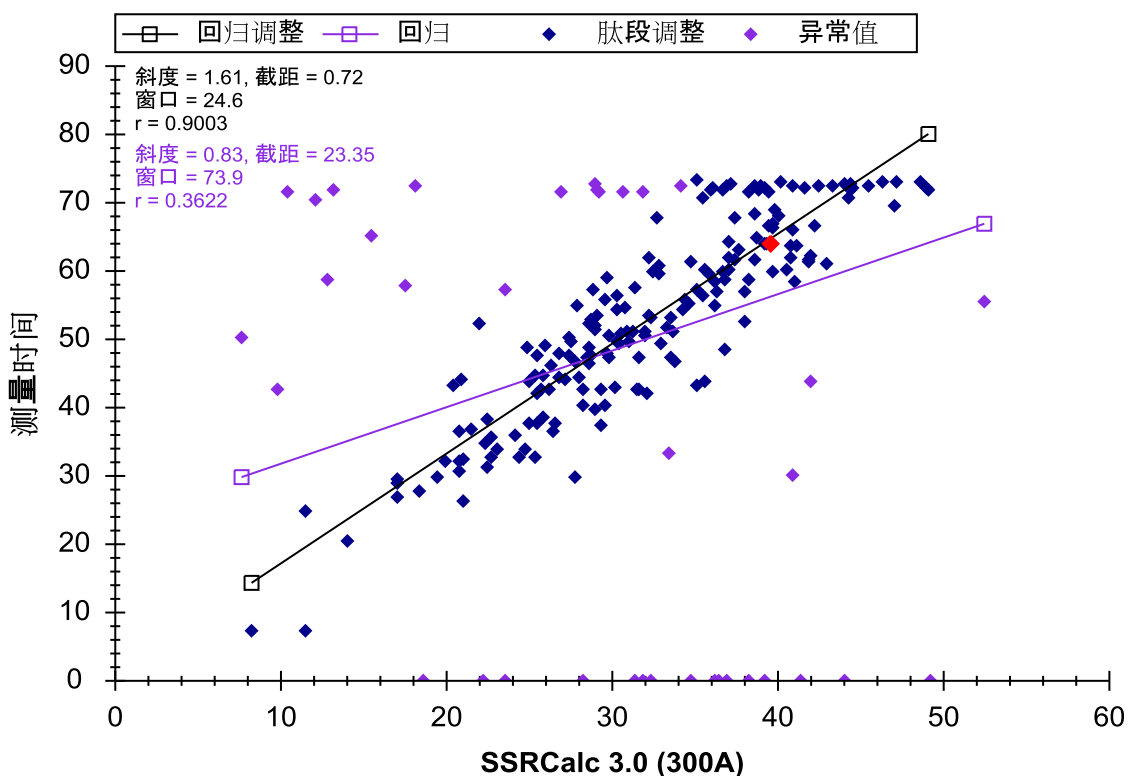
如果您确认这些都不包含这个肽段的真正测量值，您可以按删除键从文档中删除这个肽段。

保留时间预测

在检查色谱图峰时，了解肽段的预期保留时间也是很有用的。特定序列保留时间计算器 (SSRCalc) 3.0³ 已集成到 Skyline 以实现这项功能。若要观察 SSRCalc 得分和测量的肽段保留时间之间的关系线性回归图，请执行下列步骤：

- 在“视图”菜单上，选择“保留时间”，并单击“线性回归”(Shift-F8)。

Skyline 将显示如下图形：



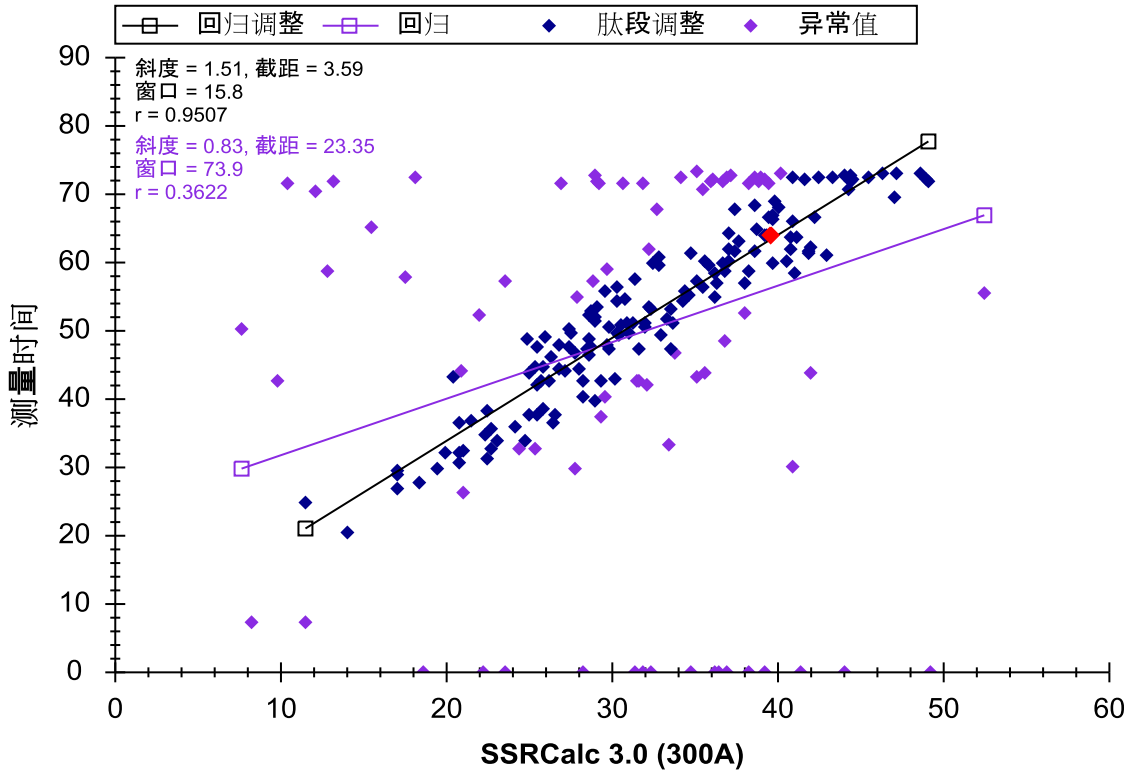
注意位于当前已优化的回归线上的红色点。该点显示了 SSRCalc 分值和当前所选肽段的出峰时间。您在 Skyline 文档树中选择不同的肽段时，突出点将会相应改变。

