



肽图分析

Biologics Explorer 2.0 快速指南

由 Genedata Expressionist® 提供技术支持



肽图分析：Biologics Explorer 快速指南

本指南包含的内容

A 部分：软件和工作流程

- 1) 应用概述
- 2) Biologics Explorer 使用方法
- 3) 肽图分析工作流程的一般指南

B 部分：特定工作流程和应用

- 1) 特定肽图分析工作流程的指南：
 - Pepmap_Simple
 - Pepmap_Extended
 - Pepmap_Comparative
 - Pepmap_ReviewSnapshots

A 部分

软件和工作流程

1. 应用概述



肽图分析工作流程的应用概述

- 这些工作流程主要设计用于在酶的作用下消化的生物治疗分子的肽图分析：
 - 序列覆盖范围和确认
 - 糖肽分析
 - 转译后修饰 (PTM) 分析
 - 目标 PTM 特征分析
 - 二硫键 (DSB) 分析
 - 共轭分析
 - 序列变异分析 (SVA)
- 可以对相同分子的重复样本进行批量分析：
 - 深度表征
 - 比较多个样本：过程开发、仪器方法开发
 - 压力测试
 - 比较已还原样本与非还原样本

A 部分

软件和工作流程

2. BIOLOGICS EXPLORER 使用方法



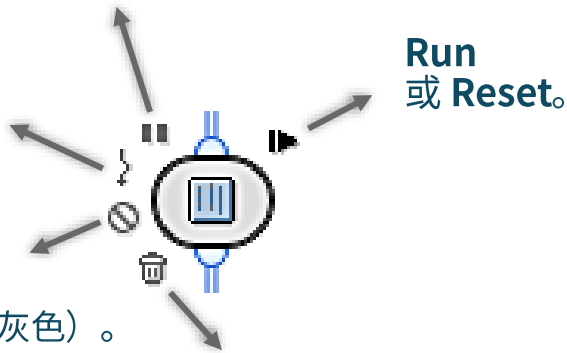
Biologics Explorer 使用方法

活动节点图标

Pause: 暂停此处的工作流程。
所有后续任务会保持活动状态。

Bypass: 运行该工作流程
时跳过此任务。

Block: 停止该工作流程。
该任务和所有后续任务将变得不可用（灰色）。



Trash: 不保存中间数据。
激活此图标后，将无法查看此特定活动节点的结果。
使用 Trash 图标有助于节省内存。此功能可在优化工作流设置后使用。

Biologics Explorer 使用方法

工作流程图标

工作流程已完成

所有活动节点都已成功完成。

工作流程已暂停

有些活动节点已成功完成，但有些还尚未开始。

工作流程已就绪

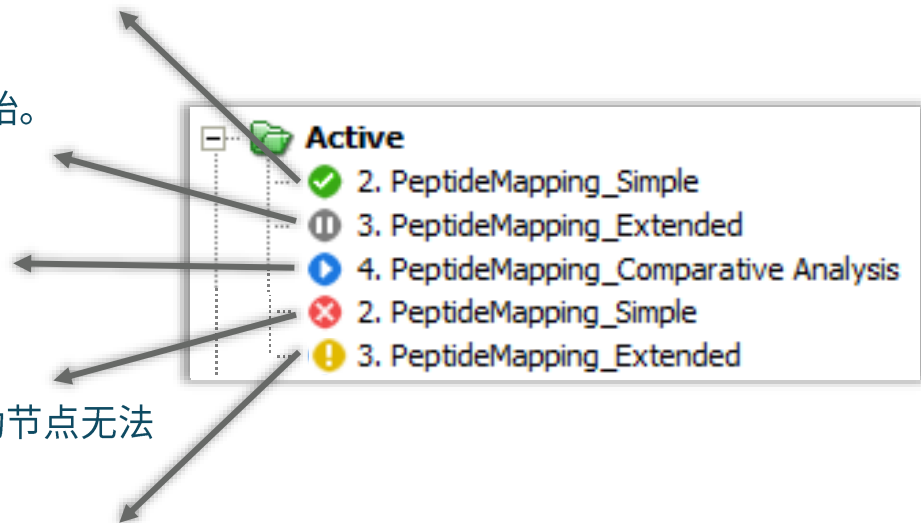
尚未完成任何活动节点。该工作流程已准备就绪。

工作流程错误

某些活动节点已成功完成，但至少还有一个活动节点无法运行。

工作流程警告

某些活动节点未完成。

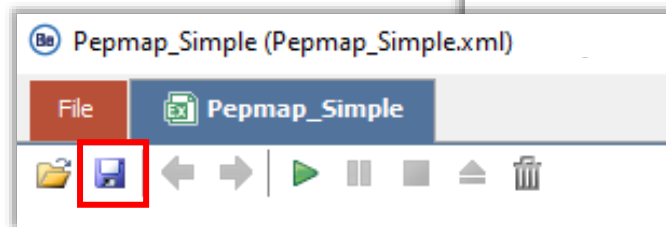
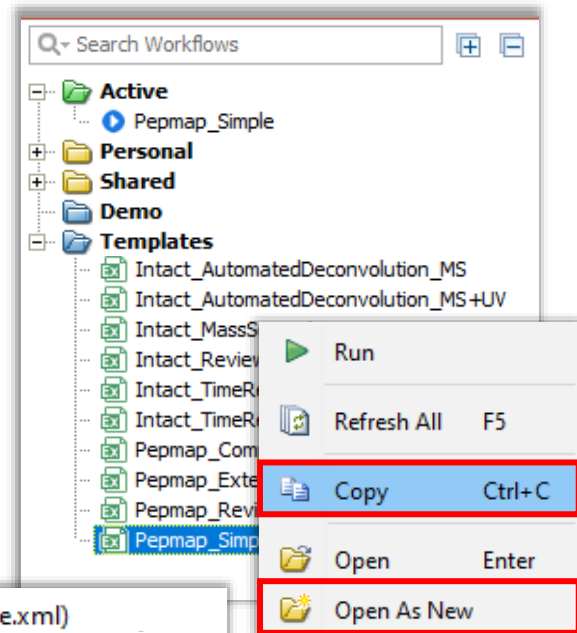


