



펩타이드 매핑

Biologics Explorer 2.0 빠른 시작 안내서

Genedata Expressionist® 제공



펩타이드 매핑: Biologics Explorer 빠른 시작 안내서

이 안내서의 내용

파트 A: 소프트웨어와 워크플로

- 1) 어플리케이션 개요
- 2) Biologics Explorer 사용
- 3) 펩타이드 매핑 워크플로에 대한 일반 지침

파트 B: 특정 워크플로 및 어플리케이션

- 1) 특정 펩타이드 매핑 워크플로에 대한 지침:
 - Pepmap_Simple
 - Pepmap_Extended
 - Pepmap_Comparative
 - Pepmap_ReviewSnapshots

파트 A

소프트웨어와 워크플로

1. 어플리케이션 개요



펩타이드 매핑 워크플로의 어플리케이션 개요

- 다음 워크플로는 효소를 사용하여 분해되는 바이오 치료제 분자의 펩타이드 매핑 분석에 주로 사용됨:
 - 시퀀스 범위 및 확인
 - 글리코펩티드 분석
 - PTM(번역 후 변형) 분석
 - 대상 PTM 프로파일링
 - DSB(이황화 결합) 분석
 - 포함체 분석
 - SVA(시퀀스 변이 분석)
- 동일한 분자의 반복 샘플에 대한 배치 분석 가능:
 - 심층 특성화
 - 여러 샘플 비교: 프로세스 개발, 기기 방법 개발
 - 응력 검사
 - 환원 샘플 *대* 비환원 샘플 비교

파트 A

소프트웨어와 워크플로

2. BIOLOGICS EXPLORER 사용



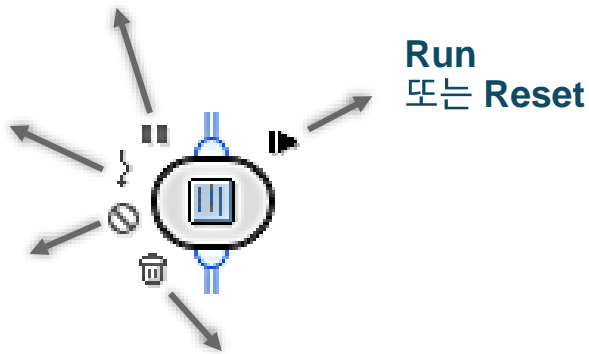
Biologics Explorer 사용

활동 노드 아이콘

Pause: 여기서 워크플로를 일시 중지합니다.
모든 후속 작업은 활성 상태를 유지합니다.

Bypass: 워크플로를 실행할 때 이 작업을 건너뛸니다.

Block: 워크플로를 중지합니다.
이 작업과 모든 후속 작업을 사용할 수 없게 됩니다(회색).



Trash: 중간 데이터를 저장하지 않습니다.
이 아이콘이 활성화되면 특정 활동 노드의 결과를 볼 수 없습니다.
Trash 아이콘을 사용하면 메모리가 절약됩니다. 워크플로 설정이 최적화된 후 이 기능을 사용하십시오.

Biologics Explorer 사용

워크플로 아이콘

워크플로 완료

모든 활동 노드가 완료되었습니다.

워크플로 일시 중지

일부 활동 노드가 완료되었지만 일부는 아직 시작되지 않았습니다.

워크플로 준비

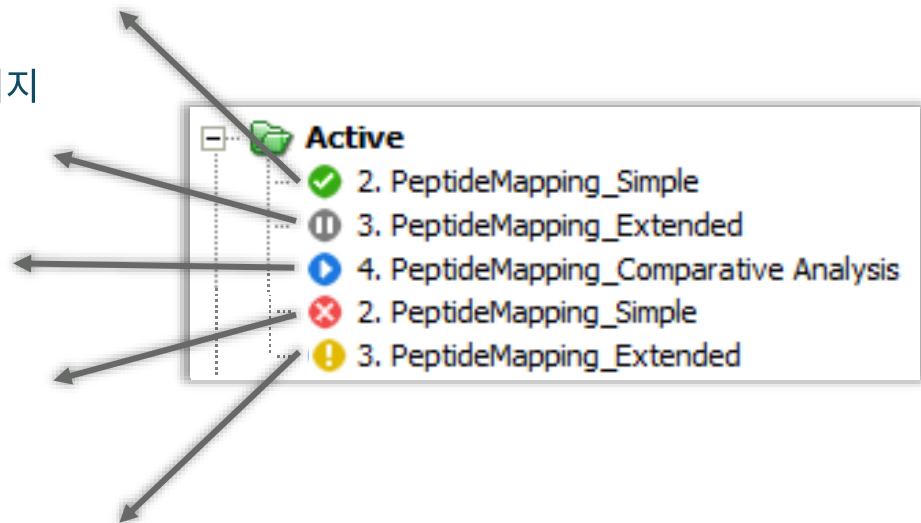
완료된 활동 노드가 없습니다. 워크플로를 시작할 준비가 되었습니다.

워크플로 오류

일부 활동 노드가 완료되었지만 하나 이상의 활동 노드를 실행할 수 없습니다.

워크플로 경고

일부 활동 노드가 완료되지 않았습니다.

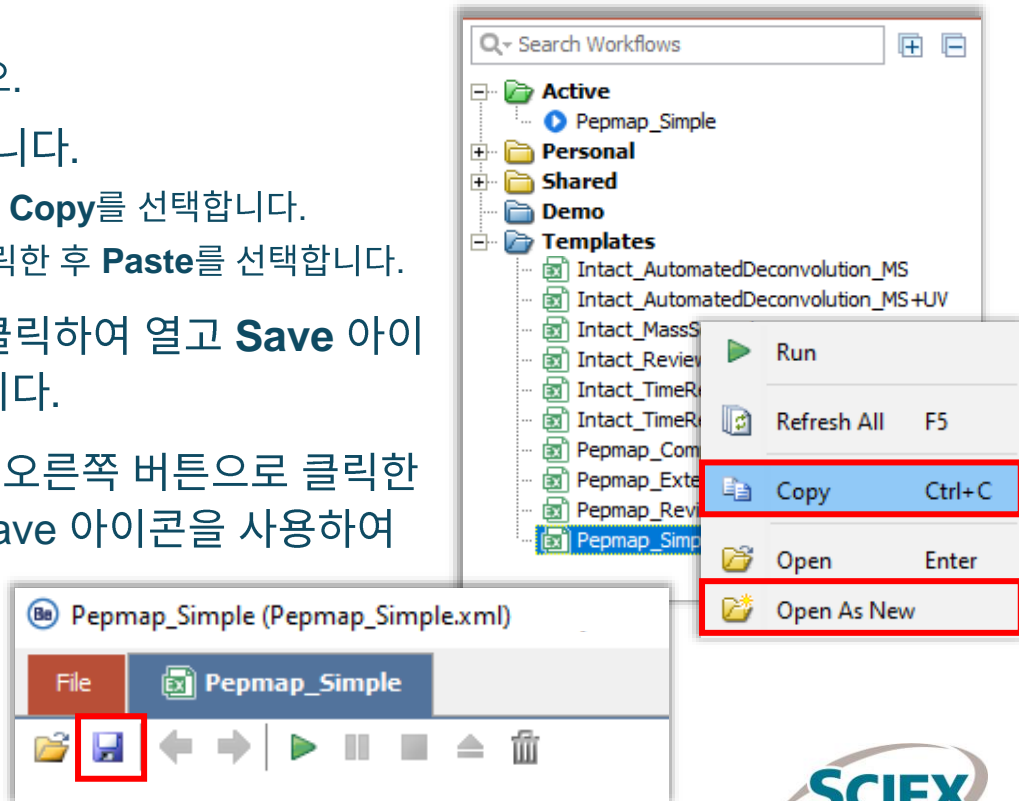


Biologics Explorer 사용: 일반 개요

워크플로 시작 및 저장

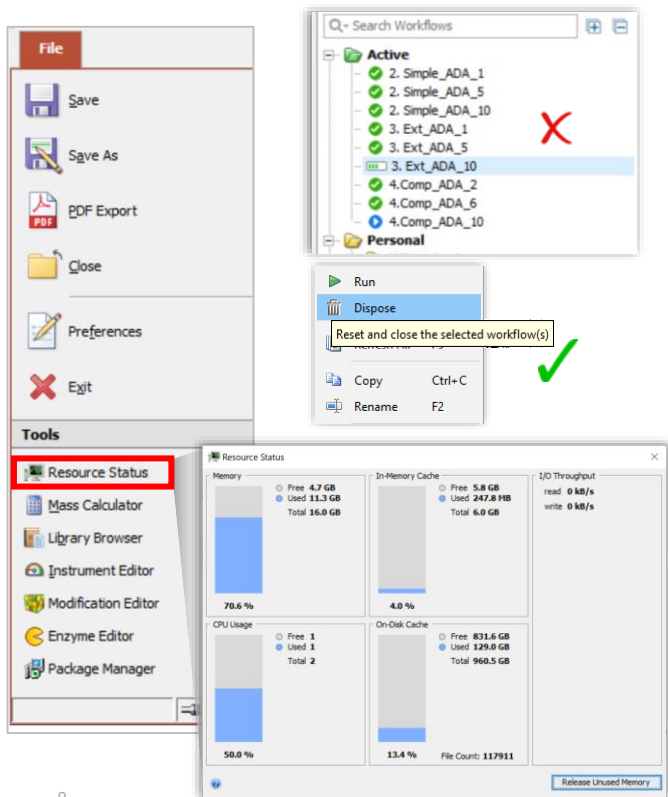
워크플로를 열려면 다음 중 하나를 수행하십시오.

- **Templates** 폴더에서 워크플로를 복사합니다.
 1. 워크플로를 마우스 오른쪽 버튼으로 클릭한 후 **Copy**를 선택합니다.
 2. **Personal** 폴더를 마우스 오른쪽 버튼으로 클릭한 후 **Paste**를 선택합니다.
- **Templates** 폴더에서 워크플로를 두 번 클릭하여 열고 **Save** 아이콘을 사용하여 **Personal** 폴더에 저장합니다.
- **Templates** 폴더에서 워크플로를 마우스 오른쪽 버튼으로 클릭한 후 **Open As New**를 선택하여 엽니다. Save 아이콘을 사용하여 **Personal** 폴더에 저장합니다.



Biologics Explorer 사용: 일반 개요

올바른 리소스 사용을 위한 권장 사항

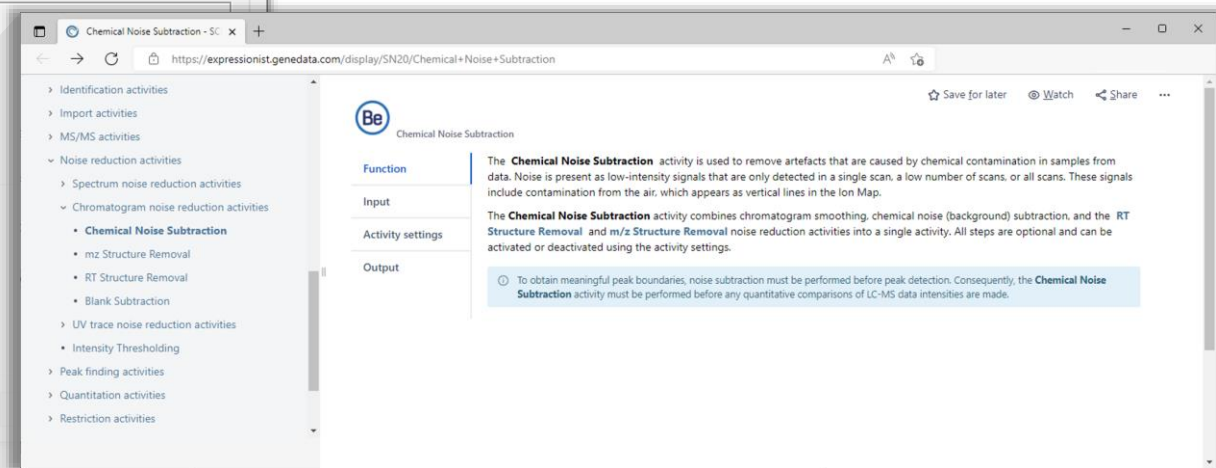
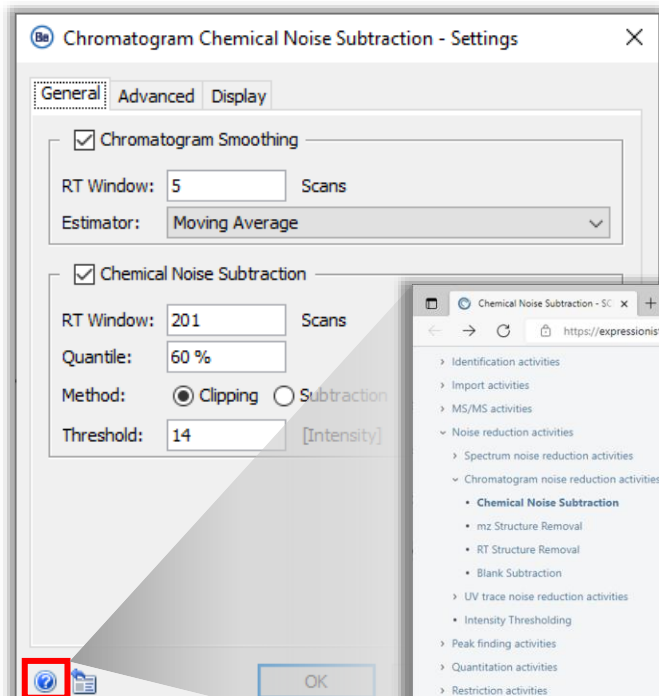


- 모범 사례를 따라 Biologics Explorer의 메모리와 컴퓨팅 성능이 충분한지 확인하십시오.
 - 한 번에 하나의 워크플로만 실행: 일부 활동 노드는 리소스를 매우 많이 사용합니다. 동시에 처리하면 사용 가능한 모든 리소스를 다 쓸 수도 있습니다.
 - 메모리를 절약하려면 최적화된 워크플로에서 가능할 때마다 Trash 아이콘을 활성화하십시오.
 - 데이터를 검토하고 결과를 저장한 후 새 분석을 시작하기 전에 워크플로를 재설정하거나 삭제하십시오.
 - *Save Snapshot* 활동 노드를 사용하여 완료된 결과를 Pepmap_ReviewSnapshots 워크플로에 저장하거나 검토하도록 설정하십시오.
- 처리 컴퓨터에 최소 250GB의 여유 디스크 공간과 6GB의 메모리 내 캐시가 있어야 합니다.
 - 펩타이드 매핑 워크플로에 대해 처리 중인 파일은 최대 4GB를 초과하면 안 됩니다.

Biologics Explorer 사용: 일반 개요

온라인 도움말 액세스

- 개별 활동 노드 및 해당 설정에 대한 정보를 보려면 ? 아이콘을 클릭하여 관련 도움말 페이지를 확인하십시오.