该图默认使用 $r = 0.9$ 的阈值开始优化回归，然后从中逐步删除点并相应标注它们为异常值，直至达到设定的阈值。您可通过执行如下操作调整阈值：

- 右键单击图，并单击“设置阈值”。
- 在“阈值”中输入“0.95”。

- 单击“确定”按钮。

Skyline 将重新计算回归，将更多的肽段标记为异常值，将图变成：



您可通过执行如下操作来创建新的线性方程式以进行保留时间预测：

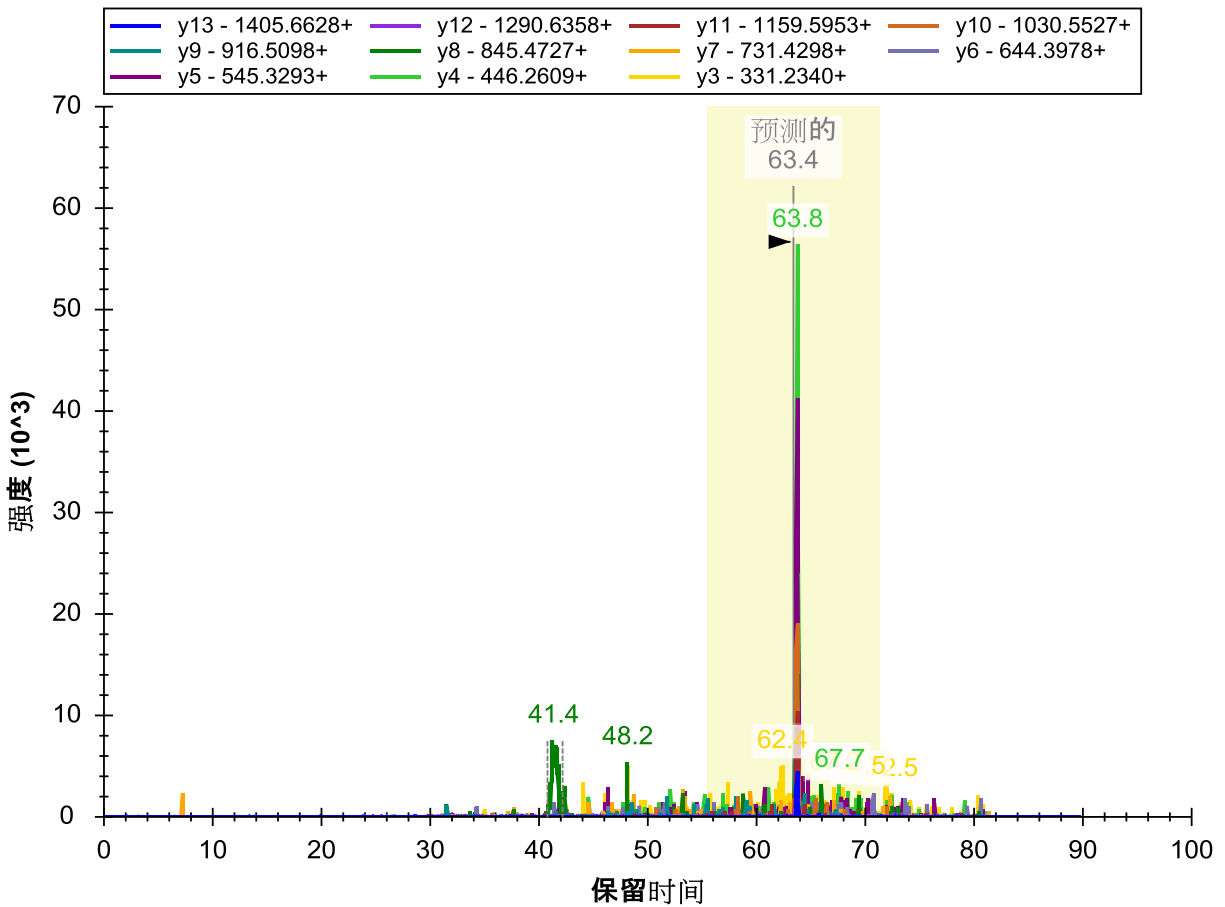
- 右键单击图，并单击“创建回归”。

Skyline 显示“编辑保留时间回归”表单，该表单有预先填入来自保留时间回归图的信息，其中包括已优化的回归数据（145 个肽段），以及相同的斜率、截距和时间窗口。Skyline 建议的时间窗口为从回归残差获得的 4 个标准偏差，这应该包含 145 个肽段中的 95%。

Skyline 还将选择与数据最匹配（ r 最接近 1.0）的计算器。目前仅有的选择是用孔径大小为 100 或 300 埃的反相填料色谱柱数据训练过的 SSRCalc 3.0。在 MacCoss 实验室中，我们使用 90 埃孔径的填料，SSRCalc 3.0 (100Å) 通常会提供最佳匹配。

若接受 Skyline 所建议的值，单击“确定”按钮。

Skyline 会将所选肽段的预测的保留时间的指示符添加至色谱图中，如下所示（您可能需要将回归图移开以便进行观察）：

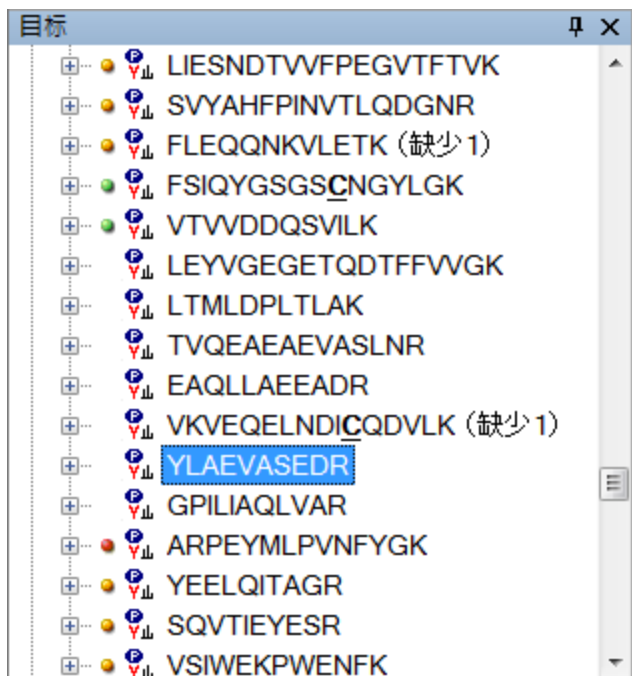


该指示符周围的阴影矩形显示了您在“编辑保留时间回归”表格中选择的窗口（16.2 分钟）。任何阴影矩形外的值均大于预测值的 2 个标准偏差。

缺失数据

在离开保留时间回归图返回本文档进行手动细调之前，请注意 x 轴上的许多异常值点。这表示 Skyline 未找到所研究的肽段的任何峰。若要了解原因，请移动鼠标至最左侧，直至鼠标变为手形，然后单击鼠标左键。