Biologics Explorer 使用方法：一般概述

启动和保存工作流程

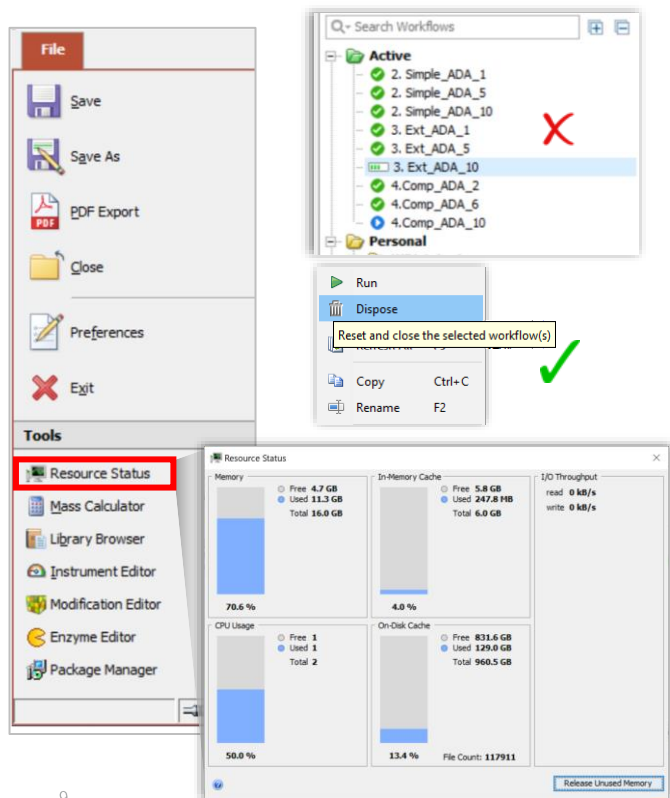
要打开工作流程，请执行以下任意一种操作：

- 从 **Templates** 文件夹中复制所需的工作流程。
 1. 右键单击该工作流程，然后选择 **Copy**。
 2. 右键单击 **Personal** 文件夹，然后选择 **Paste**。
- 双击打开 **Templates** 文件夹中的工作流程，然后使用 **Save** 图标将其保存至 **Personal** 文件夹中。
- 单击右键以打开 **Templates** 文件夹中的工作流程，然后选择 **Open As New**。使用 **Save** 图标将其保存至 **Personal** 文件夹中。



Biologics Explorer 使用方法：一般概述

正确使用相关资源的建议

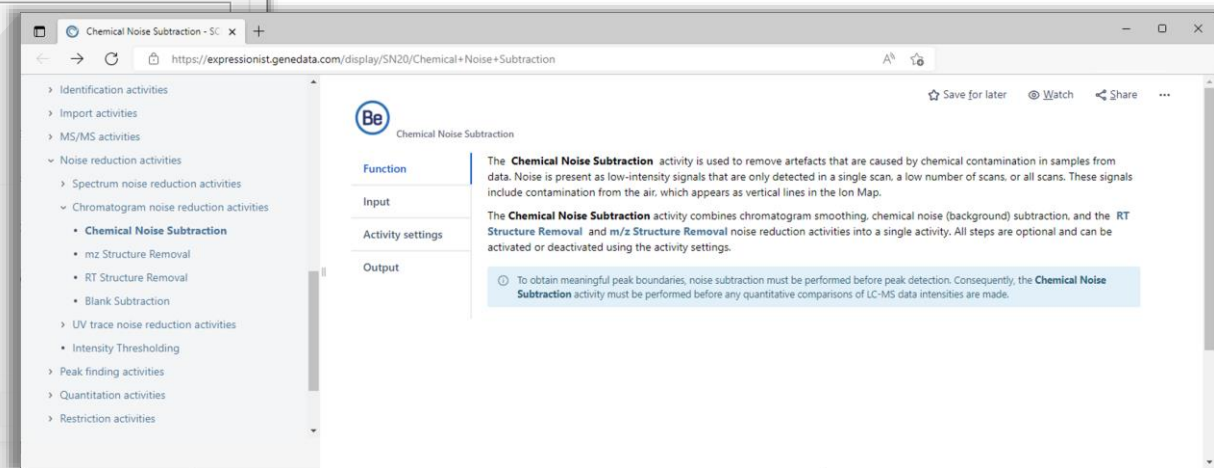
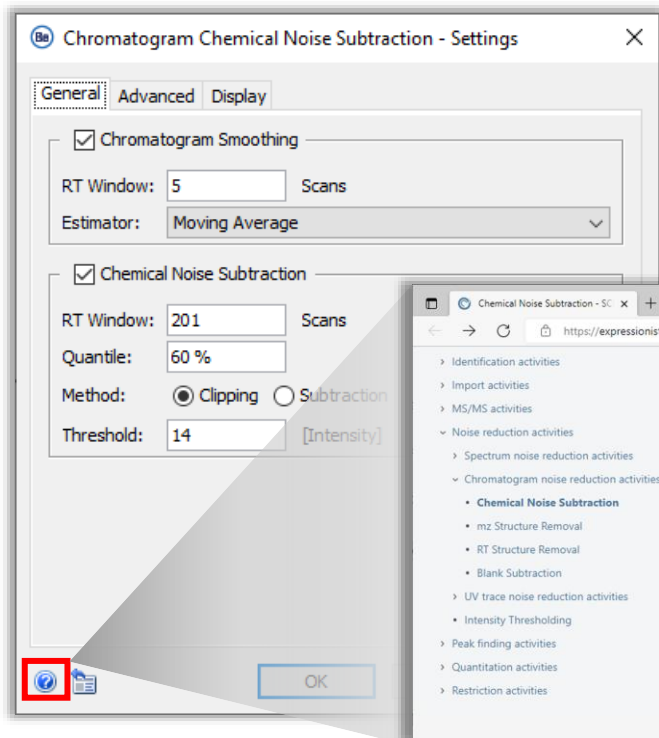


- 遵循最佳实践，以确保 Biologics Explorer 拥有足够的内存和计算能力：
 - 一次仅运行一个工作流程：有些活动节点非常耗费资源。协同处理可能会用尽所有可用资源。
 - 为节省内存，请尽量激活已优化的工作流程中的 Trash 图标。
 - 审核数据并保存结果后，在启动新分析之前重置或弃置工作流程。
 - 使用 *Save Snapshot* 活动节点，以在 Pepmap_ReviewSnapshots 工作流程中保存或审核已完成的结果。
- 处理计算机至少应拥有 250 GB 的可用磁盘空间和 6 GB 的内存缓存。
 - 为肽图分析工作流程处理的文件加起来不应超过 4 GB。