파트 A

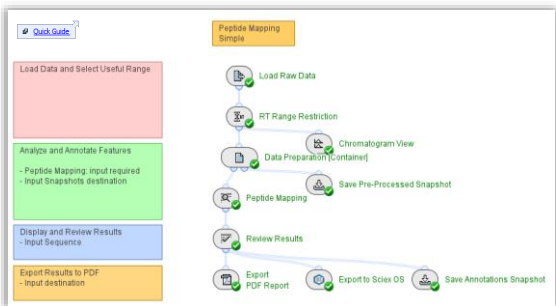
소프트웨어와 워크플로

3. 펩타이드 매핑 워크플로에 대한 일반 지침

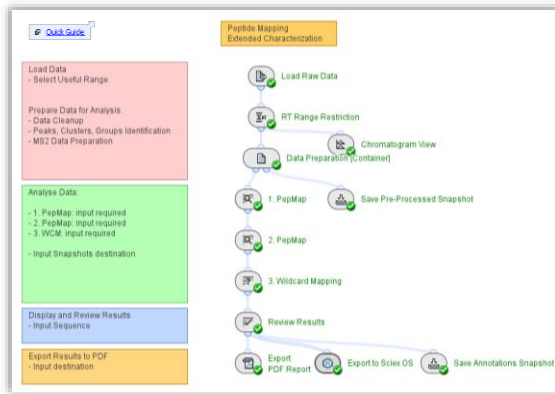


펩타이드 매핑 워크플로에 대한 일반 지침

워크플로 유형



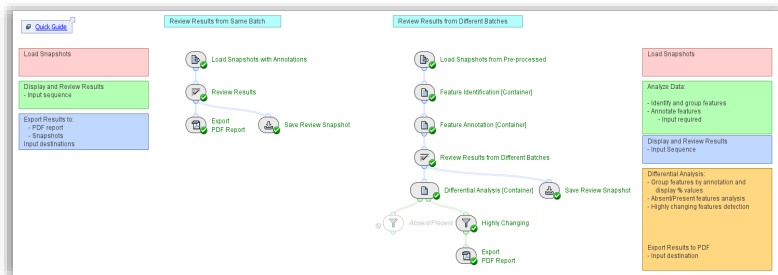
Pepmap_Simple



Pepmap_Extended



Pepmap_Comparative



Pepmap_ReviewSnapshots

펩타이드 매핑 워크플로에 대한 일반 지침

펩타이드 매핑 워크플로의 공통 활동 노트

A. *Load Raw Data*

B. *RT Range Restriction*

C. *Chromatogram View*

D. *Data Preparation [Container]*

i. *Chromatogram Chemical Noise Subtraction*

ii. *Chromatogram RT Alignment*

iii. *Chromatogram Peak Detection*

iv. *Chromatogram Isotope Clustering*

v. *Singleton Filter*

vi. *Charge and Adduct Grouping*

vii. *MS/MS Consolidation*

viii. *MS/MS Peak Detection*

ix. *MS/MS Deisotoping*

E. *Peptide Mapping*

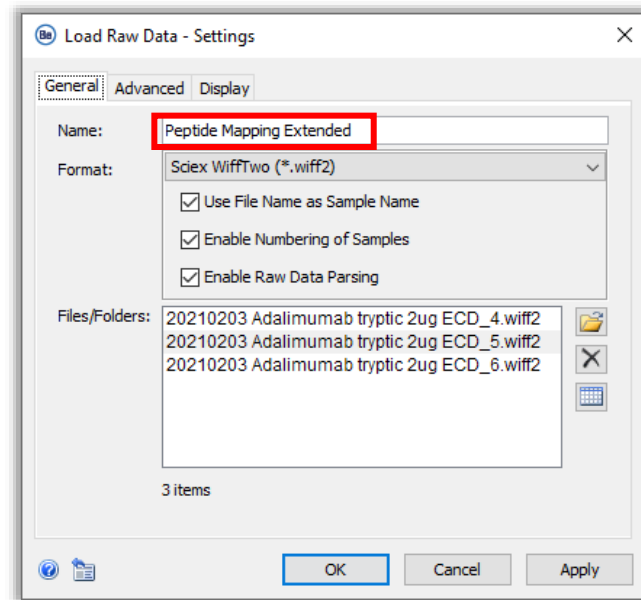
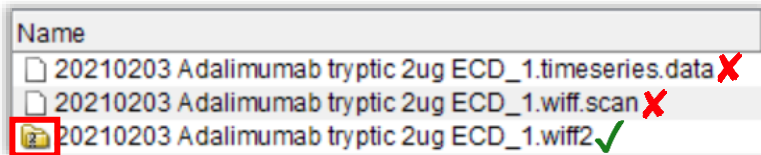
F. *Review Results*

G. *보고 및 내보내기*

Load Raw Data: 분석 이름 및 데이터 파일 추가

General 탭

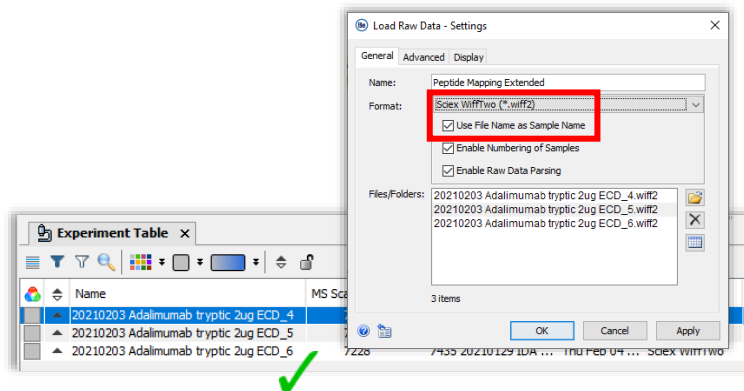
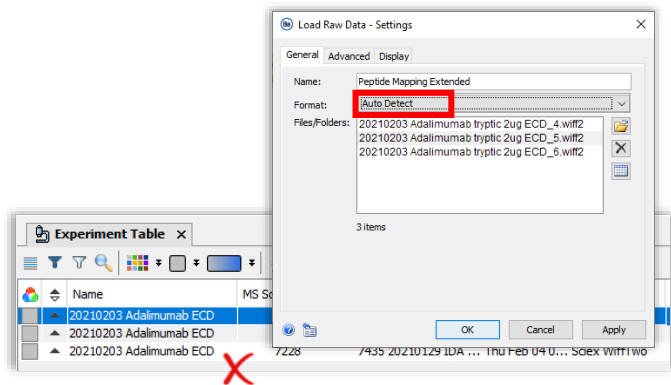
- **Name** 필드에 분석을 정의하는 이름 입력
- 원시 데이터 파일 업로드📁:
 - wiff 또는 wiff2 컨테이너 파일만 선택합니다.
 - ZenoTOF 7600 시스템에서 데이터를 분석하는 경우 wiff2 파일만 사용합니다(wiff 파일 사용 안 함).
 - 이름이 같은 보조 파일을 선택하지 않습니다.



- wiff1 또는 wiff2 컨테이너에 포함된 파일을 보려면 wiff 또는 wiff2 컨테이너를 두 번 클릭하여 엽니다.
 - 포함된 파일 목록에서 업로드할 파일을 선택합니다.

Load Raw Data: Format

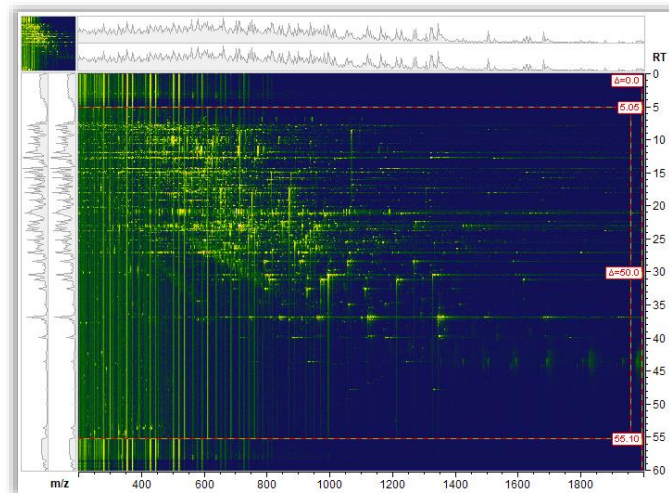
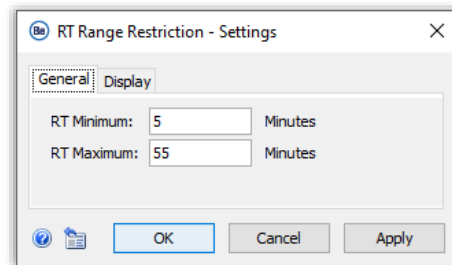
- wiff 또는 wiff2 컨테이너에 포함된 개별 샘플 파일의 이름이 같은 경우 **Auto Detect** 옵션을 사용하지 않습니다.
- 다음을 수행하여 *Experiment Table*에 있는 샘플 이름이 고유하고 *Review Results*에 각 샘플에 대한 올바른 정량적 정보가 표시되는지 확인합니다.
 - Format** 드롭다운 목록에서 **Sciex Wiff** 또는 **Sciex WiffTwo**를 선택합니다.
 - ZenoTOF 7600 시스템을 사용하여 획득한 데이터의 경우 wiff2만 사용하십시오.
 - Use File Name as Sample Name** 확인란을 선택합니다.



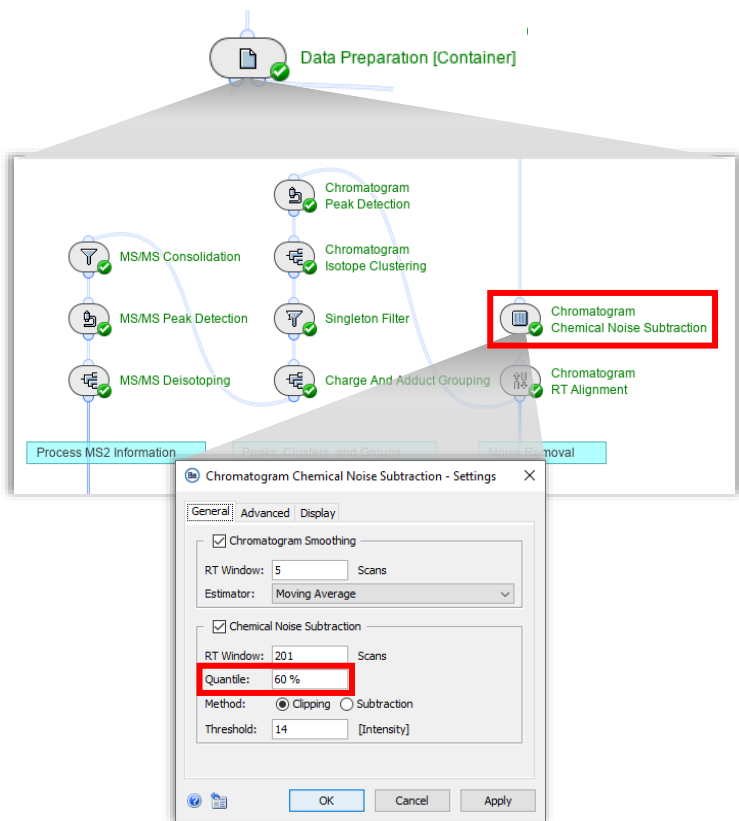
RT 범위 제한

- *Load Raw Data* 활동 노드를 실행한 후 데이터 로드가 완료되면 두 번 클릭하여 엽니다.
- 의미 있는 데이터가 있는 RT(머무름 시간) 범위를 식별합니다.
 - 밸브 전환 또는 컬럼 세척으로 인한 표류 신호를 제외합니다.
 - 분리 범위에 초점을 맞춥니다.

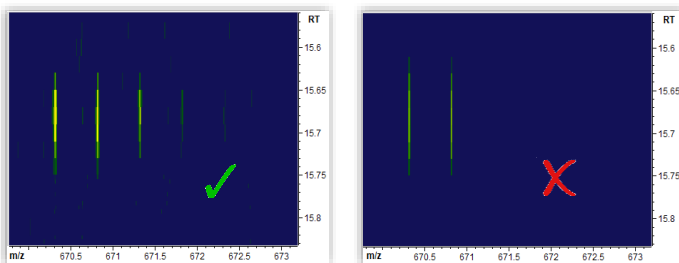
참고: 필드가 비어 있으면 전체 RT 범위가 사용됩니다.



Data Preparation: Chemical Noise Subtraction - Quantile



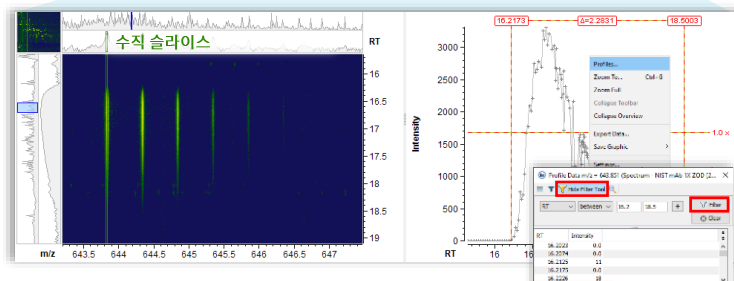
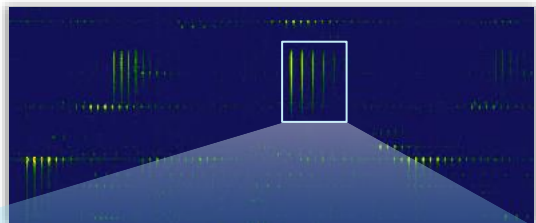
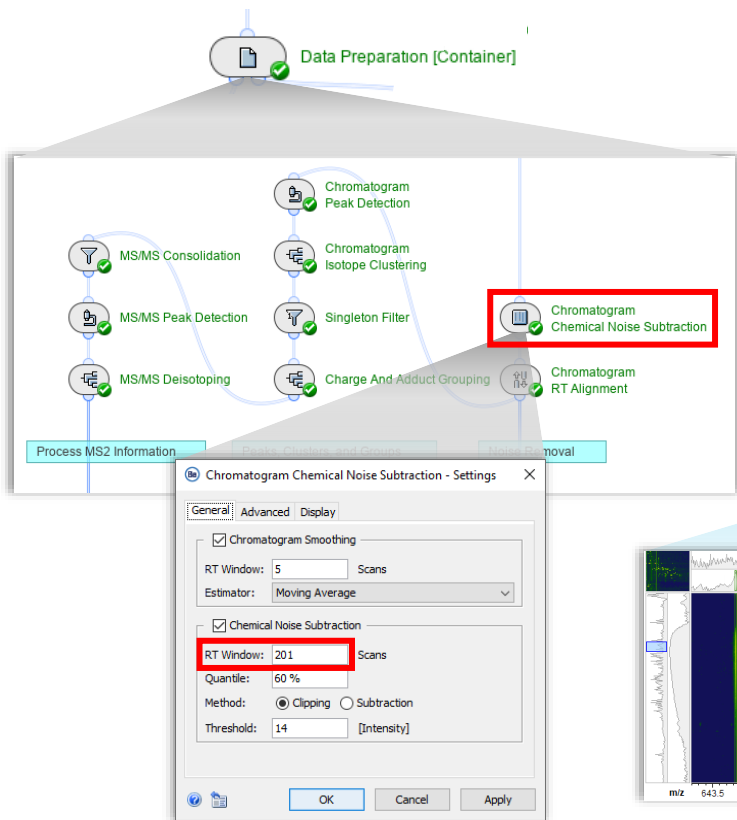
- 다음과 같이 기본 노이즈 제거가 너무 심한 경우에만 이 설정을 변경합니다.
- 단일(+1) 또는 이중(+2) 전하 클러스터에서 또는 관심 있는 저강도 클러스터에서 저강도 동위 원소 피크의 손실
- 매우 넓은(확장된 RT) 피크의 꼬리가 과도하게 잘림




- 관심 클러스터에 영향을 주거나, 위에서 설명한 원치 않는 피크 변형이 너무 자주 나타나는 경우 **Quantile**을 더 낮은 값(예: 50%)으로 설정합니다.