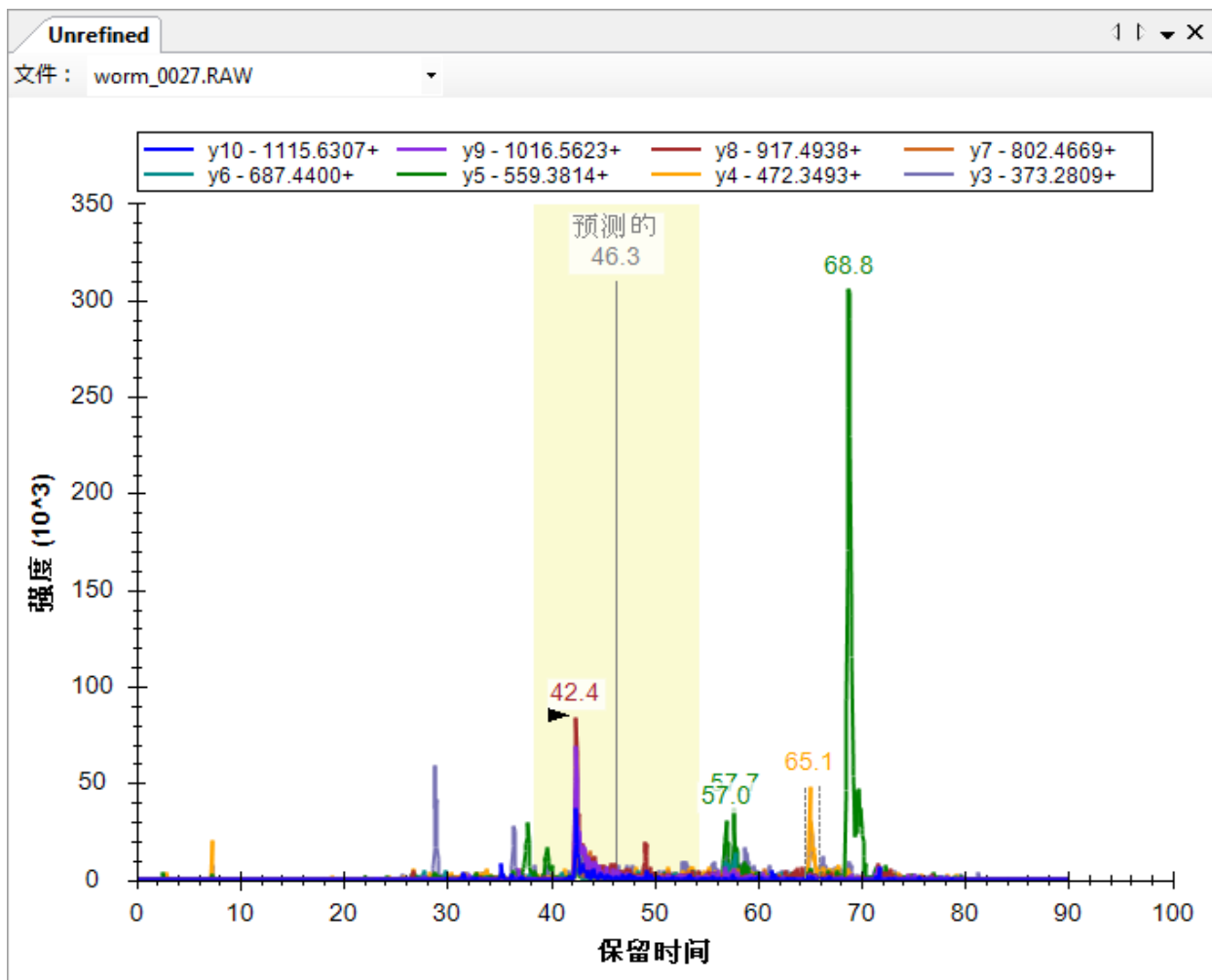
Skyline 将以红色突出显示该点并滚动肽段视图，以显示新选择的肽段 (YLAEVASEDR)。按 Esc 键返回肽段视图，如下所示：



这里有 7 个肽段没有红色峰质量图标，表示这些肽段在导入的 RAW 文件中无法进行定量。如果我们首次将原始文件导入本文档，这可能会令人觉得奇怪。39 个离子对列表对应 39 个原始文件。这是怎么回事呢？

通过进一步探测，Skyline 将会解开疑团。单击缺失数据的肽段上方的肽段 VTVVDDQSVILK。

色谱图现在将显示如下：



注意已经使用“文件”下拉列表将工具栏添加到顶部。如果您单击该列表，将会显示 worm_0027.RAW 和 worm_0028.RAW 这两个文件都包含该肽段测量值。

虽然将来可能在单次进样中对一个肽段进行两次测量，但是目前色谱图显示“文件”列表表明某处存在错误。您可能将作为单独平行测定的文件导入了 Skyline 的同一个逻辑平行测定，或者，如在此例中，样品列表为两个输出文件重复测定了同一个离子对列表，而不小心遗漏了另一个离子对列表。如果您向上滚动肽段视图，则可以看到此错误在 worm_0015.RAW 和 worm_0016.RAW 中再次发生。

现在，您可以删除没有任何数据的肽段，但是您可以将此操作作为本教程稍后讲述的单项优化操作的一部分。现在，请按 Home 键并关闭保留时间回归图。

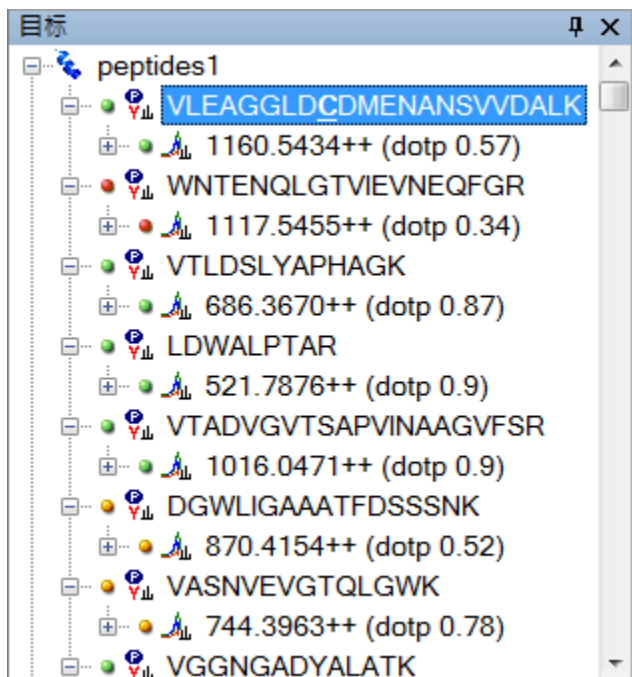
选择可测量肽段和离子对

即使您可能会最终使用 Skyline 中提供的功能更加强大的操作来优化您的文档，使用 Skyline 提供的信息帮助您了解如何单独选择肽段和离子对，也不失为好的办法。若要准备进行本文档的初始手动审核，请按如下步骤操作：

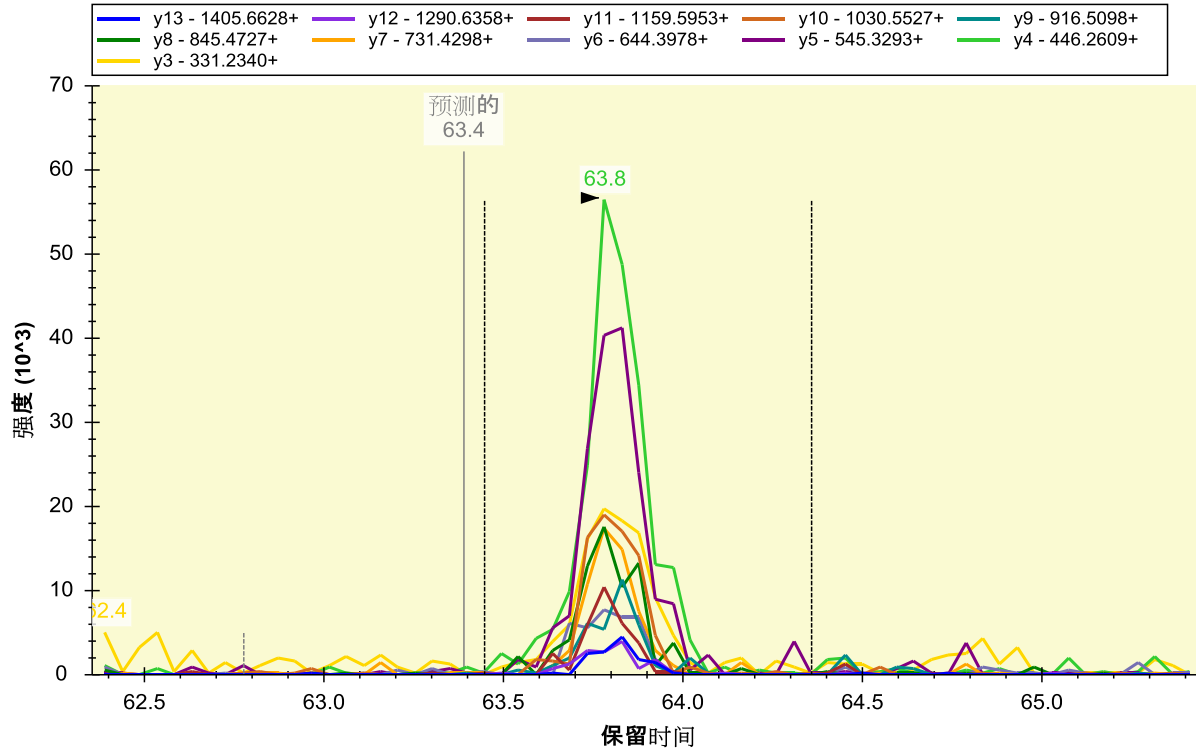
- 选择文档中的第一个肽段。
- 按 F11 放大显示色谱视图中的最佳峰。
- 在“编辑”菜单中，选择“全部展开”，并单击“肽段”。