Biologics Explorer 使用方法：一般概述

查看在线帮助

- 有关单个活动节点及其设置的信息，请单击 ? 图标查看相关的帮助页面。



A 部分

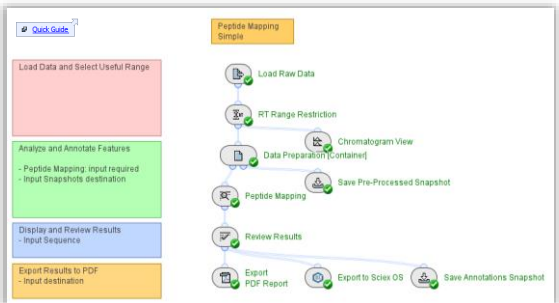
软件和工作流程

3. 肽图分析工作流程的一般指南

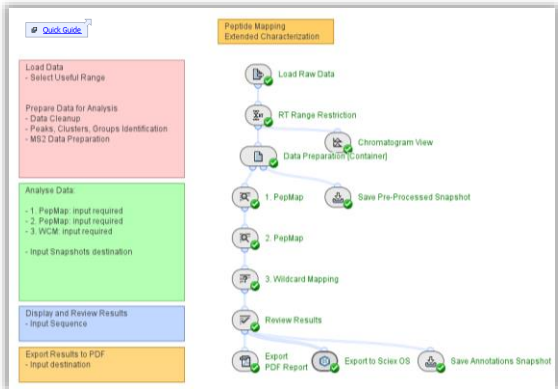


肽图分析工作流程的一般指南

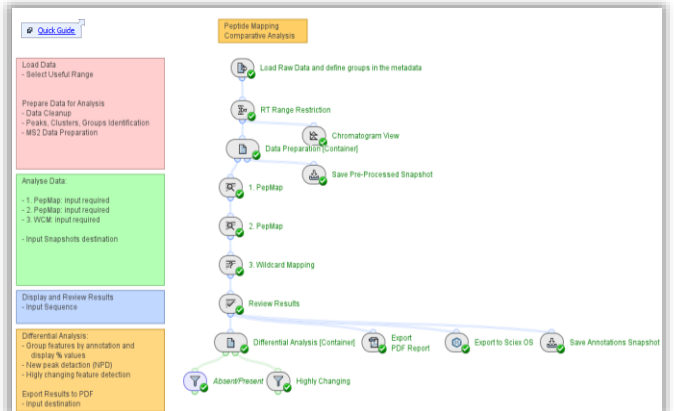
工作流程类型



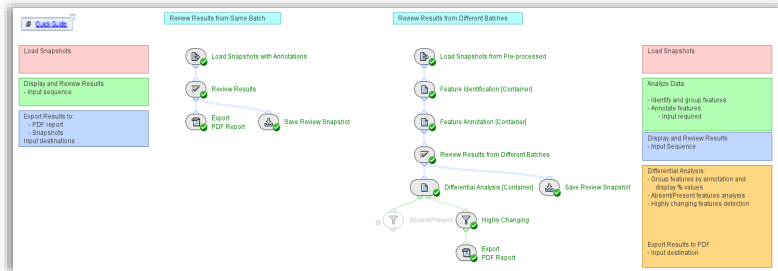
Pepmap_Simple



Pepmap_Extended



Pepmap_Comparative



Pepmap_ReviewSnapshots

肽图分析工作流程的一般指南

肽图分析工作流程中的常见活动节点

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*

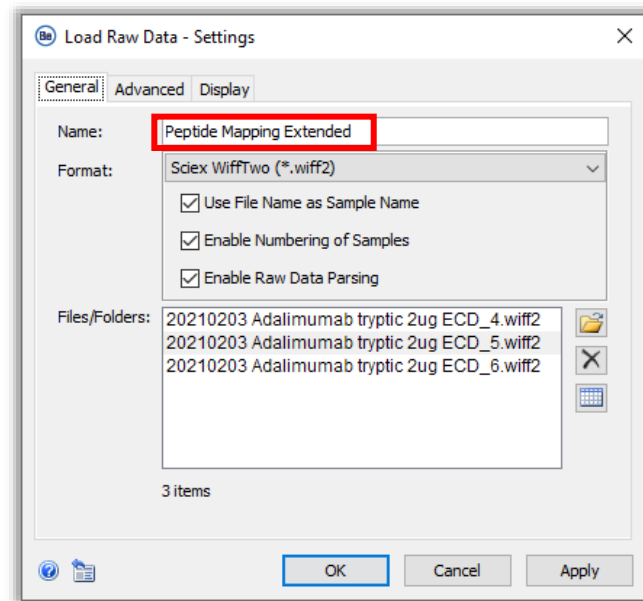
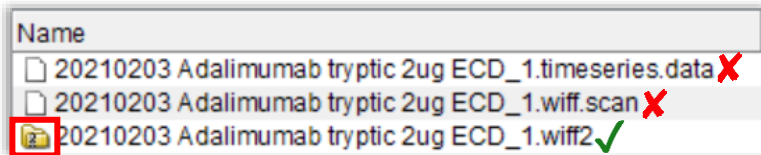
F. *Review Results*