Data Preparation: Chemical Noise Subtraction - RT Window

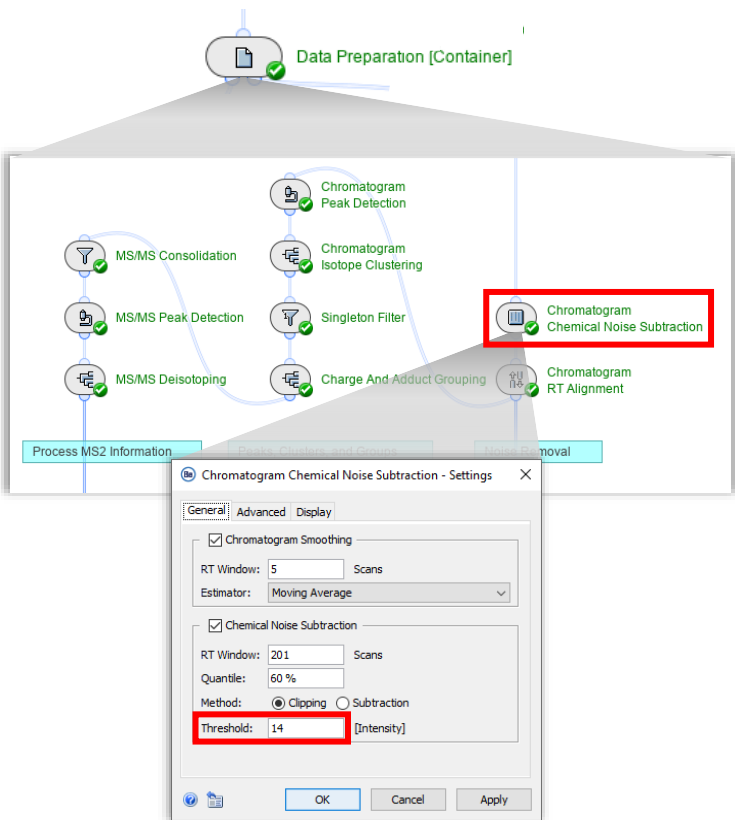
- 데이터 세트의 최대 피크에 50개 미만의 스캔이 포함된 경우 **RT Window**를 줄입니다(예: 101개 또는 151개 스캔으로).
 - 일반적으로 **RT Window**는 데이터 세트의 최대 피크에서 발생하는 스캔 수의 두 배 이상이어야 합니다.



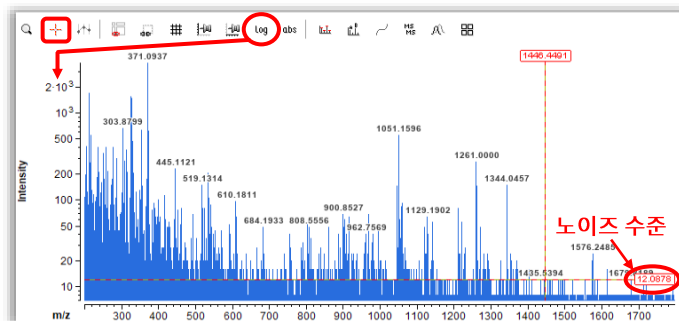
스캔 수를 결정하려면:

1. 이온 맵의 다른 피처보다 더 긴 RT로 확장되는 피처를 찾습니다.
2. 수직 슬라이스로 추출된 이온 크로마토그램을 생성합니다.
3. 추출된 이온 크로마토그램 창을 마우스 오른쪽 버튼으로 클릭하고 **Profiles**를 선택합니다.
4. **Advanced Filter Tool**  을 사용하여 피크의 RT 범위를 선택합니다.

Data Preparation: Chemical Noise Subtraction - Threshold



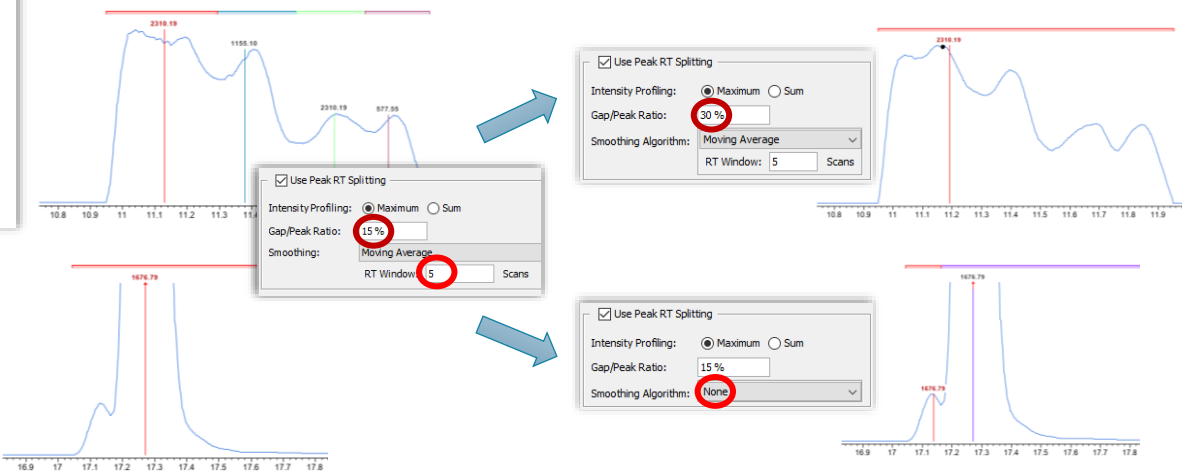
- 노이즈 수준이 *Chromatogram Chemical Noise Subtraction* 활동에서 사전 설정된 **Threshold** 값과 크게 다른 경우 이 설정을 변경합니다.
- 노이즈 수준을 측정하고 적절한 **Threshold** 강도 값을 결정하려면:
 1. 노이즈 수준을 읽을 수 있을 때까지 질량 스펙트럼 강도 축을 끌어 확장하거나, 도구 모음 아이콘을 사용하여 축을 선형 눈금에서 로그 눈금으로 변경합니다.
 2. 십자선 도구를 사용하여 노이즈 수준의 강도를 측정합니다.



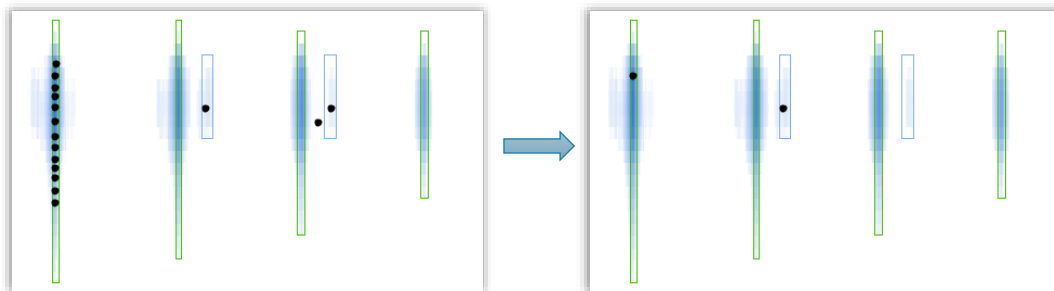
Data Preparation: Chromatogram Peak Detection

- RT 방향으로 근접하게 용리되는 구성 요소의 피크 분할을 필요에 따라 수정할 수 있습니다.
 - 분할을 줄이려면 **Gap/Peak Ratio**를 늘립니다.
 - 분할 감도를 높이려면 **Smoothing**을 줄이거나 제거합니다.

The image shows a workflow diagram for 'Data Preparation [Container]'. The 'Chromatogram Peak Detection' step is highlighted with a red box. Below the workflow is a detailed view of the 'Chromatogram Peak Detection - Settings' dialog box. In this dialog, the 'Gap/Peak Ratio' is set to 15% and the 'RT Window' is set to 3 Scans, both of which are highlighted with red boxes. Other settings include 'Summation' (Summation Window: 6 Scans), 'Peak Detection' (Minimum Peak Size: 5 Scans, Maximum Merge Distance: 4 Points, Merge Strategy: Centers), and 'Smoothing Algorithm' (Moving Average).



Data Preparation: MS/MS Consolidation



- 이 활동 노드는 동일한 피크 및 클러스터에서 MS/MS 데이터를 병합합니다.
 - Consolidation은 MS/MS 스펙트럼을 개선하여 더 많은 식별을 가능하게 합니다.
 - Consolidation은 MS/MS 스펙트럼이 너무 모호한 경우 가양성을 줄일 수 있습니다.

- MS/MS 병합에 **Across Chromatograms** 옵션을 사용할 수 있습니다.
 - 이렇게 하면 기술적 반복 실험에서 식별에 대한 신뢰도가 향상됩니다.
 - 개별 샘플 시퀀스 범위를 평가할 때 이 옵션을 사용하지 마십시오.

MS/MS Consolidation - Settings

General | Advanced | Display

Remove: MS/MS not in Features (Autodetect) v

Observable: Max. Intensity v

Consolidation: Merge v

Level: One per Cluster v

Across Chromatograms

m/z Tolerance: 0.1 Da

Min. Similarity: 0

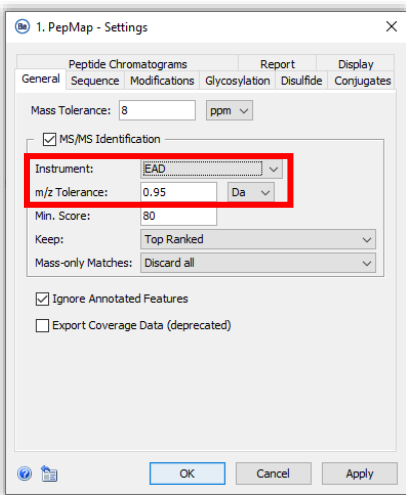
Filter MS/MS Peaks

Max. Number of Peaks: 100

Min. Peak Intensity: 5

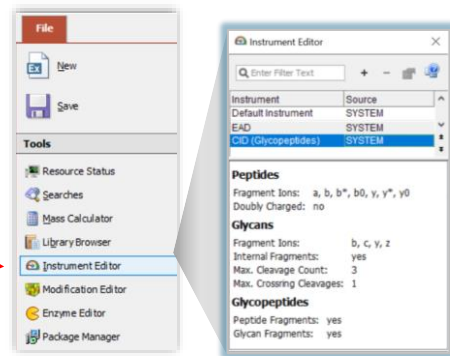
OK Cancel Apply

Peptide Mapping: 설정 구성 (1)



General 탭:

- **Instrument:** 특정 실험 설정에 따라 선택합니다.
 - 검토하거나 수정하려면 **File > Tools > Instrument Editor**로 이동합니다.



m/z Tolerance:

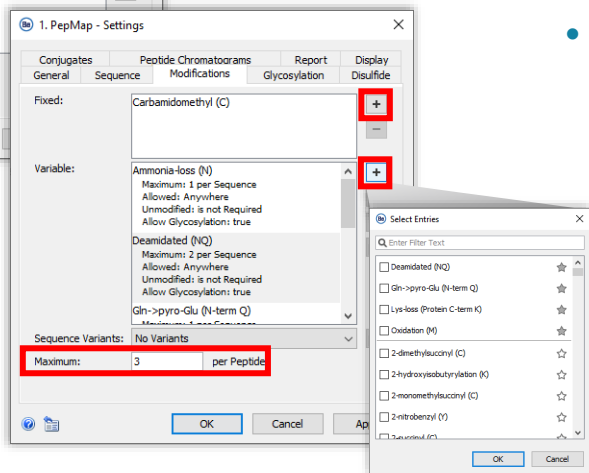
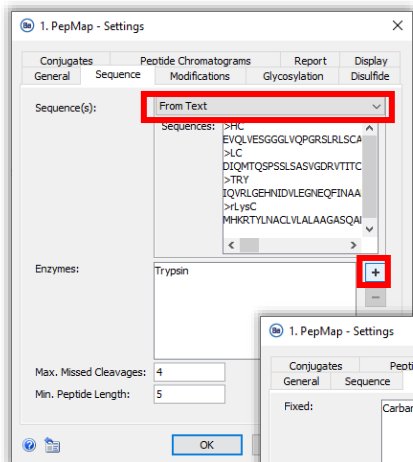
- 기본값(0.95Da)은 MS 질량 정확도를 반영하지 않습니다. MS/MS 전처리가 m/z 에 미치는 잠재적 영향을 줄이는 대신 가능한 식별 옵션을 늘립니다.
 - ZenoTOF 7600 시스템을 사용하여 생성된 데이터를 분석하는 경우 **m/z Tolerance**를 20ppm으로 줄입니다. 다른 MS 시스템을 사용하여 생성된 데이터를 분석하기 위해 **m/z Tolerance**를 20ppm으로 줄일 수도 있습니다.
 - **m/z Tolerance**를 줄이면 생성되는 모호한 주석 또는 가양성 수가 제한됩니다.
- 필요한 경우(예: 데이터의 오차 분포가 넓은 경우) 기본값을 늘릴 수 있습니다.

Peptide Mapping: 설정 구성 (2)



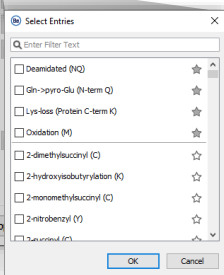
Sequence 탭:

- **Sequence(s):** 텍스트로 붙여 넣거나 FASTA 파일로 업로드합니다.
 - 효소 특이성, 최대 분열 손실 수 및 최소 펩타이드 길이를 필요에 따라 조정할 수 있습니다.
- **Enzymes:** 시스템 구성 효소와 사용자 정의 효소 목록을 보려면 오른쪽의 +를 사용하여 **Select Entries** 대화 상자를 엽니다.

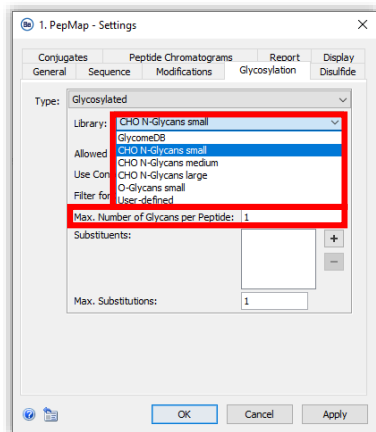


Modifications 탭:

- 오른쪽의 +를 사용하여 **Select Entries** 대화 상자를 연 후 가능한 **Fixed** 또는 **Variable** 변형 목록을 확인합니다.
 - 별 아이콘을 선택하여 자주 사용하는 변형을 즐겨찾기로 추가할 수 있습니다.
 - 과잉 또는 과소 알킬화를 분석하려면 시스테인 및 기타 대상 아미노산에 대해 알킬화 시약을 **Variable**로 설정합니다.

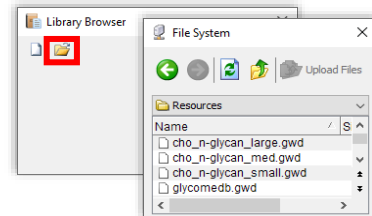


Peptide Mapping: 설정 구성 (3)



Glycosylation 탭:

- **Library:** 시스템 구성 라이브러리 또는 사용자 정의 라이브러리를 선택합니다.
 - 글리칸 라이브러리를 검토하거나 수정하려면 **File > Tools > Library Browser > Resources**로 이동합니다.



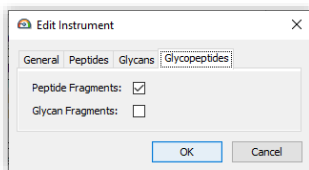
- **Max. Number of Glycans per Peptide:** 검색을 진행하기 위해 허용되는 예상 글리코펩티드 후보 수 임계값이 있습니다(자세한 내용은 다음 페이지 참조).

- **Allowed Sites: Only N-linked:** 일반적으로 펩타이드당 잠재적 공통 시퀀스가 더 적기 때문에 *N*-글리코실화에 대한 검색은 검색 기준에 더 관대합니다.
 - 펩타이드당 최대 4개의 *N*-글리칸이 허용되는 최대값입니다.
 - 분열 손실 및 가변 변형의 수는 검색 시간에 영향을 줍니다.