最后的操作将在肽段视图中显示“点积”值 (dotp)，那是测得的 SRM 峰面积和 MS/MS 库谱图峰强度之间的点积值相似性度量^{4,5}。该值越接近 1.0，则匹配度越高。

肽段视图现在将如下所示：

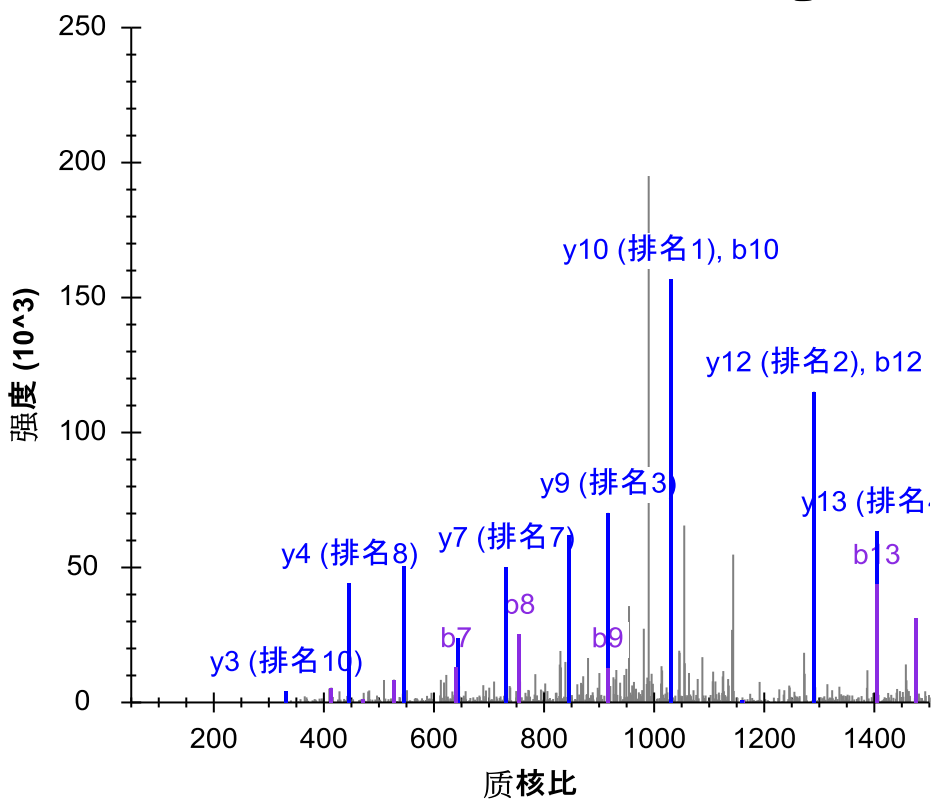


所选肽段的点积值 (0.57) 并不好，但是所有测量的 11 个 γ -离子具有较好的共洗脱峰：



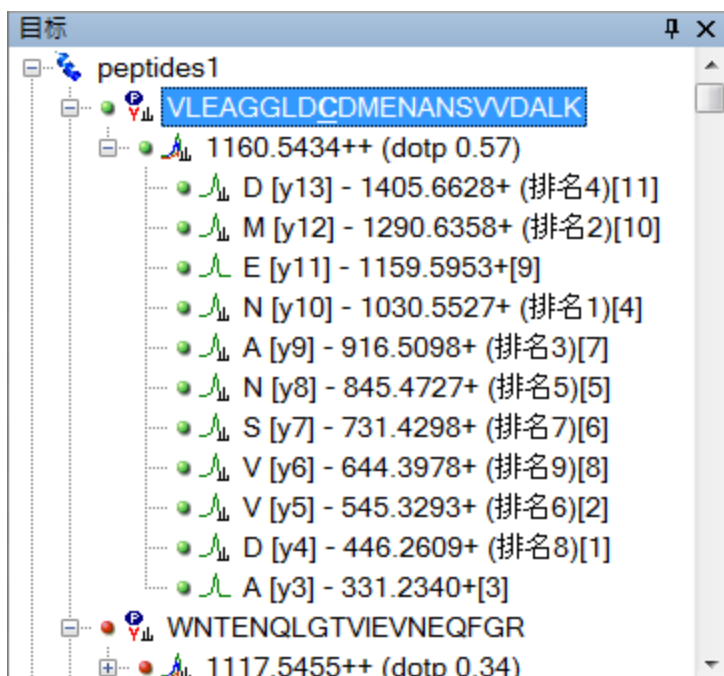
如果您查看 MS/MS 谱图库，您可以看到导致较差的点积值的问题所在：

Worms - VLEAGGLDCDMENANSVVDALK, 电荷2



请注意在 MS/MS 谱图库中的两个最强峰标注有 y -离子和 b -离子 (y_{10} , b_{10} 和 y_{12} , b_{12})。我们已经知道用于 SRM 测量的 Thermo TSQ 仪器不能很好地保留 b -离子, 这意味着这些峰的 b_{10} 和 b_{12} 离子不会在 SRM 测量中出现。