G. 报告和导出

Load Raw Data: 添加分析名称和数据文件

General 选项卡。

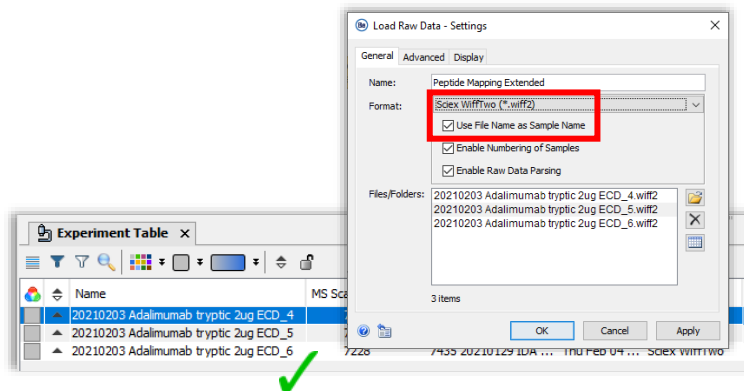
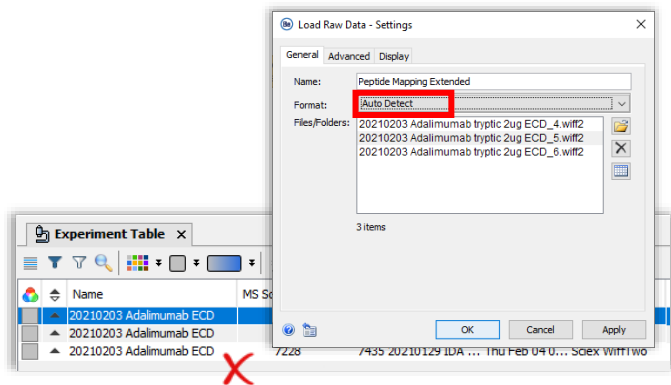
- 填写 **Name** 字段以定义分析。
- 上传原始数据文件 :
 - 仅选择 wiff 或 wiff2 容器文件。
 - 分析来自 ZenoTOF 7600 系统的数据时，仅使用 wiff2 文件，而不使用 wiff 文件。
 - 不要选择与之同名的辅助文件。



- 要查看 wiff1 或 wiff2 容器中的文件，请双击 wiff 或 wiff2 容器将其打开。
 - 从嵌入文件的列表中选择要上传的文件。

Load Raw Data: 格式

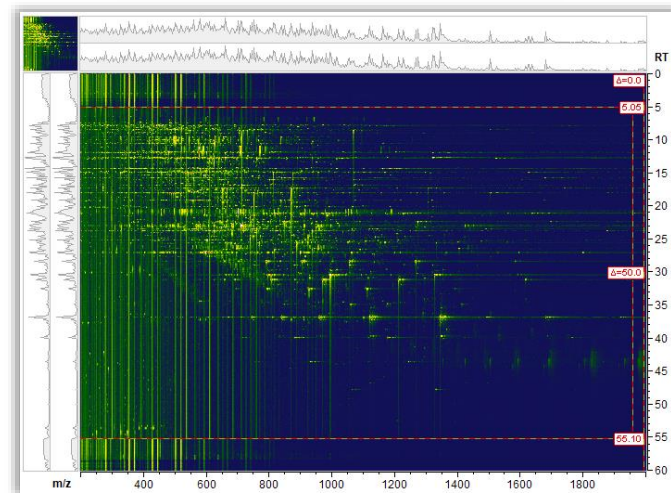
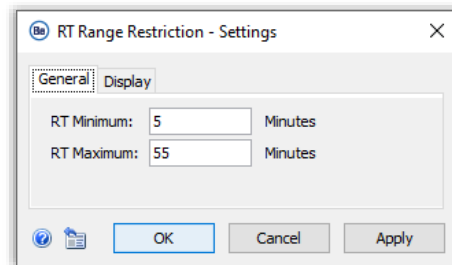
- 如果 wiff 或 wiff2 容器中的单个样本文件具有相同名称，则不要使用 **Auto Detect** 选项。
- 要确保 *Experiment Table* 中出现的样本名称是唯一的，并且 *Review Results* 显示每个样本的正确定量信息，请执行以下操作：
 1. 从 **Format** 下拉列表中选择 **Sciex Wiff** 或 **Sciex WiffTwo**.
 - 对于使用 ZenoTOF 7600 系统采集的数据，仅使用 wiff2。
 2. 选中 **Use File Name as Sample Name** 复选框。



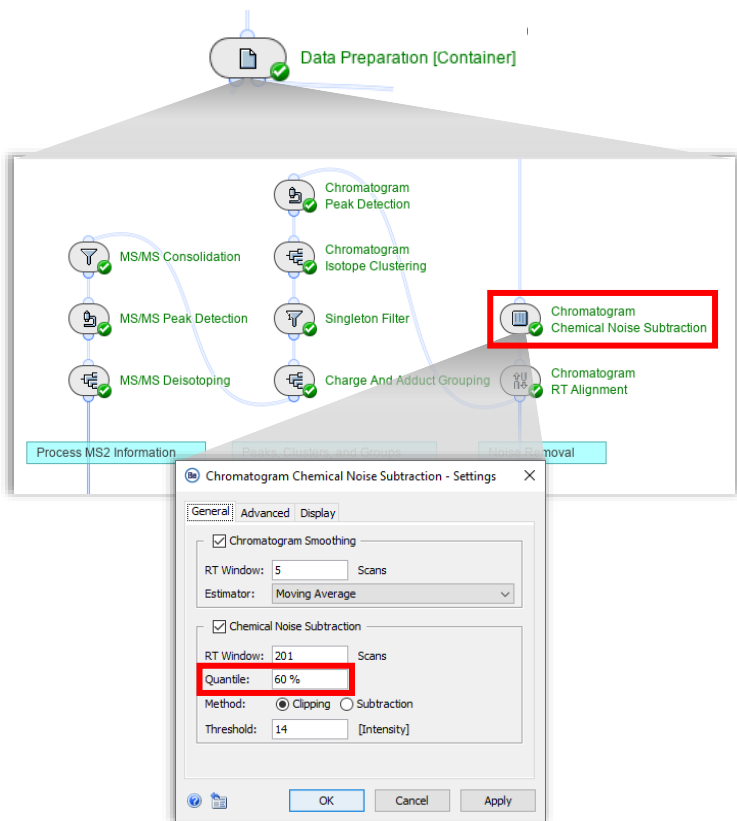
限制 RT 范围

- 运行 *Load Raw Data* 活动节点，然后在数据完成加载后将其打开（双击）。
- 确定包含有用数据的保留时间 (RT) 范围。
 - 排除因切换阀门或清洗色谱柱导致的杂散信号。
 - 重点关注分离范围。