- **Allowed Sites: Only O-linked:** 모든 세린 및 트레오닌(S 및 T) 잔기는 *O*-글리코실화의 잠재적 부위입니다.
 - 많은 잠재적 글리코실화 부위를 포함하는 긴 펩타이드는 예상 글리코펩티드 후보의 수와 후속 처리 시간에 많은 영향을 줍니다.
 - 예를 들어 RP/KP에서 분열이 제한되지 않도록 설정에서 트립신/P를 사용하는 등 더 짧은 펩타이드를 생성하는 효소를 사용하면 검색 시간을 줄이고 총 후보 수를 제한할 수 있습니다.

참고: **Edit Instrument** 설정에서 글리코펩티드에 대한 **Glycan Fragments**를 비활성화하면 복합 글리칸 검색에 필요한 시간이 줄어듭니다.

CID 모드에서 획득한 데이터의 경우 **Glycan Fragments**를 활성화하는 것이 좋습니다.



Peptide Mapping: 설정 구성 (4)

트립신을 사용하여 분해된 에타너셉트의 O-글리칸에 대해 허용되는 검색 조합의 예:

효소: 트립신
분열 손실 수: 1

Glycans/ peptide	Size of glycan library				
	3	4	5	6	7
3	✓	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	✓	✗
5	✓	✓	✗	✗	✗
6	✗	✗	✗	✗	✗
7	✗	✗	✗	✗	✗

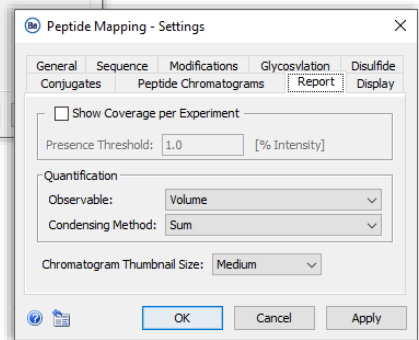
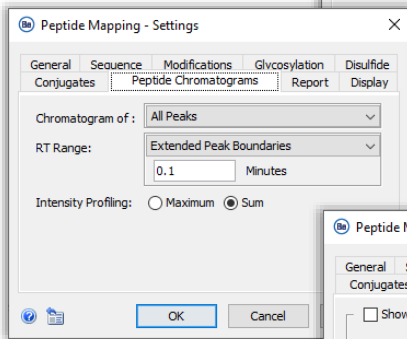
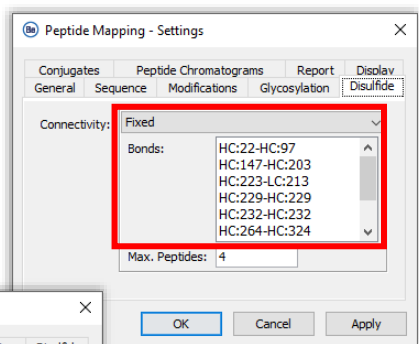
효소: 트립신/P
분열 손실 수: 0

Glycans/ peptide	Size of glycan library				
	3	4	5	6	7
3	✓	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	✓	✓
5	✓	✓	✓	✓	✗
6	✓	✓	✓	✗	✗
7	✓	✓	✓	✗	✗

Glycosylation 탭:

- 검색을 계속할지 여부를 결정하기 위해 예상 글리코펩티드 후보 수를 계산하는 데 다음과 같은 여러 요인의 조합이 사용됩니다.
 - 글리칸 라이브러리의 글리칸 수(치환기 포함)
 - 관심 있는 관련 글리칸이 포함된 최소 라이브러리 크기를 사용합니다.
 - **Filter for Core Structures**를 선택하면 후보를 제한하는 데 도움이 될 수 있습니다.
 - 펩타이드당 허용되는 최대 글리칸 수
 - 분자에 대해 예상되는 값을 초과하지 마십시오. 값이 작을수록 더 큰 라이브러리를 사용할 수 있으며 *반대의 경우도 마찬가지입니다.*
 - 펩타이드에서 글리코실화의 이론적 부위
 - 분열 손실 수와 효소 특이성의 영향을 받습니다.
- 기타 검색 매개 변수는 전체 검색 시간에 영향을 줍니다.
 - 완료 시간을 단축하려면:
 - **Edit Instrument** 설정에서 **Glycan fragments**를 비활성화합니다.
 - 가변 변형 및 펩타이드당 수를 최소화합니다.
 - 최소 펩타이드 길이를 최대화합니다.
 - 펩타이드당 글리칸 수를 줄입니다.
 - 글리칸 라이브러리의 크기를 줄입니다.

Peptide Mapping: 설정 구성 (5)



Disulfide 탭:

- 비환원 샘플의 경우: **Connectivity**를 **Fixed**로 설정합니다. 올바른 구문(예: HC:22-HC:97)을 사용하여 예상 이황화 브리지를 지정합니다.
 - 사슬 이름은 **Sequence** 탭에 지정된 이름과 일치해야 합니다.
- 환원 샘플의 경우: **Connectivity**를 **None**으로 설정합니다.

Peptide Chromatograms 탭:

- 이러한 설정은 이 활동의 결과를 볼 때 펩타이드 크로마토그램의 레이아웃을 제어하며 변경할 필요가 없습니다.

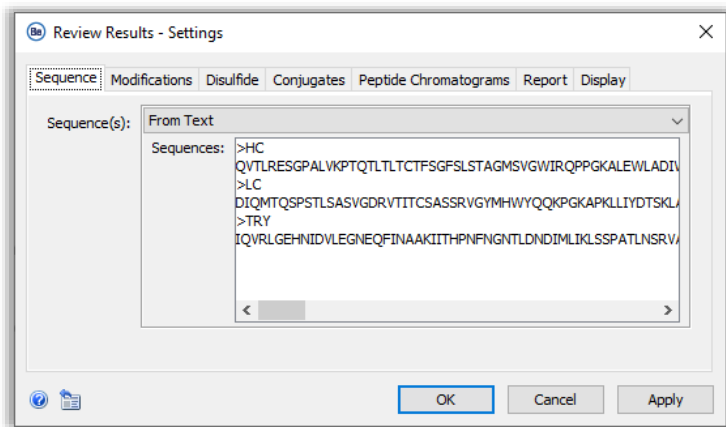
Report 탭:

- QTOF 시스템을 사용하여 획득한 데이터에 대해 **Observable** 값을 **Volume**으로 설정하는 것이 좋습니다.

Review Results: 설정 구성



Review Results



Sequence 탭:

- **Sequence(s):** 텍스트로 붙여 넣거나 FASTA 파일로 업로드합니다.
 - *Peptide Mapping* 활동 노드와 *Review Results* 활동 노드에 동일한 FASTA 단백질 시퀀스를 사용합니다.

Review Results: 펩타이드 매핑 결과 검토



Review Results

- *Review Results* 활동 노드를 열어 이전 *Peptide Mapping* 활동 노드의 통합 결과를 검토합니다.

The screenshot displays the 'Review Results' window in the SCIEX software. It features several panels: 'Peptide Map' showing a protein sequence with highlighted peptides, 'Fragment Spectra Viewer' showing a mass spectrum for a specific peptide, and 'Peptide Table' listing identified peptides with their modifications and calculated masses. A red box highlights the 'Review' button in the bottom left and the 'Peptide Table' content.

✓ X	Range	Peptide	Modifications	Mod. Locations	Glycans	Calc. Mass	Fla
✓	1 HC[1-16]	EVQLVESGGGLVQPGR	Glu->pyro-Glu	[N-term E]		1605.85	
✓	2 HC[1-16]	EVQLVESGGGLVQPGR				1623.86	
✓	3 HC[1-16]	EVQLVESGGGLVQPGR	(+356.21558)	[Q3]		1980.07	W
✓	4 HC[1-19]	EVQLVESGGGLVQPGRSLR	Glu->pyro-Glu	[N-term E]		1962.06	
✓	5 HC[1-19]	EVQLVESGGGLVQPGRSLR				1980.08	
✓	6 HC[1-38]	EVQLVESGGGLVQPGRSLRSLCAASGFTDDYAMHWVR	Carbamidom...	[C22]		4195.04	
X	7 HC[1-38]	EVQLVESGGGLVQPGRSLRSLCAASGFTDDYAMHWVR	Carbamidom...	[C22] [M34]		4211.03	
✓	8 HC[1-43]	EVQLVESGGGLVQPGRSLRSLCAASGFTDDYAMHWVRQ...	Carbamidom...	[C22]		4676.3	

1. **Review** 모드를 활성화하고 모든 관련 피크에 대해 하나의 주석을 수락합니다.
2. 다른 모든 중복 주석을 거부합니다.
3. **Save**를 클릭하여 변경 내용을 적용합니다.

활동 노드가 다시 실행되어 펩타이드 수량이 자동으로 다시 계산됩니다.

Review Results: 이성체 분화



Review Results

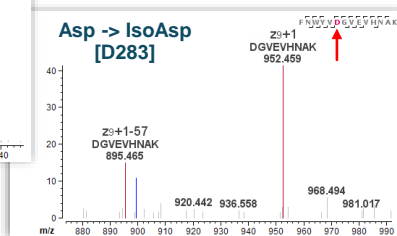
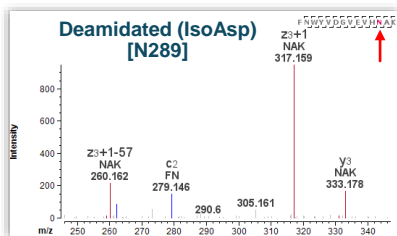
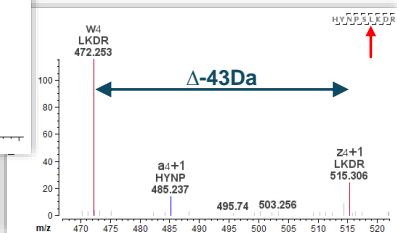
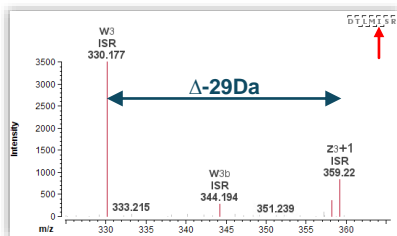
- EAD를 사용한 MS/MS 분석 중에 이성체 아미노산 잔기 간의 분화를 가능하게 하는 진단 내부 단편 이온이 생성됩니다.

- 류신(Leu) 또는 이소류신(Ile)이 있는지 확인하려면:

- MS/MS 스펙트럼에서 이온에 w_n 또는 w_{nb} 로 주석이 추가됩니다.
 - 류신: 해당 $z+1$ 이온에서 43Da의 질량 변화가 있는 w_n 이온
 - 이소류신: 해당 $z+1$ 이온에서 29Da의 질량 변화가 있는 w_n 이온

- 아스파르트산(Asp) 또는 이소아스파르트산(IsoAsp)이 있는지 확인하려면:

- MS/MS 스펙트럼에서 이온에 c_n+57 또는 z_m+1-57 로 주석이 추가됩니다.
 - MSMS 스펙트럼에서 c_n+57 또는 z_m+1-57 주석이 달린 이온은 이소아스파르트산이 있음을 나타냅니다.
 - 아스파르트산은 펩타이드 백본에 메틸렌기가 없으므로 이러한 진단 내부 단편 이온을 생성하지 않습니다.



참고: 최적의 결과를 얻으려면 *Peptide Mapping* 활동 노트에서 20ppm 미만의 m/z Tolerance를 사용하십시오.

Review Results: 이성체 분화(고리화 및 탈아미드화)



Review Results

✓ X	Range	Peptide	Disulfide Bonds	Modifications	Mod. Locat...
	39 TRY[45-54]	LSSPATLNSR			
	40 TRY[55-62]	VATVSLPR			
	10 HC[278-291]	FNWYVDGVEVHNAK		Asp->IsoAsp	[D283]
	29 HC[413-419]	LTVDKSR		Asp->IsoAsp	[D416]
	32 LC[45-52]	LLIYDTSK		Asp->IsoAsp	[D49]
	8 HC[259-277...]	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK=VSVLTVLHQDWLNGKEYKCK HC:264->HC:324		Deamidated	[N318]
	12 HC[278-291]	FNWYVDGVEVHNAK		Deamidated	[N289]
	11 HC[278-291]	FNWYVDGVEVHNAK		Deamidated (IsoAsp)	[N279]
	13 HC[278-291]	FNWYVDGVEVHNAK		Deamidated (IsoAsp)	[N289]
	17 HC[305-320]	VSVLTVLHQDWLNGK		Deamidated (IsoAsp)	[N318]
	18 HC[305-320]	VSVLTVLHQDWLNGK		Deamidated (IsoAsp)	[N318]
	20 HC[305-323]	VSVLTVLHQDWLNGKEYK		Deamidated (IsoAsp)	[N318]
	21 HC[305-323]	VSVLTVLHQDWLNGKEYK		Deamidated (IsoAsp)	[N318]
	22 HC[305-323]	VSVLTVLHQDWLNGKEYK		Deamidated (IsoAsp)	[N318]
	14 HC[292-304]	TKPREEQYNSTYR		G0F	[N300]
	15 HC[292-304]	TKPREEQYNSTYR		G1F	[N300]
	7 HC[252-258]	DTLMISR		Oxidation	[M255]

- 데이터 검토를 간소화하기 위해 관련 변형을 필터링할 수 있습니다. 예를 들면 다음과 같습니다.
 - Asp → IsoAsp
 - Deamidated
 - Deamidated (IsoAsp)
- 그런 다음 MS/MS 스펙트럼에 있는 진단 내부 단편 이온을 사용하여 식별을 검증하고 필요에 따라 결과를 수락 또는 거부할 수 있습니다.

Review Results: 사용자 지정 레이아웃 생성

레이아웃을 저장하거나 저장된 레이아웃을 로드하려면 클릭합니다.

- 각 창의 연결을 끊고 새 위치에 고정할 수 있습니다.
- 연결이 끊긴 창이 고정될 위치는 파란색 상자로 강조 표시됩니다.
- 이온 맵을 **Peptides** 탭으로 이동하려면:
 1. **Data** 탭을 선택하고 아이콘을 클릭하여 **Data** 탭 창의 연결을 끊습니다.
 2. 그런 다음 이온 맵 또는 **Data** 탭 창의 내부 창을 고정 해제하고 **Peptides** 탭의 새 위치로 끌 수 있습니다.
- **Layout** 아이콘으로 자주 사용하는 레이아웃을 저장하고 액세스할 수 있습니다.