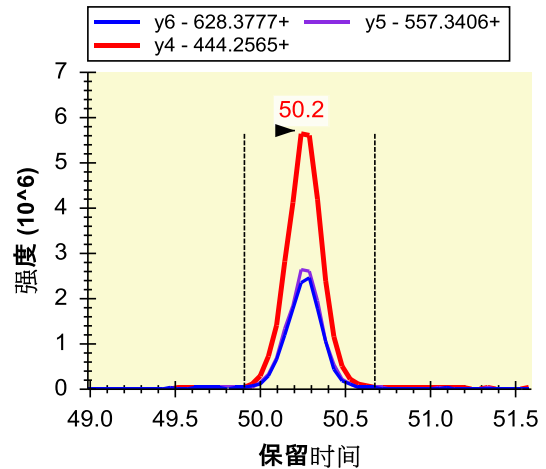
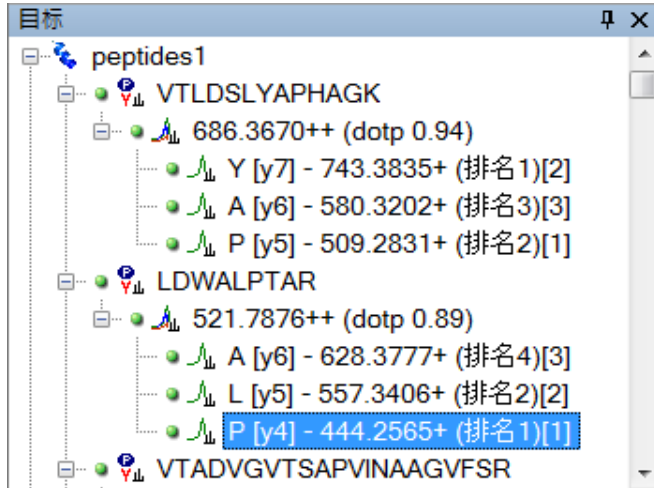
展开母离子 1160.5434++ 来进一步查看离子对, 您将看到:



左侧的排名序号是 MS/MS 谱图库峰排名，而最右边方括号内的数字是 SRM 峰排名。这些数字可能会帮助您决定是否相信这些离子对的测量值对应于 MS/MS 谱图库中的肽段。在本教程中，只需按“删除”键删除该肽段。

下一个肽段 (WNTENQLGTVIEVNEQFGR) 显然没有被测定，因为其最佳峰组仅包含小于一半离子对的峰，生成的点积值为 0.63。您也可以将其删除。

接下来的三个肽段是非常好的候选示例，能够满足这一层面优化的标准。所有三个肽段都有所有离子对的峰，都有 0.98 或更高的点积值。如果您为每个肽段仅选择 3 个离子对，第一个肽段将会比较简单。将其展开，并删去除了 3 个最强的子离子之外的其他所有子离子，其中 MS/MS 库谱图和 SRM 测量值均一致。在下一个肽段中，请注意 MS/MS 库谱图排名第 3 和第 4 的峰几乎相同，保留三个最强的 SRM 峰。这将只剩下以下信息：



查看下一个肽段及其离子对，您会看到在 SRM 中 y_3 有第三大的峰面积，但是有第四大峰面积的 y_{13} 没有小很多。如果您删除这四个最强的峰以外的所有峰，可以按 Shift-F11 进行缩小而观察到 y_3 或 y_{13} 离子都没有很多的噪音或其他特征。 y_{13} 离子，一般比 y_3 离子更有选择性（因为其包含更多完整的肽段序列），在优化时，您应该尽可能找出最具选择性的方法。在本教程中，为该肽段保留 y_{14} 、 y_{13} 和 y_{11} 。

您可以继续使用此方法，删除两个肽段，然后保留一个，保留具有最强信号、最小噪音和最佳选择性的离子对。或者，您可以使用 Skyline 优化表单迅速开始此项工作。

自动优化

Skyline“优化”表格会自动进行最常见的优化操作。您在本教程进行的手动优化可以通过一次操作完成，步骤如下：

- 在“编辑”菜单中，选择“优化”，并单击“高级”。
- 单击“结果”标签。
- 在“最大离子对峰排名”中输入“3”。
- 选中“倾向较大的子离子”复选框。
- 选择“删除缺失结果的节点”。
- 在“线性回归的目标 r 值”中输入“0.95”。
- 在“最小点积”中输入“0.95”。
- 单击“确定”按钮。

此操作将为您留下 72 个肽段和 216 个离子对，且这些肽段和离子对的质量均很高。花点时间在色谱图中浏览它们，步骤如下：

- 在“编辑”菜单上，选择“全部折叠”，并单击“肽段”。
- 按 Home 键。

- 按向下箭头键直至最后一个肽段。

但是，此操作可能显得有些激进。若要采取保守的方法来结合初始自动优化和后续手动检查，您现在可以执行以下额外的步骤：

- 在“编辑”菜单上，单击“撤销”(Ctrl-Z)。
- 在“编辑”菜单中，选择“优化”，并单击“高级”。
- 单击“结果”标签。
- 在“最大离子对峰排名”中输入“6”。
- 选择“删除缺失结果的节点”。
- 在“线性回归的目标 r 值”中输入“0.9”。
- 在“最小点积”中输入“0.9”。
- 单击“确定”按钮。

此操作会将肽段的数量减小至 110，并保留足够的离子对，以保证点积值数值足以用来区别峰的质量。考虑到“优化”表单仍然会缺失一些优化的因素，您可以手动进行最终优化。

高效采集的时序安排

您正在编辑的 Skyline 文档曾在 2009 年春季 MacCoss 实验室的实际实验中使用；您正在采取与我们那时相同的步骤进行操作。但是，那时候 Skyline 还没有“优化”表格，也无法计算点积值。因此，当时我们将优化周期下一个循环的列表手动减少至 86 个肽段。您可遵循我们当时的选择，步骤如下：

- 在“编辑”菜单中，单击“撤销”(Ctrl-Z)。
- 在“编辑”菜单中，单击“管理结果”。
- 单击“删除”按钮。
- 单击“确定”按钮。

这将删除所有未优化的结果和色谱图。

- 在“文件”菜单中，选择“导入”，并单击“结果”。
- 选择“在目录中添加多次进样平行测定”。
- 单击“确定”按钮。
- 在“浏览文件夹”表单中单击“确定”按钮。
- 在显示询问是否删除公共前缀“Unscheduled0”的表单中，单击“请勿删除”按钮。

此项操作将使 Skyline 开始从 MethodRefine 文件夹的两个文件夹（Unscheduled01 和 Unscheduled02）中导入两个新的未安排时序的平行测定。每个文件夹包含两个原始文件，针对完成首次优化后的每个可测量肽段，带有 3 个离子对未安排时序的色谱图。

当前文档仍然包含了很多在这些原始文件中未测量的离子对。若要将文档减少为仅含测量的离子对，操作如下：

- 在“编辑”菜单上，选择“调整”，并单击“删除缺失结果”。

此操作将会留下 86 个肽段和 255 个离子对。

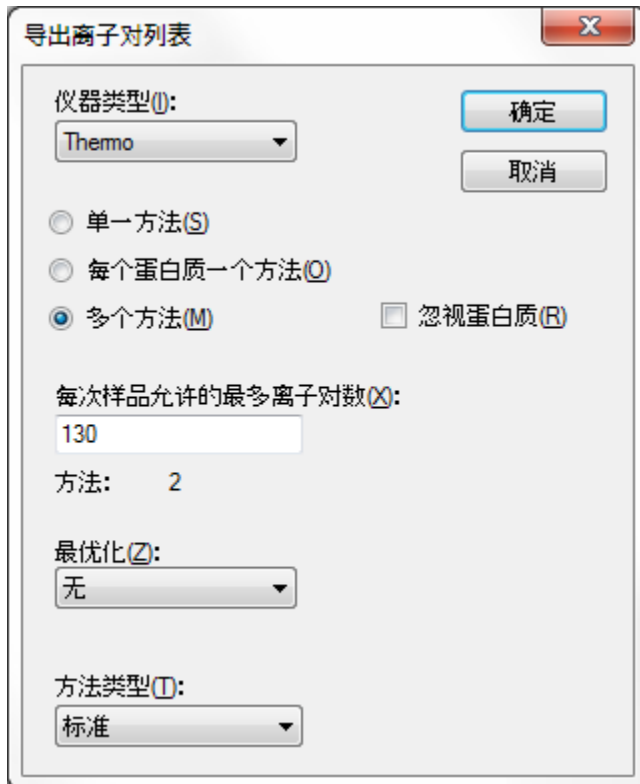
测量保留时间

这些肽段可能在 4 次独立的进样中（而不只是 2 次）得到更好的测量。然而，由于优化的下一个阶段的目的是确定预测保留时间以进行时序安排，我们决定允许延长周期时间并减少洗脱曲线上的点，来减少需要的进样次数。