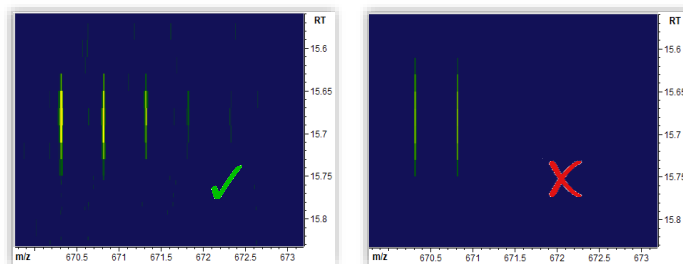
注：如果这些字段为空，将使用完整的 RT 范围。



Data Preparation: 化学噪声减除 - 分位数



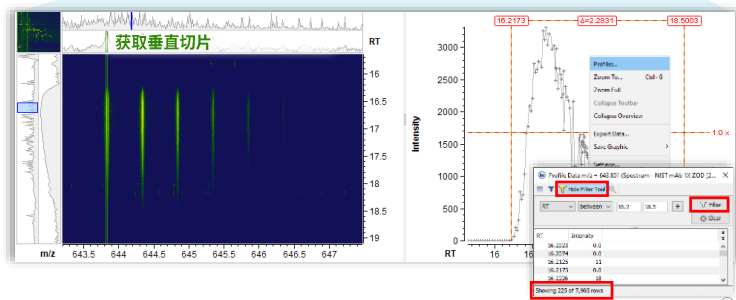
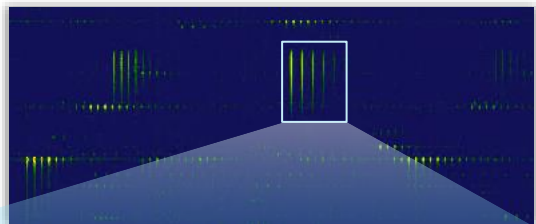
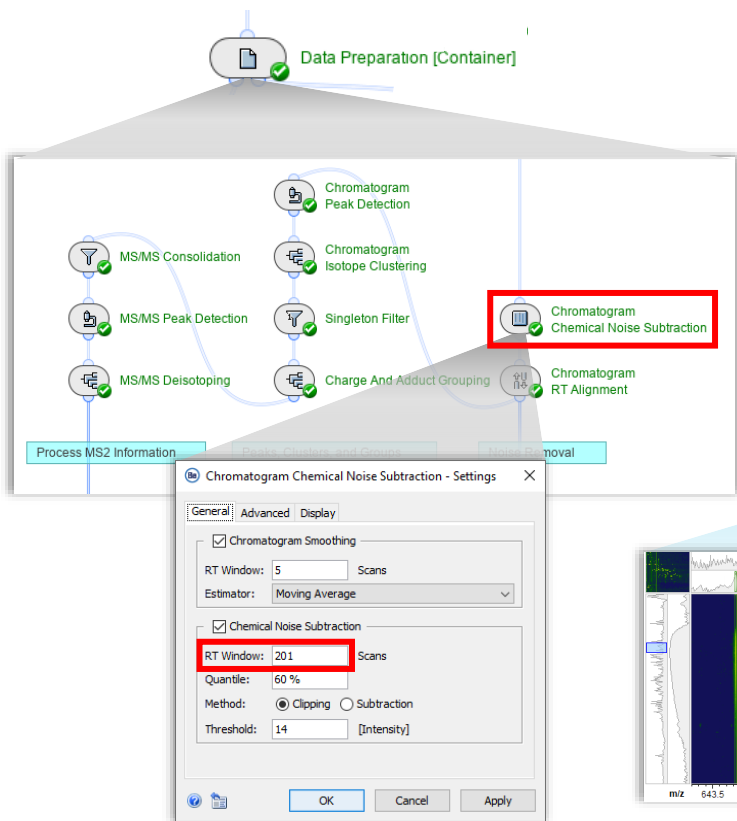
- 仅当默认的噪声消除要求过于苛刻时才会更改此设置，而出现以下情况则表明要求苛刻：
 - 低强度的同位素峰丢失，无论这些峰是来自单 (+1) 或双 (+2) 电荷团簇还是低强度的目标团簇。
 - 较宽 (RT 已扩展) 峰的拖尾被过度截断。



- 如果目标团簇受到影响或上述不需要的峰修饰出现得过于频繁，则将 **Quantile** 设置为更低的值 (如 50%) 。

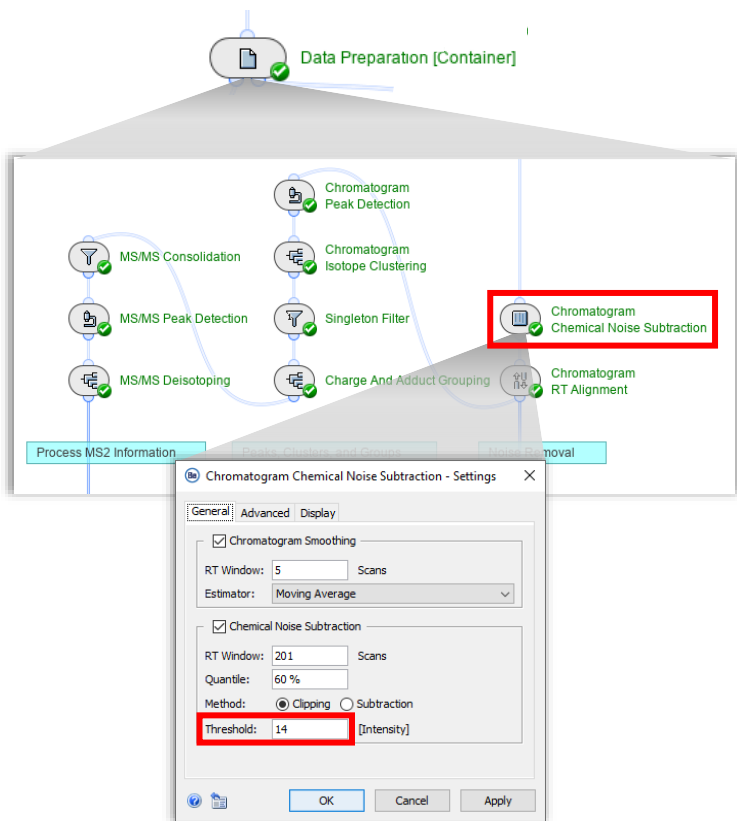
Data Preparation: 化学噪声减除 - RT 窗口

- 如果数据集的最大峰包含的扫描次数少于 50 次，则减少 **RT Window** 中的值（例如，将扫描次数减少到 101 或 151）。
 - 一般而言，**RT Window** 至少应设置为该数据集所含最大峰的扫描次数的两倍。