The screenshot displays the 'Review Results' window in the PeptideMapping software. It features several panels: a 2D mass spectrometry plot on the left, a 'Modifications Table' in the top center, a 'Fragment Spectra Table' on the top right, a 'Peptide Table' at the bottom left, and a 'Cluster Table' at the bottom right. A red box highlights a 'Layout' icon in the top right corner of the software interface. The 'Peptide Table' contains the following data:

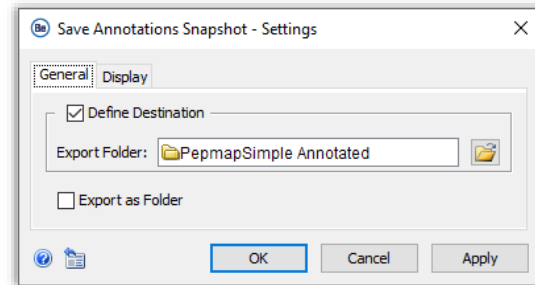
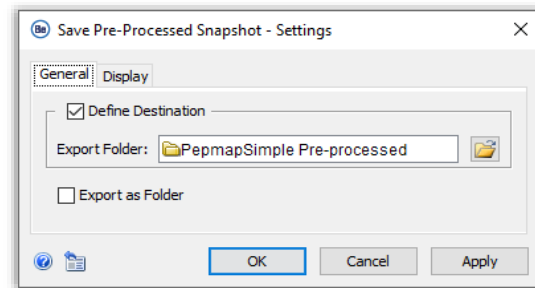
Range	Peptide	Disulfide Bonds	Modifications	Mod. Locati...	Calc. Mass	Flags	Group Id	RT	Delta [ppm]	Coriolis
224 H(233-239)	DTLMISR	(-48,003117)	[M256]	786.42	230	7.98	19			
225 H(233-239)	DTLMISR	(-18,008715)	[I254]	818.40	924	4.41	13			
226 H(233-239)	DTLMISR		[M256]	854.41	652	10.40	2, 11			
227 H(233-239)	DTLMISR		Oxidation	890.42	1257	8.94	1, 17	19		
228 H(233-239)	DTLMISR		Carbamidomethyl	891.43	1388	11.24	3, 23	17		
229 H(233-239)	DTLMISRTVTCVVDVHSDPEIK	(-137,11087)	[I255]	2760.30	1946	13.40	11			

des Data Q

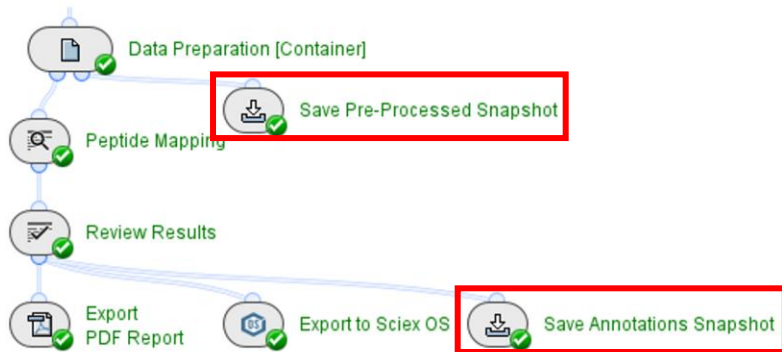
Data 탭 창의 연결을 끊으려면 클릭합니다.

보고: 스냅샷 및 보고서의 대상 정의

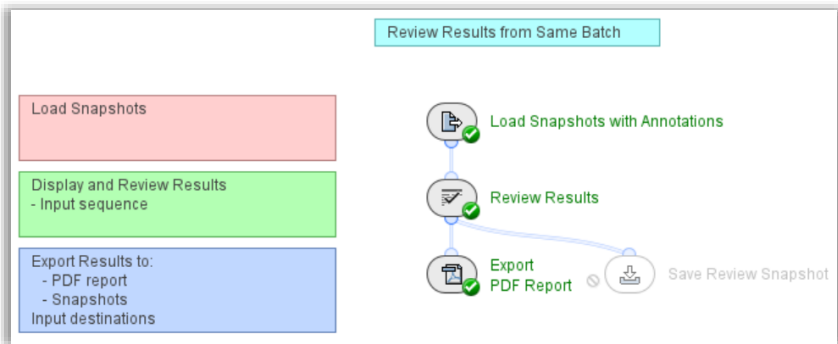
- 결과를 저장할 폴더를 선택합니다.
- 두 가지 유형의 결과가 저장됩니다.
 - **스냅샷:**
 - 스냅샷은 sbf 파일로 영구 저장된 중간 결과입니다.
 - 전처리된 데이터에서 저장된 스냅샷은 *Chromatogram Chemical Noise Subtraction* 및 *Chromatogram RT Alignment* 후에 생성된 중간 결과를 저장합니다.
 - *Review Results* 후에 저장된 스냅샷은 피쳐 주석을 포함하여 모든 중간 정보를 저장합니다.
 - **PDF 보고서(다음 항목 포함):**
 - PDF 문서
 - 디콘볼루션의 스펙트럼 정보가 포함된 Excel 파일
 - 결과를 생성하는 데 사용된 설정을 포함하는 실행된 워크플로(xml 파일)
 - xml 파일을 열려면 Biologics Explorer 워크플로 홈 페이지로 파일을 끌어 서 놓습니다.



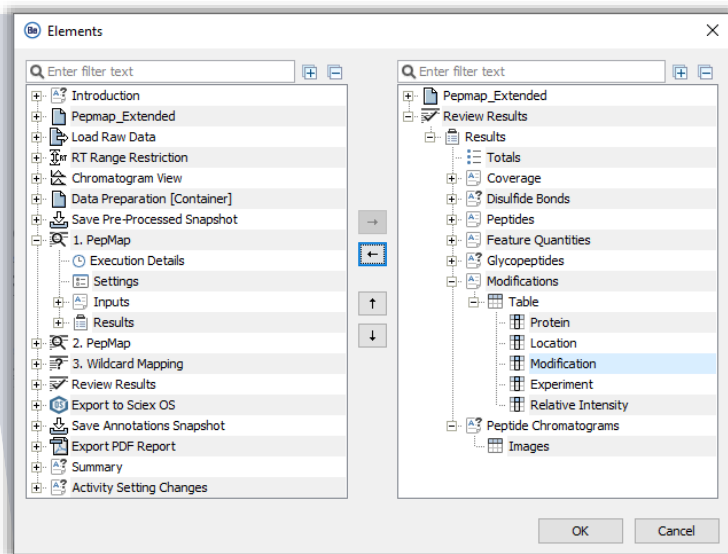
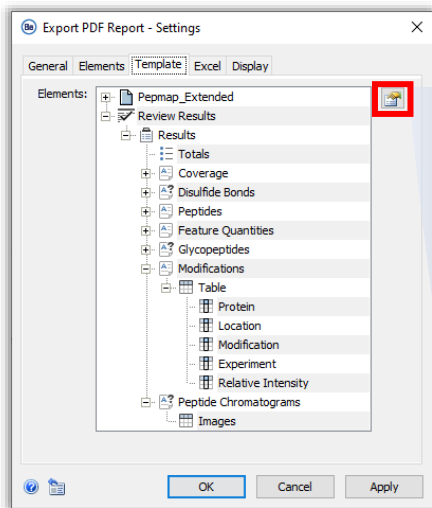
보고: 중간 결과 저장



- 워크플로 전체에서 여러 활동 노드를 수행한 후 중간 결과를 저장합니다.
 - *Save Snapshot* 활동 노드는 처리된 데이터의 필수 속성이 포함된 파일(sbf)을 생성합니다.
- 저장된 데이터를 검토하려면 Pepmap_ReviewSnapshots 워크플로의 *Load Snapshots* 활동 노드에서 sbf 파일을 엽니다.
 - *Save Annotations Snapshot*에서 스냅샷을 로드하여 동일한 데이터 세트의 결과를 검토합니다.
 - *Save Pre-processed Snapshot*에서 스냅샷을 로드하여 여러 배치의 결과를 분석합니다.
- 저장된 sbf 파일을 모든 워크플로의 *Load Raw Data* 활동 노드에 로드할 수도 있습니다.
 - *Save Annotations Snapshot*에서 스냅샷을 로드하고, 분석에 검색을 더 추가하기 위해 펩타이드 매핑에 필요한 노드를 제외한 모든 활동 노드를 건너뛵니다.

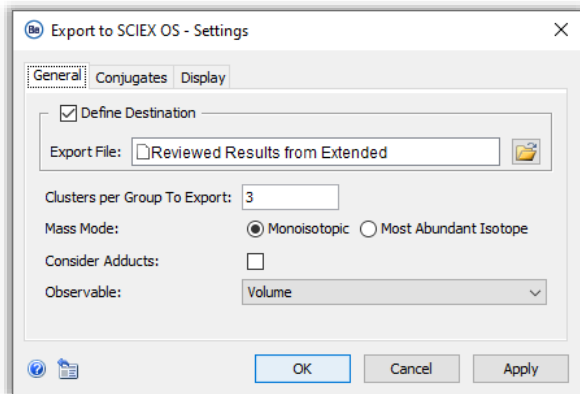
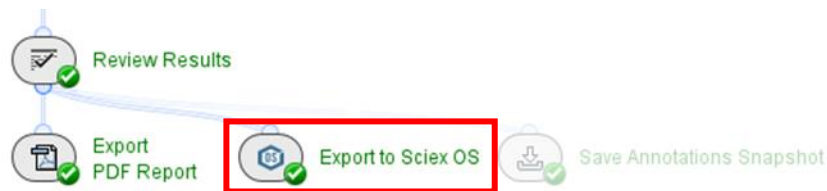


보고: *Export PDF Report*



- **General** 탭: 내보낸 보고서의 대상을 정의합니다.
- **Template** 탭: 보고서 내용을 사용자 지정합니다.
- **Excel** 탭: 보고서와 함께 내보낼 테이블을 사용자 지정합니다.

보고: *Export to SCIEX OS*



- **General 탭:**

- 검토한 결과의 대상을 정의합니다.
- 내보내기 요구 사항(예: 각 그룹에 필요한 클러스터 수)을 정의합니다.

- *Export to SCIEX OS* 활동 노드는 *Wildcard Mapping* 활동 노드와 함께 사용하면 안 됩니다.

- *Wildcard Mapping* 활동 노드는 관련 워크플로에서 건너뛴 수 있습니다.

참고: *Export to SCIEX OS* 활동 노드와 함께 내보낸 변형 위치는 단백질이 아니라 펩타이드와 관련이 있습니다. 예를 들어 DTL[M]ISR은 M255가 아니라 M4입니다.

파트 B

워크플로 및 어플리케이션

특정 펩타이드 매핑 워크플로에 대한 지침

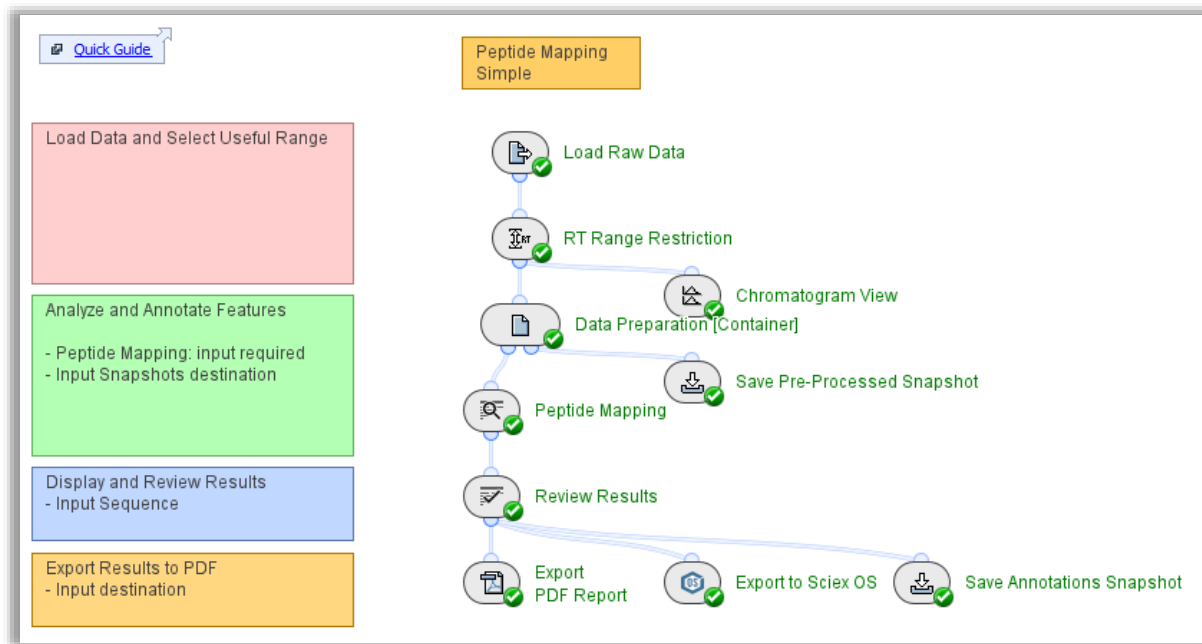


단순 펩타이드 매핑

워크플로별 지침

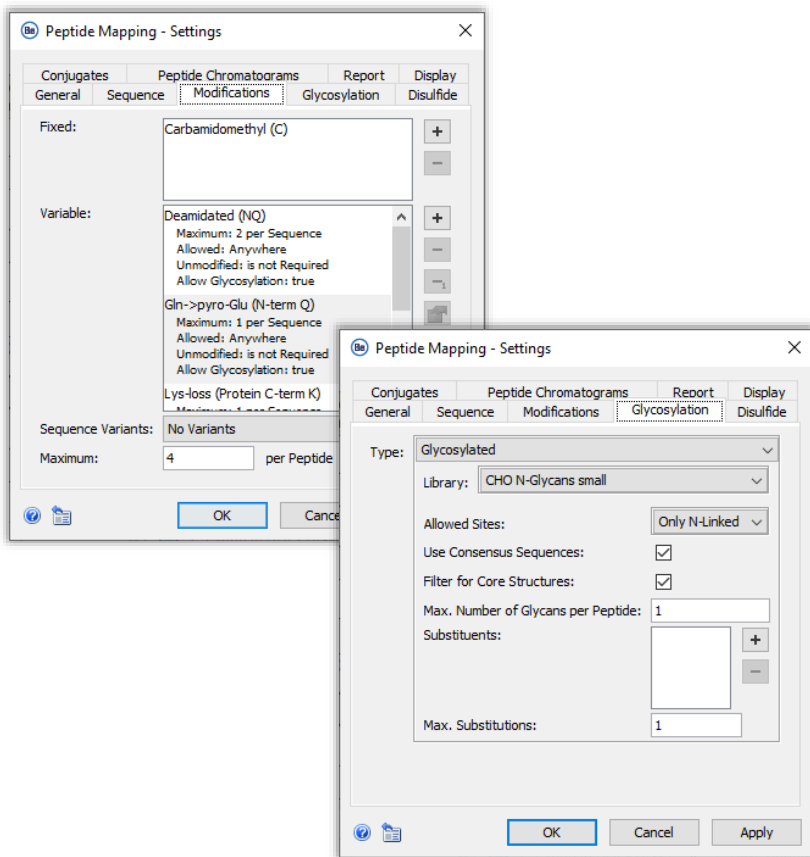


단순 펩타이드 매핑 워크플로: 설계



Pepmap_Simple

단순 펩타이드 매핑 워크플로: 개요



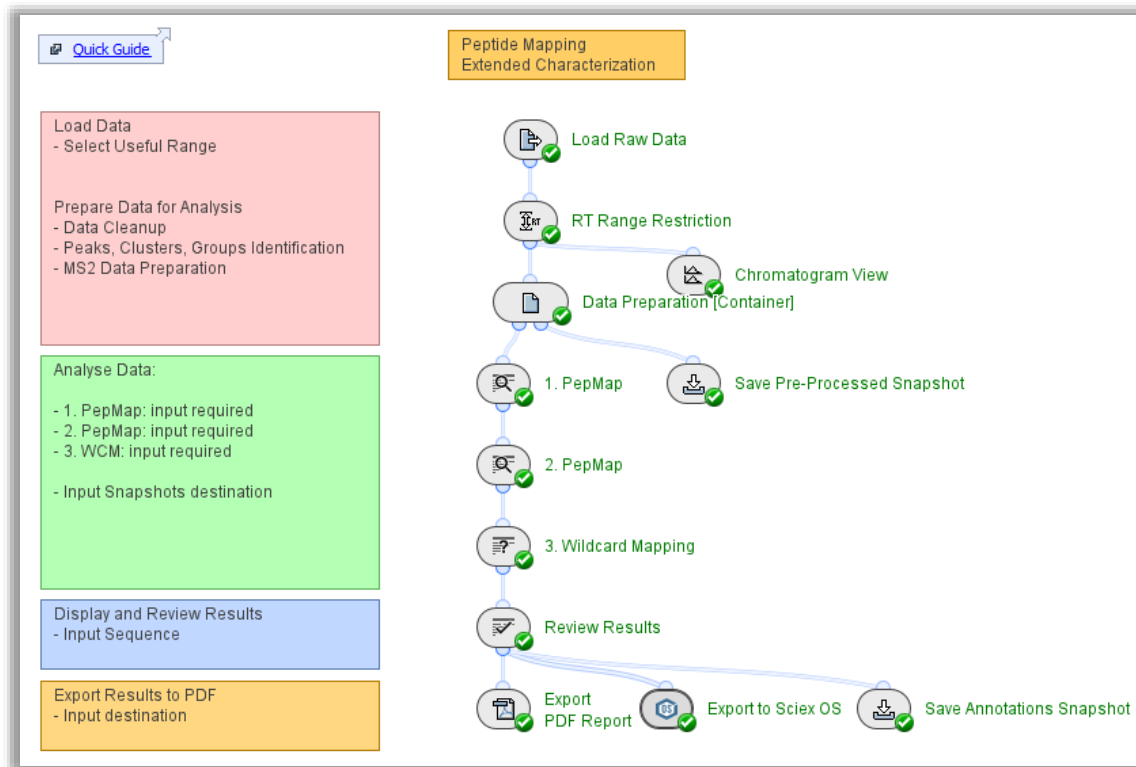
- 비복합 바이오 치료제 분자로 일상적인 분석을 완료할 때 이 워크플로를 사용합니다.
- *Peptide Mapping* 활동 노드의 검색 매개 변수 조합은 글리코실화를 포함하여 일반적으로 예상되는 펩타이드 및 변형을 식별합니다.