您可以创建与我们用于测量这些肽段类似的离子对列表，步骤如下：

- 在“文件”菜单上，选择“导出”，并单击“离子对列表”。
- 在“每次进样允许的最多离子对数”中输入“130”。

“导出离子对列表”表单如下所示：



导出离子对列表

仪器类型(I): Thermo

确定 取消

单一方法(S)
 每个蛋白质一个方法(O)
 多个方法(M) 忽视蛋白质(R)

每次样品允许的最多离子对数(X): 130

方法: 2

最优化(Z): 无

方法类型(T): 标准

- 单击“确定”按钮。
- 在“文件名”中输入“未安排时序的”。
- 单击“保存”按钮。

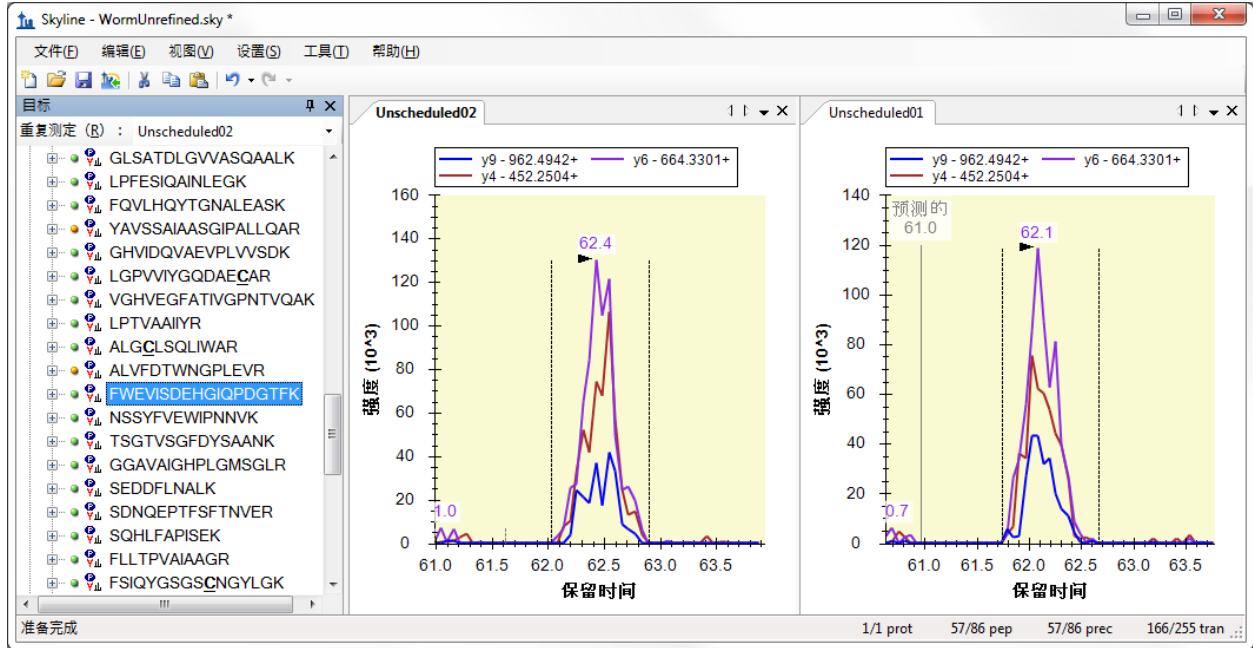
您将在 MethodRefine 文件夹中看到两个离子对列表 CSV 文件（Unscheduled_0001.csv 和 Unscheduled_0002.csv）。这些文件可用于收集新数据，如同您刚刚导入的文件。

查看保留时间运行

查看您导入的未安排时序的保留时间的运行：

- 关闭“MS/MS 谱图”表。
- 在“视图”菜单上选择“排列图”，并单击“平铺”(Ctrl-T)。
- 使用向下箭头键选择肽段。

Skyline 将显示您创建的两个平行测定的图表，如下所示：

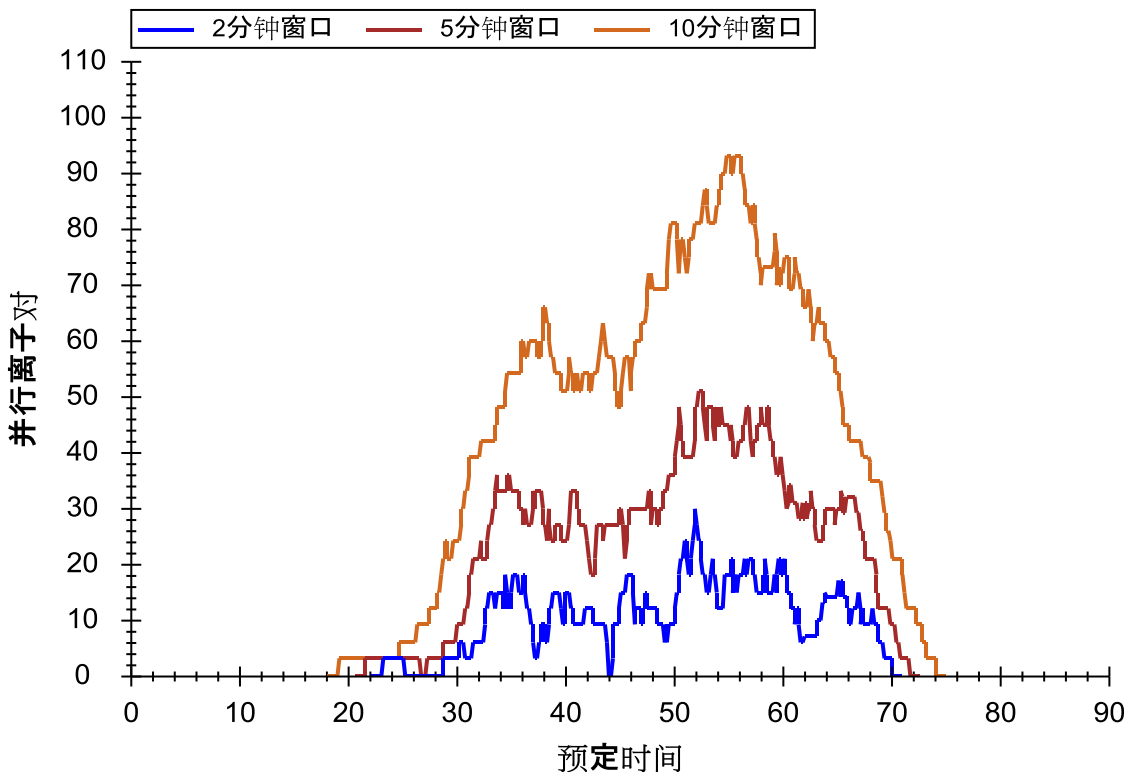


按 Shift-F11，查看所采集数据的整个范围，然后按 F11，返回到最佳峰缩放。

根据这些测得的保留时间，您可以浏览 Skyline 如何对离子对进行时序安排，步骤如下：

- 在“视图”菜单上选择“保留时间”，并单击“时序安排”。

Skyline 将显示下图：



从该图中，您可以查看仪器在整个色谱运行中使用先前测量的保留时间附近的多个可能的时间窗口测量的并行离子对的数量。时间窗口越大，您看到的同时出现的离子对就越多。在此文档中，时间窗口为 5 分钟时，同时测量的离子对的最大数量大约为 60。根据仪器的速度的不同，有可能在单个进样中测量所有剩余的肽段。