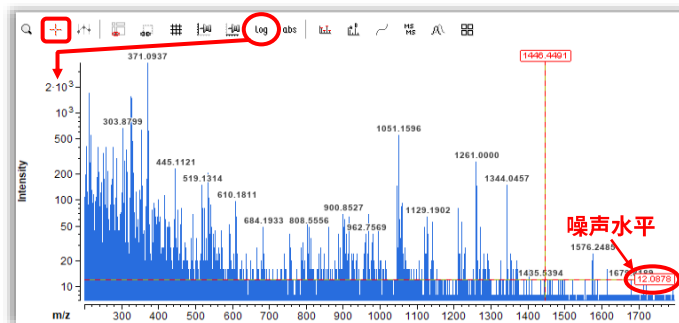


- 要确定扫描次数，请执行以下操作：
1. 在离子图中找到 RT 比其他特征更长的特征。
 2. 获取垂直切片以生成提取离子色谱图。
 3. 右键单击提取离子色谱图窗口并选择 **Profiles**。
 4. 使用 **Advanced Filter Tool** 选择相应峰的 RT 范围。

Data Preparation: 化学噪声减除 - 阈值

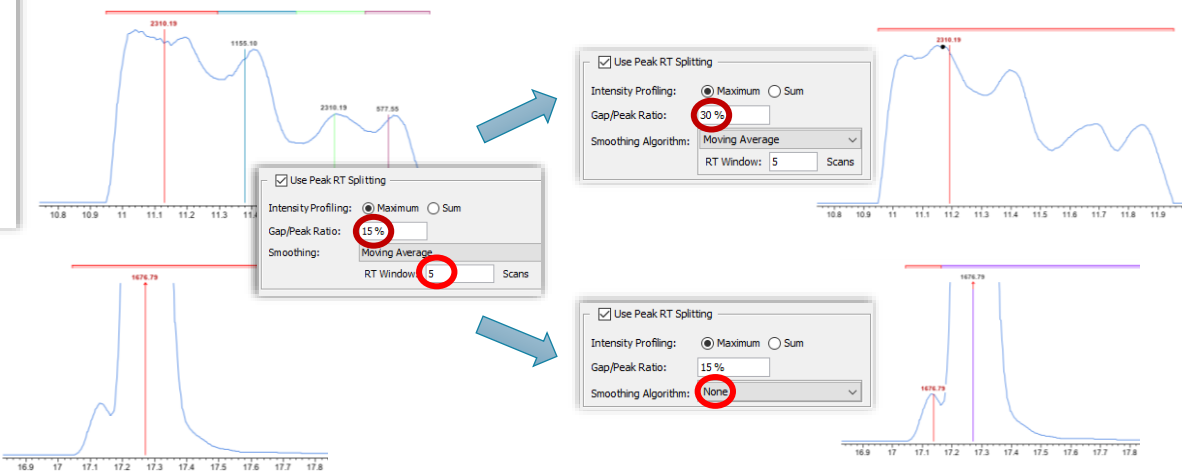
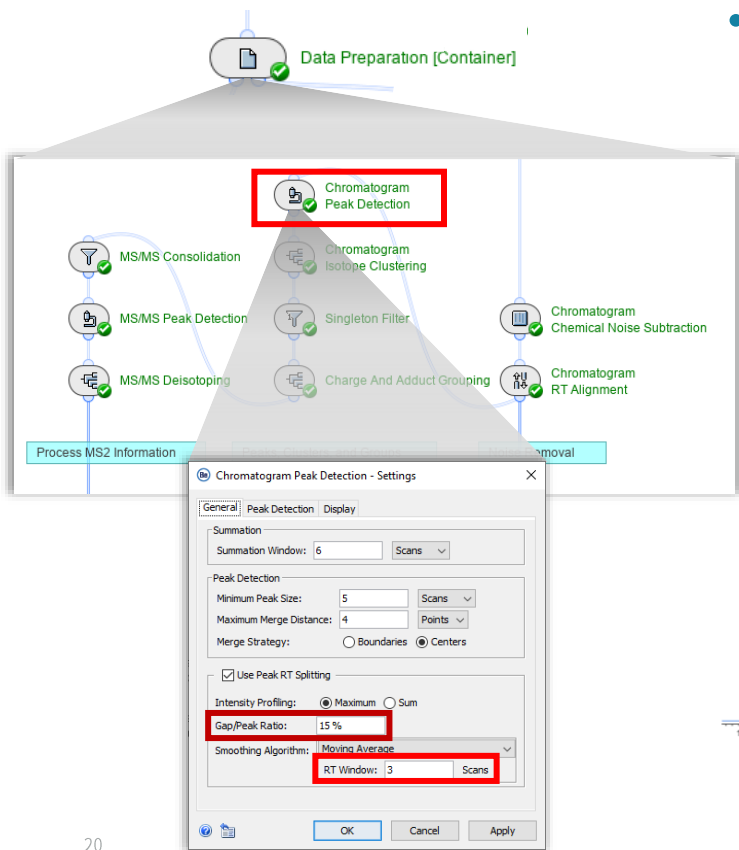


- 如果噪声水平与 *Chromatogram Chemical Noise Subtraction* 活动中预设的 **Threshold** 值相差很大, 则更改此设置。
- 要测量噪声水平并确定适当的 **Threshold** 强度值, 请执行以下操作:
 1. 通过拖动质谱强度轴直到噪声水平清晰可辨来扩展该轴, 或使用工具栏的相应图标将该轴从线性刻度改为对数刻度。
 2. 使用十字准线工具 来测量噪声水平的强度。