확장 펩타이드 매핑

워크플로별 지침

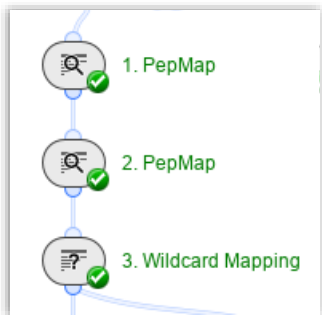


확장 펩타이드 매핑 워크플로: 설계



Pepmap_Extended

확장 펩타이드 매핑



- 포괄적인 펩타이드 매핑 분석을 위해 최대 3개의 연속 활동 노드의 결과를 결합하여 검색 공간을 확장하고 가양성을 최소화할 수 있습니다.

1. PepMap

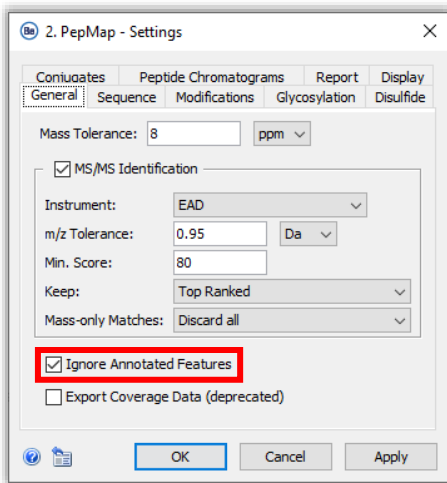
- 가장 많이 예상되는 펩타이드 및 변형을 식별합니다.

2. PepMap

- 샘플을 더 심층적으로 분석합니다.
- Ignore Annotated Features:** 이전 검색에서 주석이 없는 피처만 고려하도록 합니다.

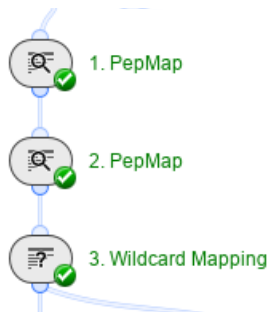
3. Wildcard Mapping

- 예기치 않은 변형을 검색합니다. 나중에 1.PepMap 또는 2.PepMap 활동 노드에 추가할 수 있습니다.



참고: 예상되는 N-글리코실화와 O-글리코실화가 포함된 바이오 치료제의 경우, 1.PepMap을 사용하여 예상 N-글리칸을 식별하고 2.PepMap은 일반적으로 덜 특정화된 O-글리칸에 초점을 맞추면 가양성이 감소합니다.

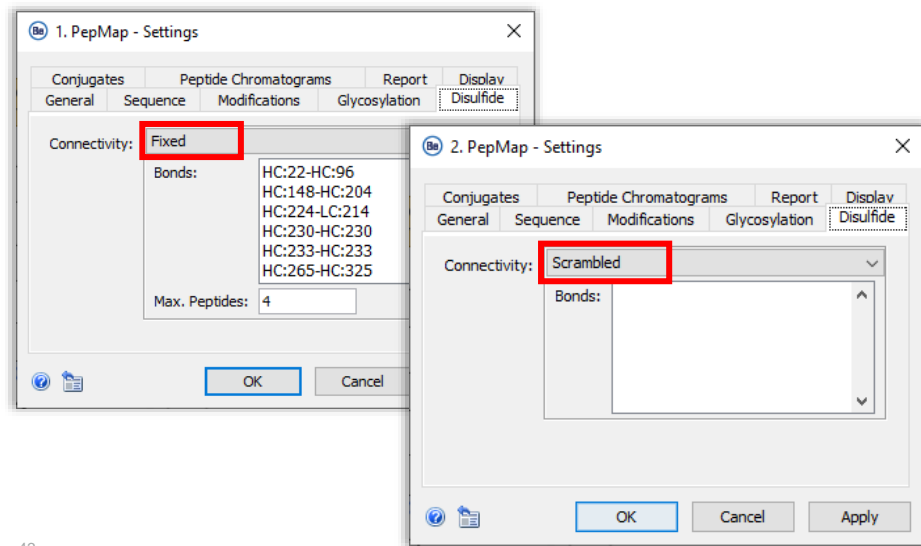
단계별 펩타이드 매핑: 어플리케이션 예



- 필요한 분석 유형에 따라 세 개의 연속 펩타이드 매핑 단계를 결합할 수 있습니다.

예 1: 비환원 샘플에 대한 DSB(이황화 결합) 분석

- 이 분석 유형에만 적용되는 주요 설정:



1. PepMap

- Sequence 탭: Enzyme - Fully specific
- Disulfide 탭: Fixed Connectivity
 - 올바른 구문(HC:22-HC:96)을 사용하여 예상 이황화 브리지를 정의합니다.

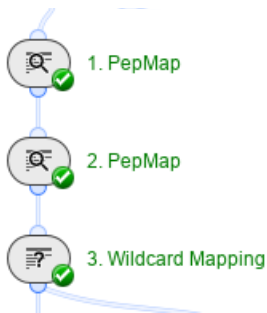
2. PepMap

- Sequence 탭: Enzyme - Fully specific
- Disulfide 탭: Scrambled Connectivity

3. Wildcard Mapping

- 대상: All Peptide Candidates(알 수 없는 변형과 관련된 추가 주석)

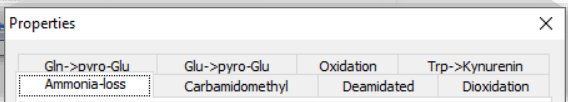
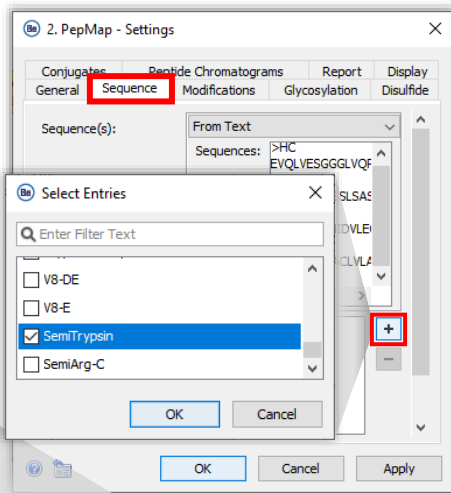
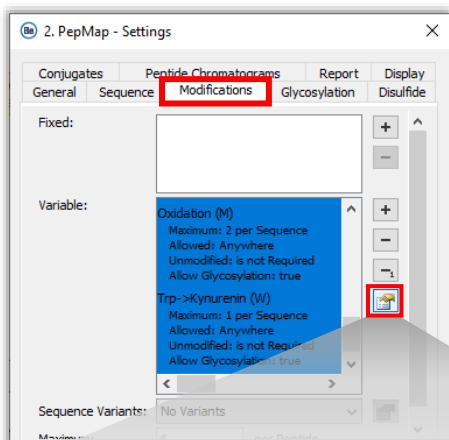
단계별 펩타이드 매핑: 어플리케이션 예



- 필요한 분석 유형에 따라 세 개의 연속 펩타이드 매핑 단계를 결합할 수 있습니다.

예 2: PTM(번역 후 변형) 분석

- 이 분석 유형에만 적용되는 주요 설정:



1. PepMap

- Sequence 탭: Enzyme - Fully specific
- Modifications 탭: 풍부하고 예상된 변형

2. PepMap

- Sequence 탭: Enzyme - Semi-Specific
- Modifications 탭: 더 짧은 예상 변형 목록

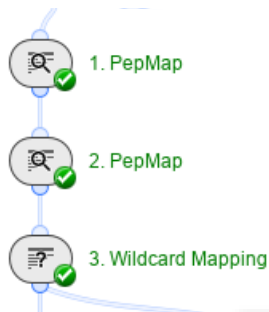
또는:

- Sequence 탭: Enzyme - Fully specific
- Modifications 탭: 낮은 존재비에서 예상할 수 있는 덜 일반적인 변형의 대체 세트

3. Wildcard Mapping

- 대상: All Peptide Candidates
(알 수 없는 변형과 관련된 주석)

단계별 펩타이드 매핑: 어플리케이션 예



- 필요한 분석 유형에 따라 세 개의 연속 펩타이드 매핑 단계를 결합할 수 있습니다.

예 3: SVA(시퀀스 변이 분석)

- 이 분석 유형에만 적용되는 주요 설정:

1. PepMap

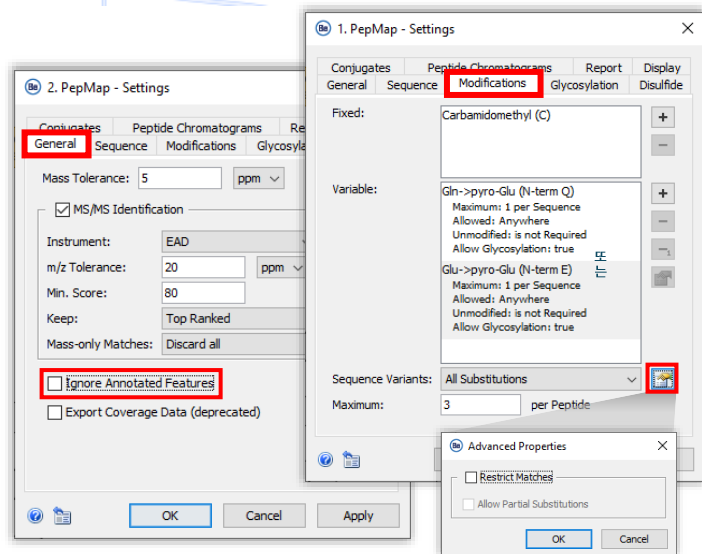
- Sequence 탭: Enzyme** - Fully specific. 분열 손실 없음
- Modifications 탭:** 고정 알킬화(cys) 및 우세한 형태(예: pyro-glutamation)로 제한된 가변 변형. **Sequence Variants - All Substituents (Restrict Matches)** 확인란 선택 취소

2. PepMap

- General 탭:** 낮은 **Mass Tolerance** 값. **Ignore Annotated Features** 확인란 선택 취소
- Sequence 탭: Enzyme** - Semi-Specific. 분열 손실 수: 1 ~2
- Modifications 탭:** 일반적으로 변형된 아미노산에 대해 과잉 알킬화를 감지하기 위한 가변 알킬화 및 기타 모든 예상된 가변 변형

3. Wildcard Mapping

- 대상: **Only Annotated Peptides**
- 가양성을 제외하기 위해 *Review Results*를 사용하여 동일한 피처에 대한 추가 주석을 비교합니다.

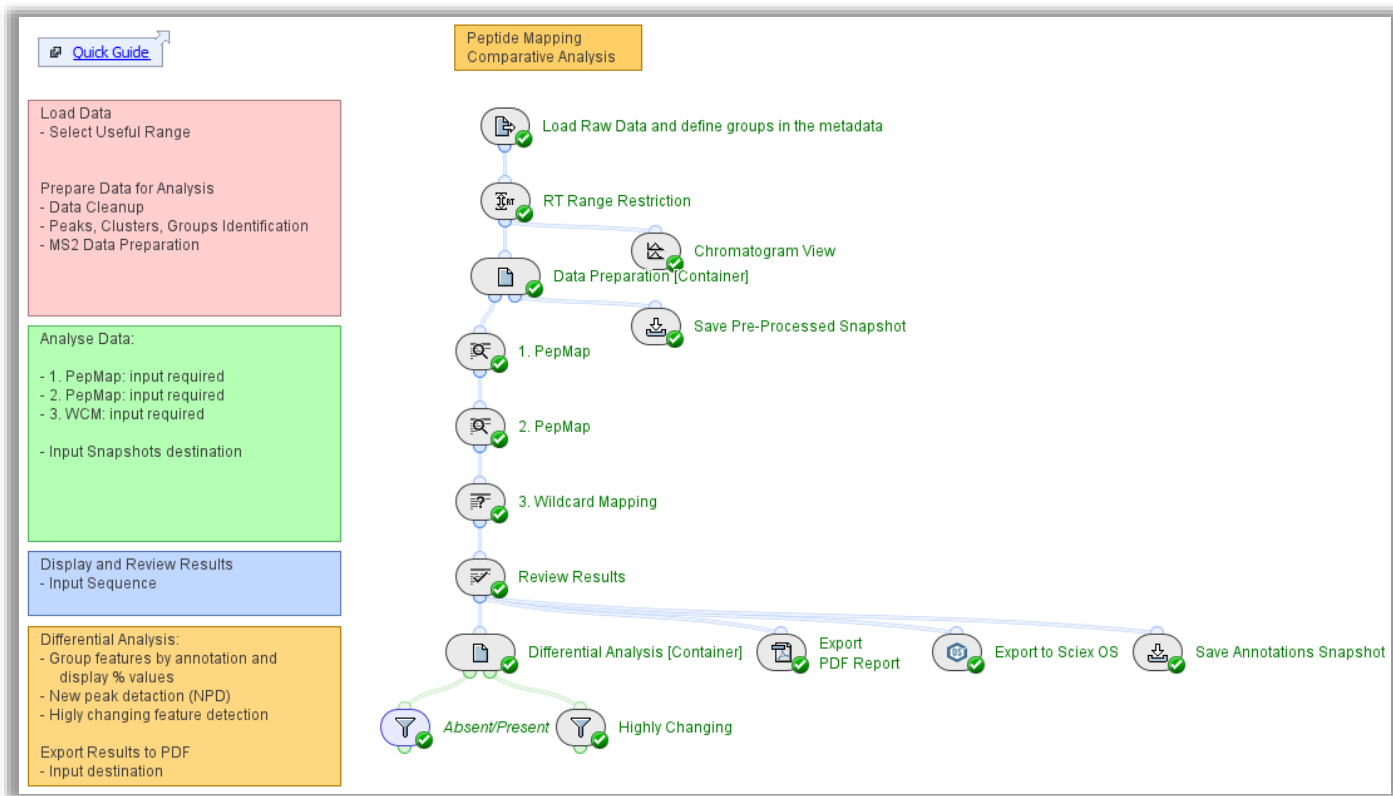


비교 펩타이드 매핑

워크플로별 지침



비교 펩타이드 매핑 워크플로: 설계



Pepmap_Comparative

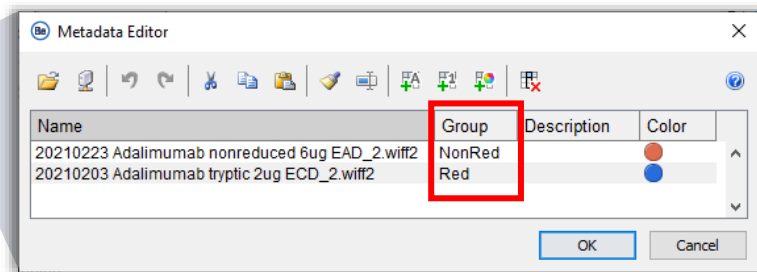
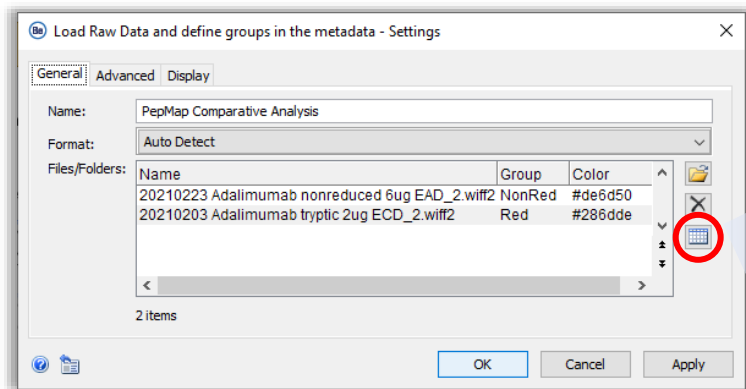
비교 펩타이드 매핑



이러한 통계 활동 노드는 워크플로에서 비교되는 두 샘플 그룹 간에 유의하게 다른 피처를 식별합니다.