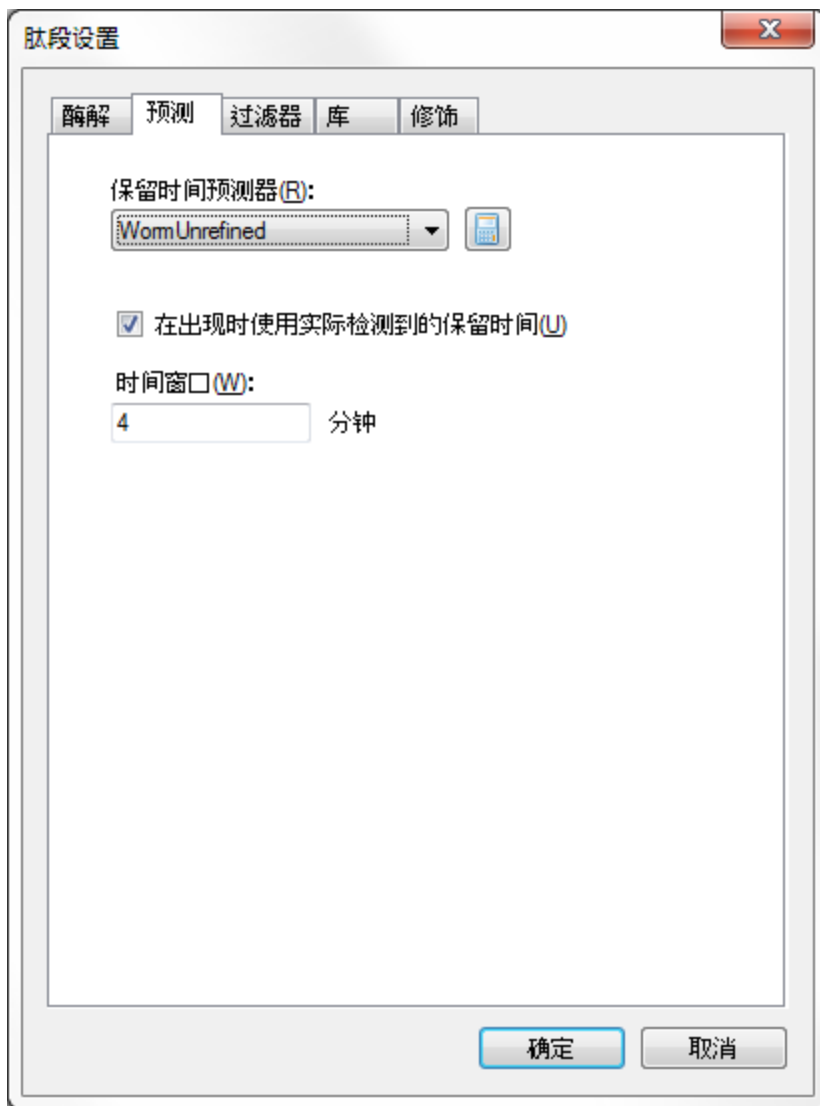
创建安排时序的离子对列表

您将在安排时序的离子对列表中实际使用的时间窗口的选择取决于您色谱分离的可再现性。如果您安排时序的窗口过窄，而无法兼顾肽段的保留时间变异，您会看到截短或缺失的峰。创建安排时序的离子对列表之前，确认您已经很好地了解了色谱分离时间的变异。

在本实验中，我们使用 4 分钟的时间窗口，以进行单次进样平行测定，这样不会在同时测定最大数量的离子对时，对驻留时间或周期产生负面影响。您可以执行下列步骤进行相同的操作：

- 关闭“保留时间”视图。
- 在“设置”菜单上，单击“肽段设置”。
- 单击“预测”标签。
- 在“时间窗口”中输入“4”。

“肽段设置”表单如下所示：



- 单击“确定”按钮。
- 在“文件”菜单上，选择“导出”，并单击“离子对列表”。
- 选择“单一方法”。
- 在“方法类型”列表中选择“预安排时序的”。

“导出离子对列表”表单如下所示：

导出离子对列表 X

仪器类型(I): 确定
 Thermo 取消

单一方法(S)
 每个蛋白质一个方法(O)
 多个方法(M) 忽视蛋白质(B)

最大并行离子对(O):

方法: 1

最优化(O):
 无

方法类型(I): 添加能量梯度(A)
 预定的 添加触发器和参考(N)

- 单击“确定”按钮。
- 在显示的“时序安排数据”表单中，选择“使用平均保留时间”。
- 单击“确定”按钮。
- 在“文件名”中输入“已安排时序的”。
- 单击“保存”按钮。

在 MethodRefine 文件夹中，您将看到剩余肽段的已安排时序的 SRM 新离子对列表文件 (Scheduled.csv)。如果您用 Excel 查看这个文件，您可以看到在 D 栏和 E 栏中添加了起始时间和结束时间，两者间隔时间为 4 分钟。

	A	B	C	D	E	F	G
1	686.367	743.3835	26.7	39.01	43.01	1	VTLDSLYAPHAGK
2	686.367	580.3202	26.7	39.01	43.01	1	VTLDSLYAPHAGK
3	686.367	509.2831	26.7	39.01	43.01	1	VTLDSLYAPHAGK
4	521.7876	628.3777	21.1	54.29	58.29	1	LDWALPTAR
5	521.7876	557.3406	21.1	54.29	58.29	1	LDWALPTAR
6	521.7876	444.2565	21.1	54.29	58.29	1	LDWALPTAR
7	1016.047	1389.748	37.9	62.81	66.81	1	VTADVGVTAPVINAAGVFSR
8	1016.047	1130.632	37.9	62.81	66.81	1	VTADVGVTAPVINAAGVFSR
9	618.8146	909.4676	24.4	29.32	33.32	1	VGGNGADYALATK
10	618.8146	781.409	24.4	29.32	33.32	1	VGGNGADYALATK
11	618.8146	319.1976	24.4	29.32	33.32	1	VGGNGADYALATK

查看多次平行测定数据

您现在已准备好开始对 SRM 方法进行另一个周期的优化。在您正在操作的实验中，我们选择开始运行多个技术平行测定，以便更好地熟悉我们正在测量的肽段以及可能存在的任何问题，例如：