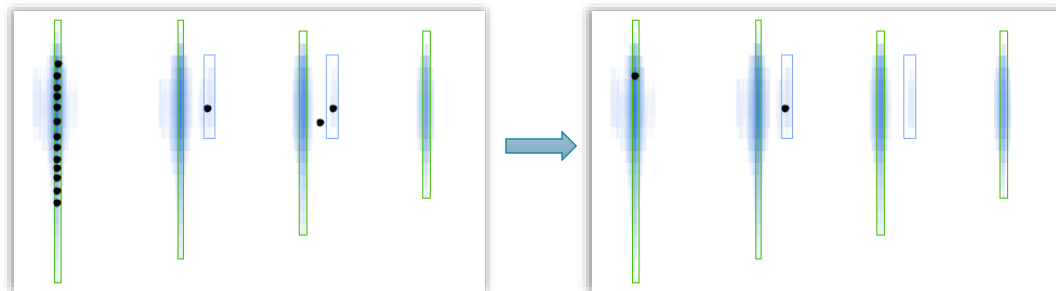
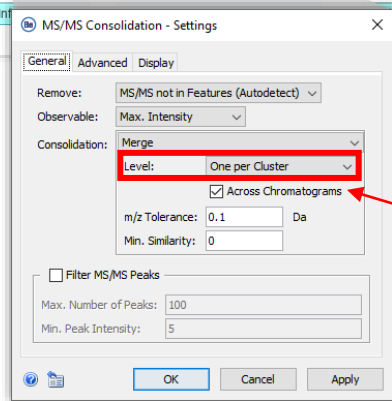
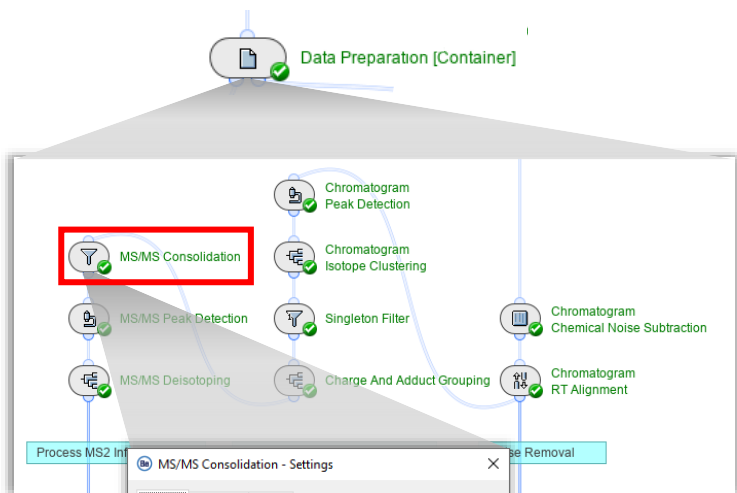


Data Preparation: Chromatogram Peak Detection

- RT 方向上洗脱紧密成分的峰分裂可根据需要进行修改。
 - 要减少分裂：增加 **Gap/Peak Ratio**。
 - 要增加分裂灵敏度：减少或删除 **Smoothing**。



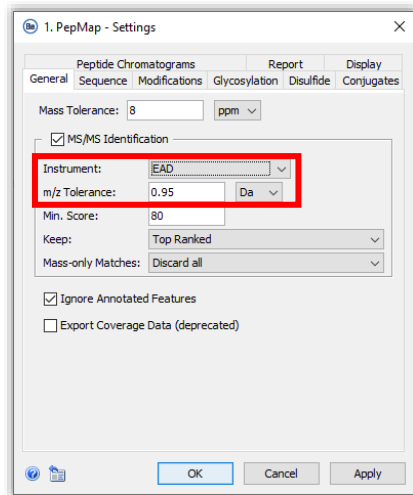
Data Preparation: MS/MS Consolidation



- 此活动节点可合并等效峰和团簇的 MS/MS 数据。
 - 整合可以改善 MS/MS 谱图，从而获得更多鉴定。
 - 如果 MS/MS 谱图过于模糊，整合则可以减少假阳性。

- 用户还可以选择合并 MS/MS Across Chromatograms。
 - 这有助于提高技术性重复的鉴定置信度。
 - 不要在评估单个样本序列覆盖范围时使用此选项。

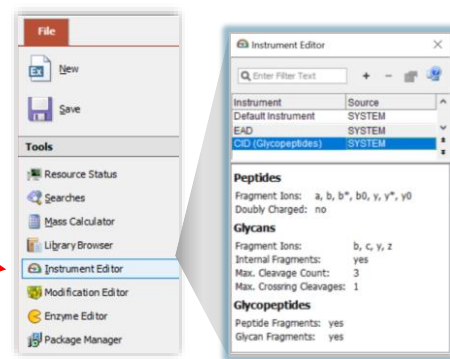
Peptide Mapping: 配置设置 (1)



General 选项卡:

- **Instrument:** 根据具体的实验设置进行选择。

- 要查看或修改: 导航至 **File > Tools > Instrument Editor**。



- **m/z Tolerance:**

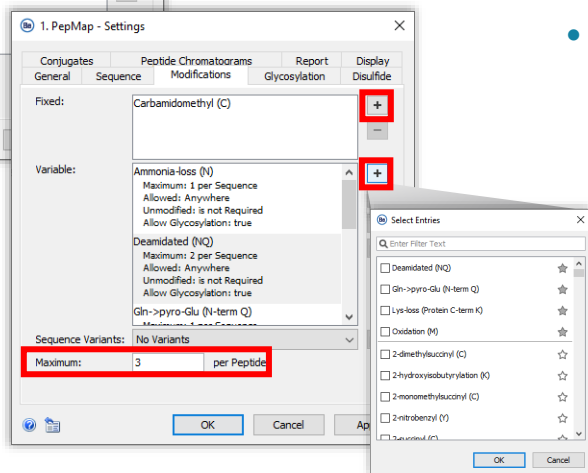
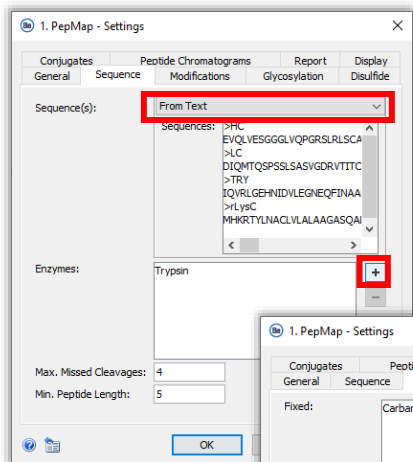
- 默认值 (0.95 Da) 并不能反映 MS 质量准确度。该值可增加鉴定的可能选项，但前提是接受 MS/MS 预处理对 m/z 的潜在影响。
 - 在分析使用 ZenoTOF 7600 系统生成的数据时，将 **m/z Tolerance** 降低至 20 ppm。对使用其他 MS 系统生成的数据进行分析时，也可以将 **m/z Tolerance** 降低到 20 ppm。
 - 降低 **m/z Tolerance** 可以限制生成的假阳性或含糊标注的数量。
- 必要情况下也可以增加该默认值，例如当数据的误差分布比较广泛时。