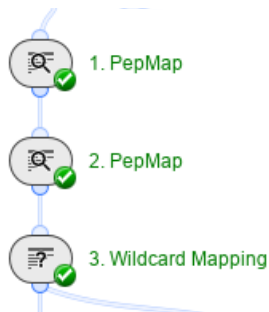
- 녹색 선으로 연결된 활동 노드에는 통계 도구가 포함되어 있습니다.
- 이러한 통계 활동 노드를 사용하여 두 데이터 세트를 비교하고 다음과 같은 펩타이드를 보고할 수 있습니다.
 - 특정 샘플 세트에는 없지만 다른 세트에 있는 펩타이드
 - 샘플 세트 간에 지정된 발현 정도 차이가 있는 펩타이드
- 사용 사례 예제:
 - 환원 샘플과 비환원 샘플 비교
 - 응력 샘플과 무응력 샘플 비교
 - 기준 샘플과 새 배치의 샘플 비교

Load Raw Data 및 그룹 정의



- **General** 탭에서 테이블 아이콘을 클릭하여 **Metadata Editor**를 엽니다.
 - 비교할 파일의 **Group** 이름을 지정합니다.
 - (선택 사항) **Color** 열을 추가하고 각 그룹의 색을 정의합니다.

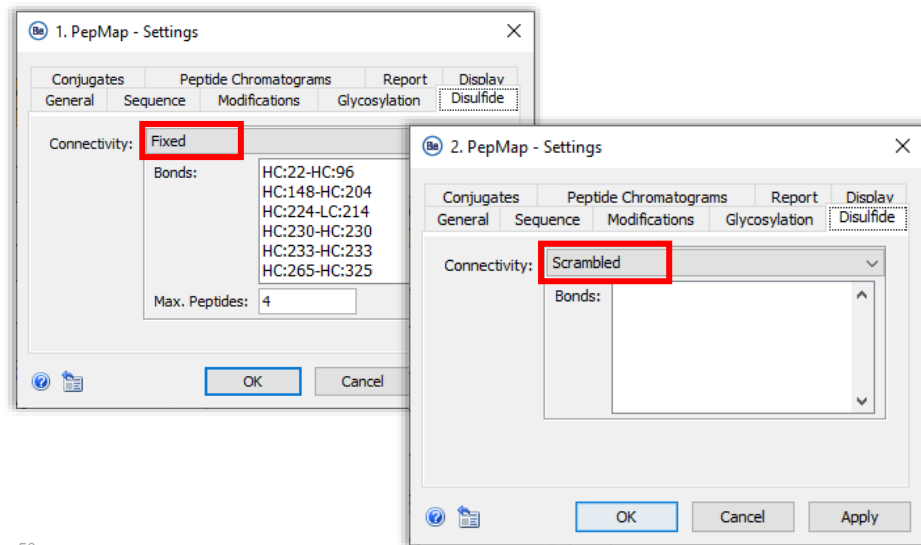
단계별 펩타이드 매핑: 어플리케이션 예



- 필요한 분석 유형에 따라 세 개의 연속 펩타이드 매핑 단계를 결합할 수 있습니다.

예 1: 환원 샘플과 비환원 샘플을 비교하기 위한 DSB 분석

- 이 분석 유형에만 적용되는 주요 설정:



1. PepMap

- Sequence** 탭: Fully specific
- Disulfide** 탭: **Fixed Connectivity**
 - 올바른 구문(HC:22-HC:96)을 사용하여 예상 이황화 브리지를 정의합니다.
- Modifications** 탭: 가변 알킬화(cys)

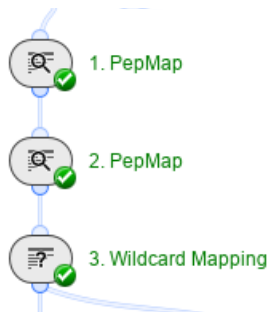
2. PepMap

- Sequence** 탭: Fully specific
- Disulfide** 탭: **Scrambled Connectivity**

3. Wildcard Mapping

- 대상: **All Peptide Candidates**
(알 수 없는 변형과 관련된 추가 주석)

단계별 펩타이드 매핑: 어플리케이션 예



- 필요한 분석 유형에 따라 세 개의 연속 펩타이드 매핑 단계를 결합할 수 있습니다.

예 2: 응력 검사 및 로트 간 변동성에 대한 비교 분석

- 이 분석 유형에만 적용되는 주요 설정:

Modification	Maximum	Allowed	Unmodified	Allow Glycosylation
Oxidation (M)	Maximum: 2 per Sequence	Allowed: Anywhere	Unmodified: is not Required	Allow Glycosylation: true
Trp->Kynurenin (W)	Maximum: 1 per Sequence	Allowed: Anywhere	Unmodified: is not Required	Allow Glycosylation: true

1. PepMap

- Sequence** 탭: Fully specific
- Modifications** 탭: 풍부하고 예상된 변형

2. PepMap

- Sequence** 탭: Unspecific 효소
- Modifications** 탭: 더 짧은 예상 변형 목록

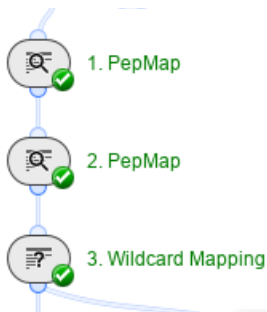
또는:

- Sequence** 탭: Fully specific
- Modifications** 탭: 낮은 존재비에서 예상할 수 있는 덜 일반적인 변형의 대체 세트

3. Wildcard Mapping

- 대상: All Peptide Candidates(추가 주석)

단계별 펩타이드 매핑: 어플리케이션 예



- 필요한 분석 유형에 따라 세 개의 연속 펩타이드 매핑 단계를 결합할 수 있습니다.

예 3: WT(야생형) 샘플과 돌연변이 샘플을 비교하기 위한 SVA

- 이 분석 유형에만 적용되는 주요 설정:

1. PepMap

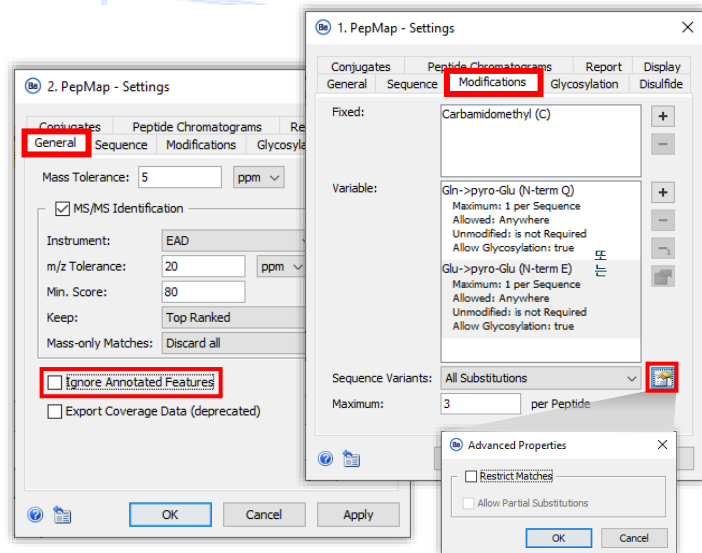
- Sequence** 탭: **Enzyme** - Fully specific. 분열 손실 없음
- Modifications** 탭: 고정 알킬화(cys) 및 우세한 형태(예: pyro-glutamation)로 제한된 가변 변형. **Sequence Variants** - **All Substituents**(Restrict Matches 확인란 선택 취소)

2. PepMap

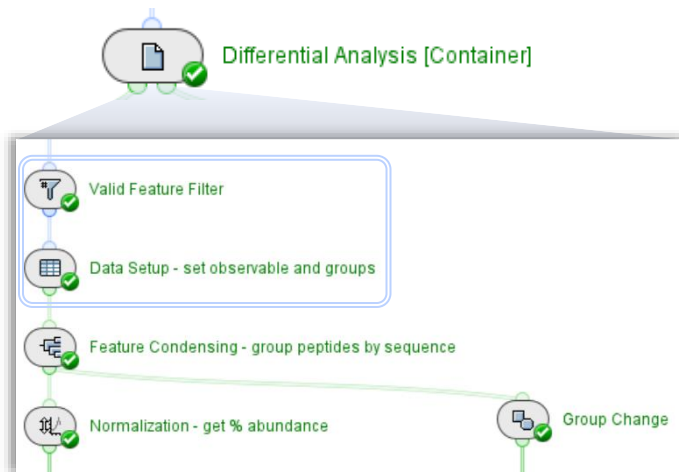
- General** 탭: 낮은 **Mass Tolerance** 값. **Ignore Annotated Features** 확인란 선택 취소
- Sequence** 탭: **Enzyme** - Semi-Specific. 분열 손실 수: 1 ~2
- Modifications** 탭: 일반적으로 변형된 아미노산에 대해 과잉 알킬화를 감지하기 위한 가변 알킬화 및 기타 모든 예상된 가변 변형

3. Wildcard Mapping

- 대상: **Only Annotated Peptides**
- 가양성을 제외하기 위해 *Review Results*를 사용하여 동일한 피처에 대한 추가 주석을 비교합니다.



Differential Analysis 활동 노드 설정



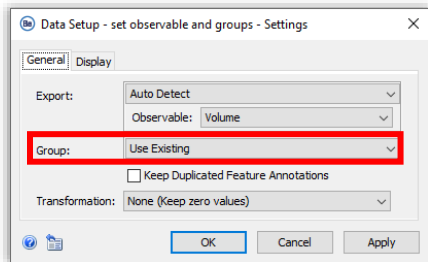
- **Group Change:** 실험 그룹 간의 상대적 차이 및 발현 정도 차이를 계산합니다.
 - 여러 실험 그룹이 있는 경우 보고된 변화는 두 그룹 간의 최대 차이입니다.

- **Valid Feature Filter:** 설정된 임계값 미만의 피처와 설정된 % 또는 실험 횟수 미만의 피처를 제거합니다.
 - 이 필터링은 유의하지 않은 차이 또는 노이즈나 아티팩트로 인한 신호를 제거합니다. 필요한 펩타이드가 없으면 이 설정을 최적화합니다.
- **Data Setup:** 필터링 및 통계 작업의 입력으로 사용할 수 있는 행렬 형식의 데이터를 준비합니다.
 - *Load Raw Data*에서 그룹을 설정하지 않은 경우 여기서 정의할 수 있습니다.

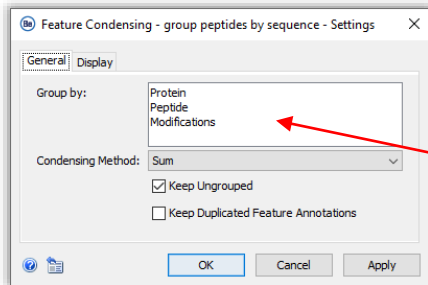
- **Feature Condensing:** 주석을 기반으로 피처를 그룹화합니다.
 - 생성된 각 그룹에 대해 단일 강도 값을 계산합니다.
- **Normalization:** 추가 통계 분석을 위해 비교 가능한 기준을 제공합니다.
 - **Percent Abundance:** 각 실험에서 각 그룹의 모든 구성원에 대해 값이 합산됩니다. 각 값을 해당 그룹의 합으로 나누고 100을 곱합니다.

참고: 설정은 이전 활동 노드에 연결됩니다. *Feature Condensing*을 편집하기 전에 *Data Setup*을 실행하십시오.

Differential Analysis: 데이터 준비

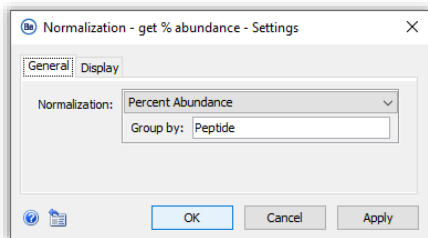


- 메타데이터 테이블을 편집하여 *Load Raw Data* 활동 노드에서 그룹을 정의합니다(기본 옵션).
- 필요한 경우 **Group: Manually**를 사용하고 각 샘플을 그룹에 할당하여 *Data Setup* 활동 노드에서 그룹을 정의합니다.



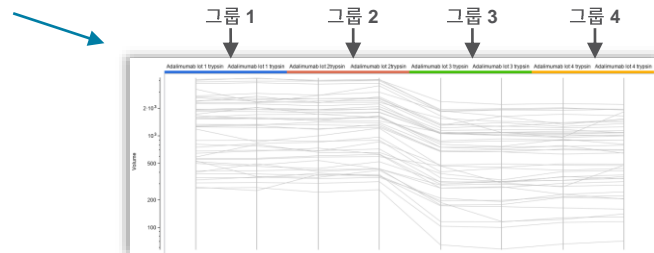
- **Feature Condensing:** 기존 주석을 기반으로 피처를 결합하고 각 그룹에 대해 단일 강도 값(합, 평균, 중앙값 또는 최대값)을 계산합니다. 예를 들어 동일한 단백질에서 동일한 변형이 적용된 동일한 펩타이드가 이러한 설정을 사용하여 합산됩니다.

- **Feature Condensing** 설정을 편집하기 전에 *Data Setup* 활동 노드를 실행합니다.

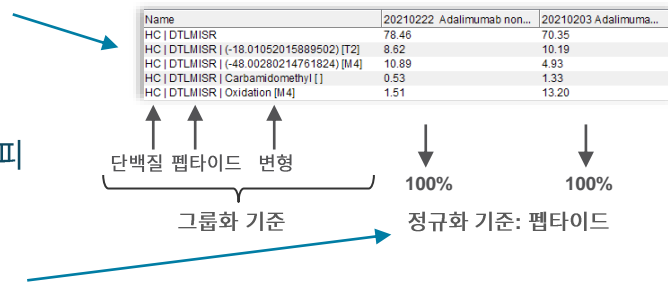


- **Normalization:** 선택한 주석 유형을 기준으로 축약된 피처의 **Percent Abundance**를 보고합니다. 예를 들어 **Group by**가 **Peptide**로 설정되면 펩타이드당 존재비가 계산됩니다. **Group by**가 비어 있으면 전체 샘플에 대해 존재비가 계산됩니다.