- 峰面积变异
- 保留时间变异
- 潜在干扰

若要查看我们为该方法所测的 5 次进样数据，请执行下列步骤：

- 在“编辑”菜单中，单击“管理结果”。
- 单击“删除所有”按钮。
- 单击“确定”按钮。

此操作将删除未安排时序的平行测定及其色谱图。

- 在“文件”菜单中，选择“导入”，并单击“结果”。
- 选择“在文件中添加单次进样平行测定”（默认值）。
- 单击“确定”按钮。
- 单击文件“Scheduled_REP01.RAW”。
- 按 Shift 并单击“Scheduled_REP05.RAW”文件，选择 5 个文件。
- 单击“打开”按钮。
- 编辑“公共前缀”，以使在询问是否要删除公共前缀的表单中包含“Scheduled_”。
- 单击“删除”按钮。

Skyline 为 5 个平行测定分别创建标签，并开始导入数据，在 Skyline 窗口底部的状态条中显示进度。

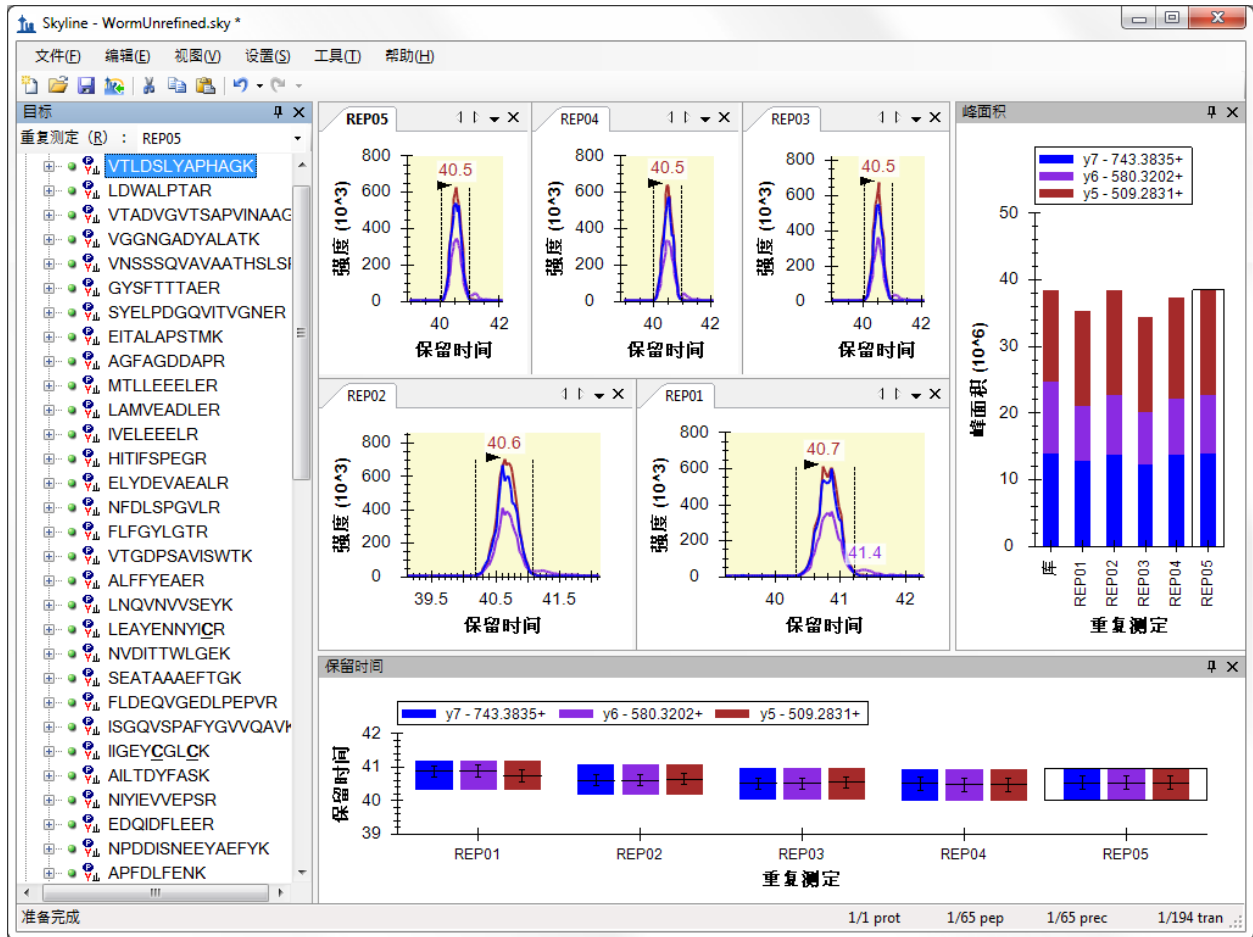
导入完成时，您可以看到在未安排时序的运行中测量的一些肽段已经从已安排时序的运行中删除。通过下列步骤，您可以将文档减少至仅包含已测量的肽段：

- 在“编辑”菜单上，选择“优化”，并单击“删除缺失结果”。

若要准备查看这些数据，请执行下列步骤：

- 在“视图”菜单中，选择“排列图”，并单击“平铺”(Ctrl-T)。
- 在“视图”菜单中，选择“保留时间”，并单击“平行测定比较”(F8)。
- 拖动出现的视窗，将光标停在 Skyline 窗口底部边缘的箭头上，然后释放。
- 在“视图”菜单上，选择“峰面积”，并单击“平行测定比较”(F7)。
- 拖动出现的窗口，将光标停在 Skyline 窗口右边缘的箭头上，然后释放。
- 右键单击其中一个色谱图，然后单击

调节分离条和窗口尺寸，直至 Skyline 窗口如下所示：



您现在可以使用下箭头键，查看为这些肽段采集的数据。其它教程会着重分析为多次平行测定优化的 SRM 方法。

结论

本教程为您介绍 Skyline 提供的强大工具，用于创建新的靶向蛋白质组方法，并对其进行优化以便在多次平行测定的定量研究中进行使用。您已经完成两次循环的靶向方法优化周期，应该能够使用这个流程开始研究自己的蛋白质组学假设。后续的优化可包括优化仪器参数，例如碰撞能量 (CE)，引入合成的含标记的内标肽以提高定量准确性，或运行校正曲线。请查找其他 Skyline 教程和其他 Skyline 功能，以便帮助您充分利用靶向蛋白质组实验。

参考文献列表

1. Prakash, A. *et al.* Expediting the development of targeted SRM assays: Using data from shotgun proteomics to automate method development. *J. Proteome. Res.* 2009. Ref Type: In Press

2. Sherwood, C.A. *et al.* Correlation between γ -type ions observed in ion trap and triple quadrupole mass spectrometers. *J. Proteome. Res.* **8**, 4243-4251 (2009).
3. Krokhin, O.V. Sequence-specific retention calculator. Algorithm for peptide retention prediction in ion-pair RP-HPLC: application to 300- and 100-Å pore size C18 sorbents. *Anal. Chem.* **78**, 7785-7795 (2006).
4. Stein, S.E. & Scott, D.R. Optimization and Testing of Mass-Spectral Library Search Algorithms for Compound Identification. *JASMS* **5**, 859-866 (1994).
5. Tabb, D.L., MacCoss, M.J., Wu, C.C., Anderson, S.D., & Yates, J.R., III Similarity among tandem mass spectra from proteomic experiments: detection, significance, and utility. *Anal. Chem.* **75**, 2470-2477 (2003).