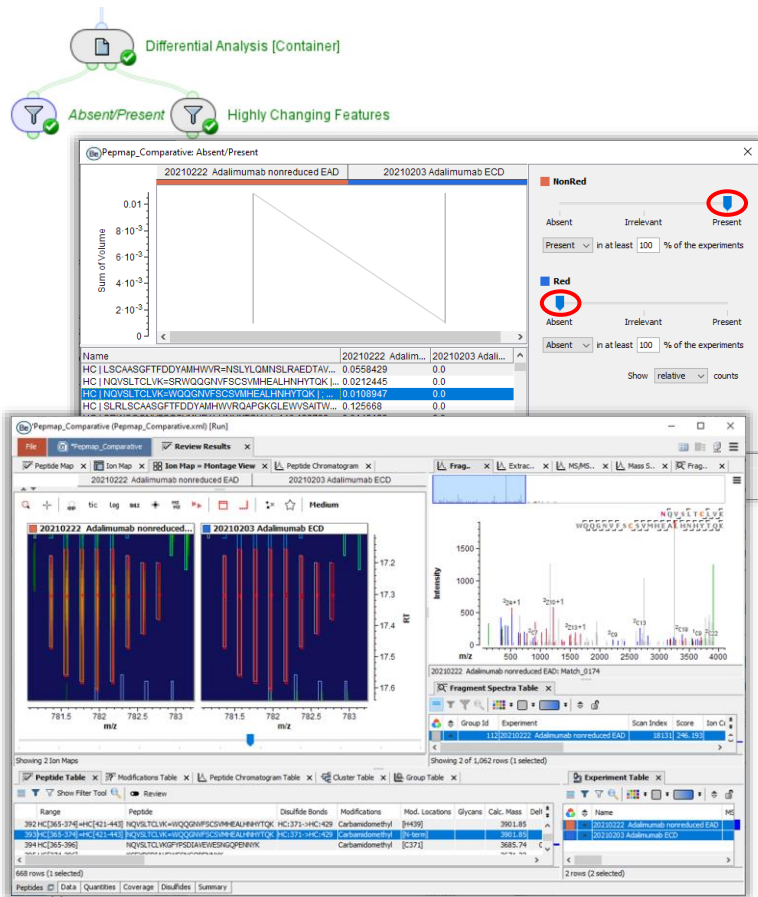
로트 간 비교동등성



DSB 분석



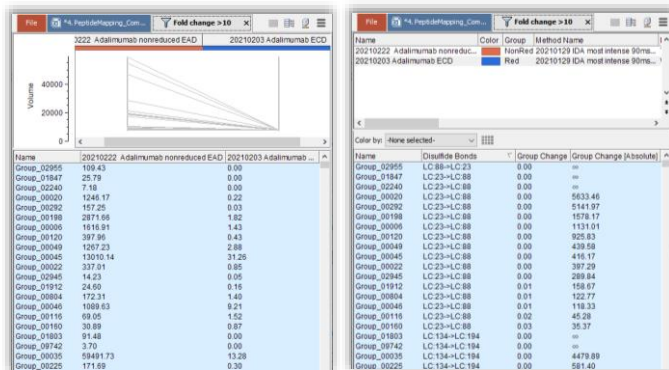
새로운 피처 및 크게 변하는 피처 감지



- **Absent/Present** 활동 노드는 NPD(New Peak Detection)를 지원합니다.

- 활동 노드가 실행될 때 열리는 입력 창에 슬라이더가 적용됩니다.
- 슬라이더를 이동하면 결과가 필터링됩니다. 예를 들어 DSB 분석의 경우 원하는 피처가 환원 샘플에는 없고 비환원 샘플에는 있는 것으로 예상됩니다.

- **Highly Changing Features**의 경우 활동 노드 설정에서 원하는 최소 발현 정도 차이를 설정해야 합니다.



간소한 데이터 검토를 위해 선택 동기화

The screenshot displays the SCIEX software interface for peptide mapping. The workflow consists of three main steps: **Absent/Present**, **Highly Changing**, and **Review Results**. The **Review Results** window is the central focus, showing a **Peptide Map** with a **Synchronize selection** button circled in red. Below the map is a **Modifications Table** listing various modifications such as Carbamidomethylation and Oxidation. To the right, a **Peak Table** displays the results of the search, including peak names, clusters, groups, and intensities. The interface also includes a **Peptide Table** at the bottom, which provides detailed information about the identified peptides, such as their sequence, disulfide bonds, and modifications.

세 개의 창을 모두 열고 동적 연결을 위해 *Review Results*에서 **Synchronize selection**을 활성화합니다.

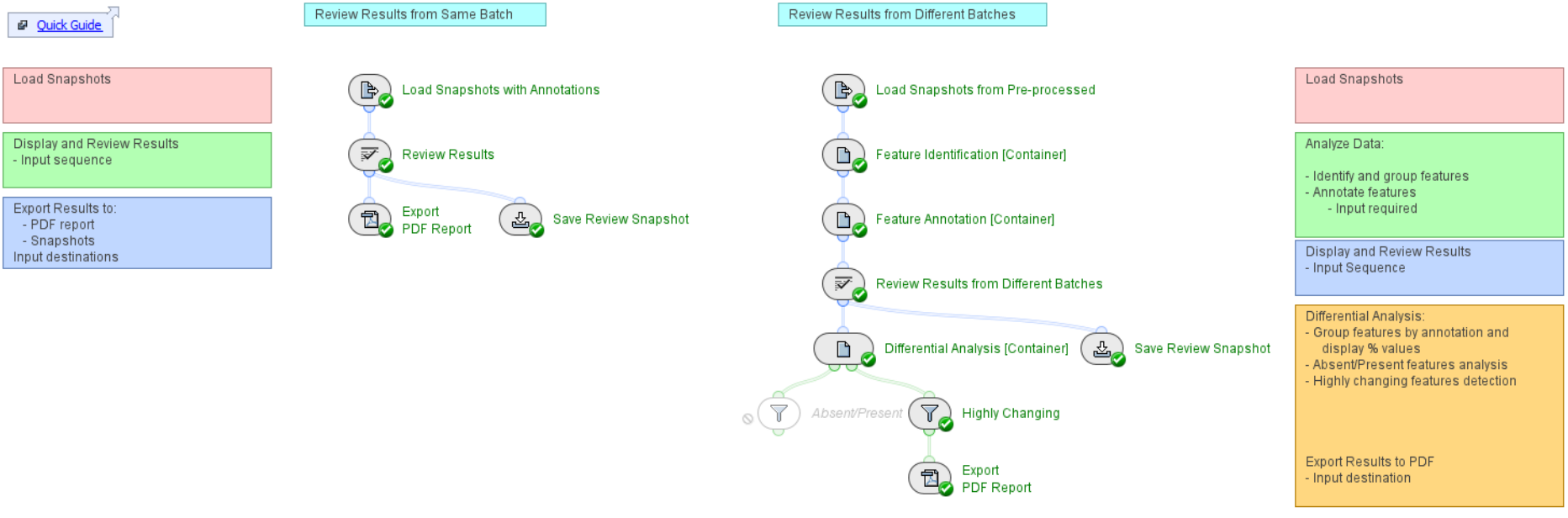


저장된 결과 검토

워크플로별 지침



펩타이드 매핑 스냅샷 검토 워크플로: 설계

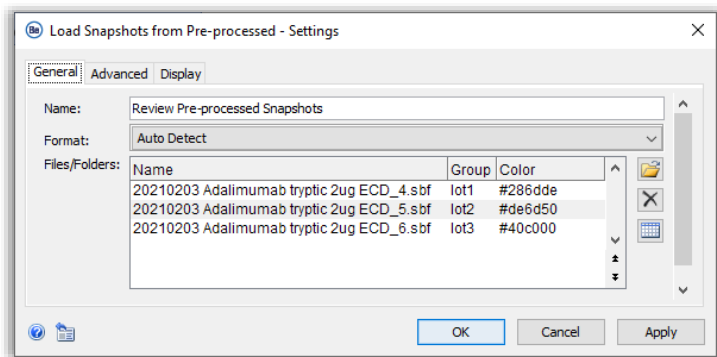


Pepmap_ReviewSnapshots

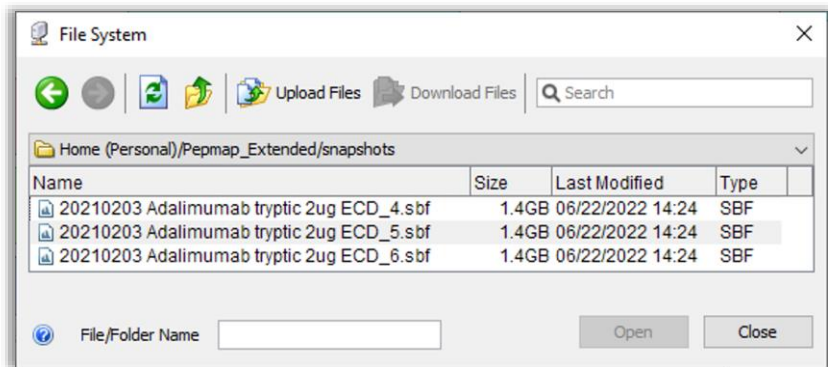


The Power of Precision

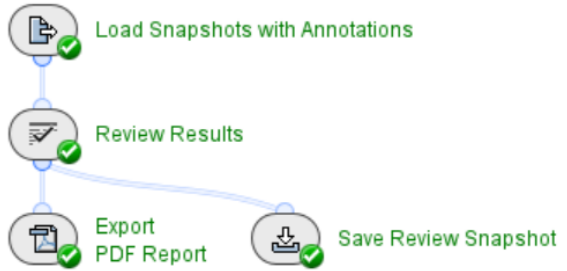
동일한 배치의 결과 검토



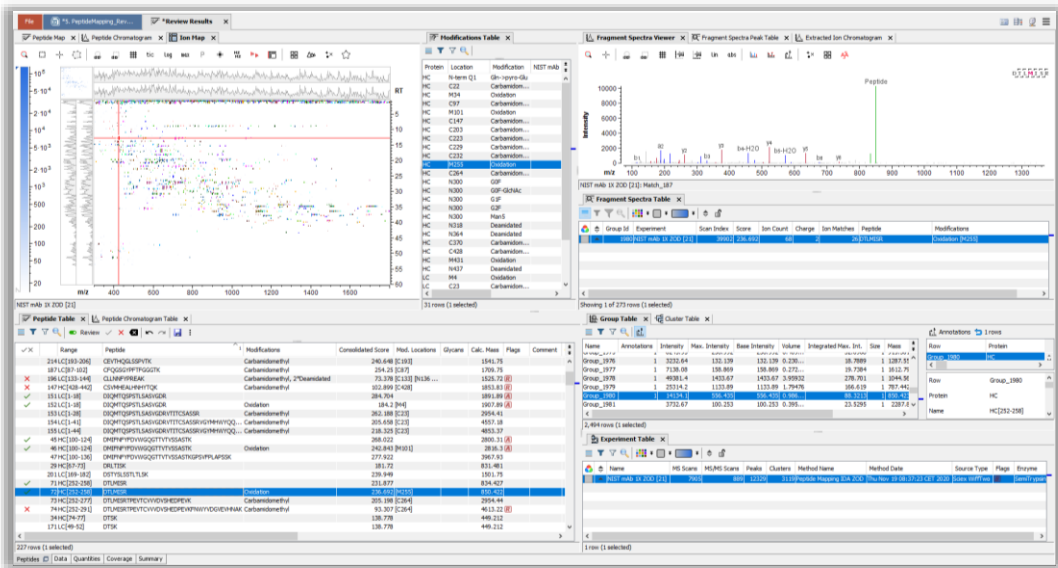
- 다른 펩타이드 매핑 워크플로에서 여러 샘플을 분석할 때 각 샘플은 자체 sbf 파일을 생성합니다.
- 저장된 스냅샷을 Pepmap_ReviewSnapshots 워크플로에 로드할 때 상위 폴더 내의 개별 sbf 파일을 모두 선택합니다.
 - 상위 폴더를 선택하면 데이터가 로드되지 않습니다.



동일한 배치의 결과 검토



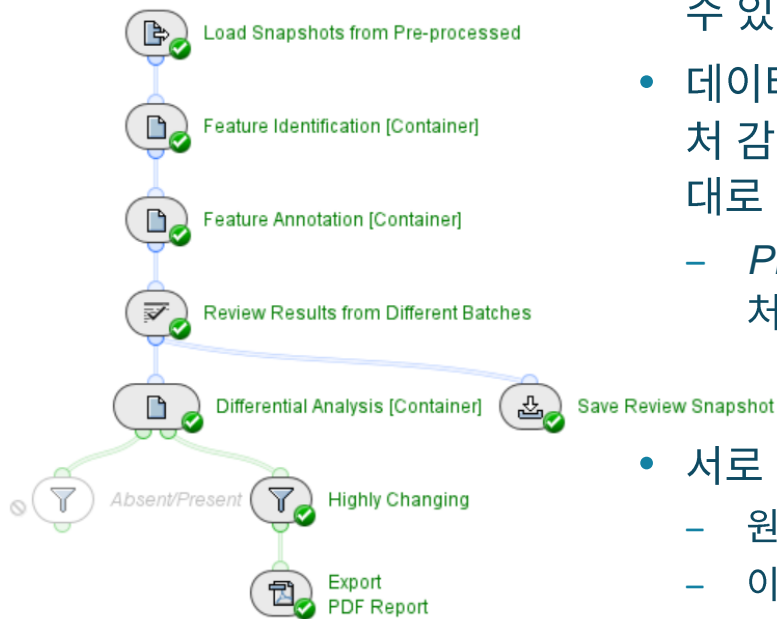
- 이 워크플로를 사용하여 이전에 함께 분석되었으며 펩타이드 주석이 있는 샘플의 이전 결과를 검토합니다.



- Review Results* 활동 노드는 이전에 수락 및 거부된 펩타이드(Flags 열에 관련 내용이 입력됨)를 포함하여 이전 분석의 복사본을 엽니다.
- 그런 다음 추가 검토가 가능하며 필요한 경우 검토한 스냅샷을 저장할 수 있습니다.



다른 배치의 결과 검토



- 여러 분석의 데이터를 개별적으로 전처리한 후 스냅샷을 결합할 수 있습니다.
- 데이터에는 *RT Alignment* 및 공통 *Peak Detection*을 포함한 피쳐 감지와 피쳐 주석을 위한 *Peptide Mapping* 활동 노드가 순서대로 필요합니다.
 - *Pre-processed Snapshot*을 사용하여 동일한 배치의 데이터를 처리하는 경우 *RT Alignment* 활동 노드를 건너뛴니다.
- 서로 다른 샘플 그룹 간의 비교도 가능합니다.
 - 원래 워크플로에 정의된 그룹은 유지됩니다.
 - 이전에 정의하지 않은 경우 *Load Snapshots* 또는 *Data Setup* 활동 노드 내에서 그룹을 정의할 수 있습니다.



The Power of Precision

자세한 내용은 SCIEX 웹 사이트
(sciex.com)를 참조하거나, 다음 방
법 중 하나를 사용하여 당사로 문의하
십시오.

sciex.com/contact-us
sciex.com/request-support



상표/라이선스

SCIEX 임상 진단 포트폴리오는 체외 진단용입니다. 의사 처방에 의해서만 사용 가능합니다. 일부 국가에서는 제품을 사용할 수 없습니다. 사용 가능 여부는 현지 영업 담당자에게 문의하거나 <https://sciex.com/diagnostics> 페이지를 참조하십시오. 다른 모든 제품은 연구 목적으로만 사용됩니다. 진단 절차에 사용하지 마십시오.

관련 로고를 포함하여 여기에 언급된 상표 및/또는 등록 상표는 미국 및/또는 기타 특정 국가에서 AB Sciex Pte. Ltd. 또는 해당 소유자의 자산입니다(sciex.com/trademarks 참조).

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-IDV-05-13063-KR-C