Peptide Mapping: 配置设置 (2)



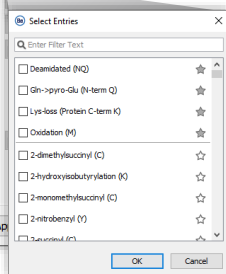
Sequence 选项卡:

- **Sequence(s)**: 粘贴为文本或作为 FASTA 文件上传。
 - 酶专一性、缺失分裂的最大数量和最小肽长都可以根据需要进行调整。
- **Enzymes**: 要查看系统配置和用户定义的酶列表, 请使用右侧的 + 打开 **Select Entries** 对话框。

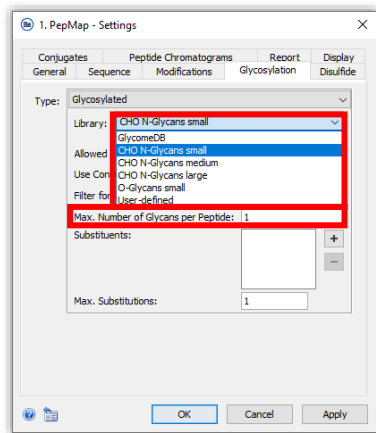


Modifications 选项卡:

- 使用右侧的 + 打开 **Select Entries** 对话框, 查看 **Fixed** 或 **Variable** 修饰的潜在列表。
 - 只要选择星形图标, 即可将常用修饰添加为收藏项。
 - 如需分析过度或欠烷基化, 请将半胱氨酸和其他目标氨基酸的烷化剂设置为 **Variable**。

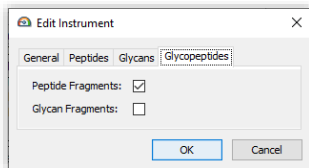


Peptide Mapping: 配置设置 (3)



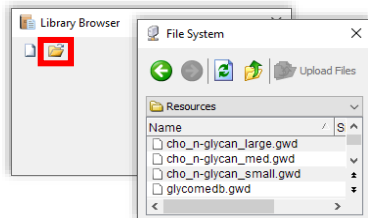
注：在 Edit Instrument 设置中禁用糖肽的 **Glycan Fragments** 可减少搜索复杂聚糖所需的时间。

建议为 CID 模式下采集的数据启用 **Glycan Fragments**。



Glycosylation 选项卡：

- **Library:** 选择系统配置或用户定义的谱库。
 - 要查看或修改聚糖谱库：导航至 **File > Tools > Library Browser > Resources**。
- **Max. Number of Glycans per Peptide:** 搜索“预计的糖肽候选物”时，需遵守所允许的阈值数量（详情参见下一页）。
 - **Allowed Sites: Only N-linked:** 因为每个肽的潜在共有序列通常较少，所以搜索 *N*-糖基化时通常需要设置更宽松的搜索条件：
 - 最大允许值是每个肽最多 4 个 *N*-聚糖。
 - 缺失分裂和可变修饰的数量会影响搜索时间。
 - **Allowed Sites: Only O-link:** 每个丝氨酸和苏氨酸（S 和 T）残基都是 *O*-糖基化的潜在位点。
 - 包含许多潜在糖基化位点的长肽会对“预计的糖肽候选物”数量和后续处理时间产生重大影响。
 - 如果使用的酶所产生的肽长更短，则有助于减少搜索时间并限制候选物的总数，例如在设置中使用胰蛋白酶/P，使分裂不受 RP/KP 的限制。



Peptide Mapping: 配置设置 (4)

在经胰蛋白酶消化的依那西普中，允许对 O-聚糖进行的搜索组合示例：

酶：胰蛋白酶
缺失分裂：1

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

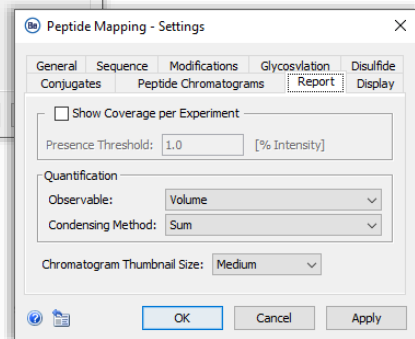
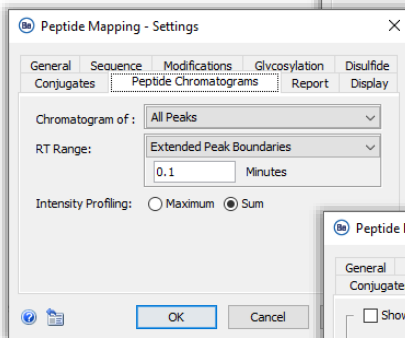
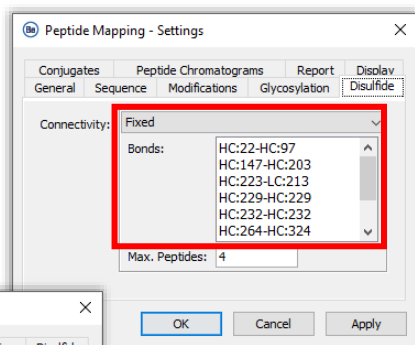
酶：胰蛋白酶/P
缺失分裂：0

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

Glycosylation 选项卡：

- 使用因子组合计算“预计的糖肽候选物”数量，以确定能否继续搜索：
 - 聚糖谱库中的聚糖数量（包括取代基）。
 - 使用可包含相关目标聚糖的最小谱库大小。
 - 选择 **Filter for Core Structures** 有助于限制候选物。
 - 每个肽允许的最大聚糖数。
 - 不要高于该分子的预期值。值越低，允许使用的谱库越大，反之亦然。
 - 糖基化在某个肽上的理论位置。
 - 此位置与缺失分裂的数量和酶专一性有关。
- 其他搜索参数也会影响搜索总时间。
 - 要缩短完成时间，可执行以下操作：
 - 禁用 **Edit Instrument** 设置中的 **Glycan fragments**。
 - 尽量减少每个肽的可变修饰及其数量。
 - 尽量增加最小肽长。
 - 减少每个肽的聚糖数量。
 - 减少聚糖谱库的大小。

Peptide Mapping: 配置设置 (5)



Disulfide 选项卡:

- 对于非还原样本：将 **Connectivity** 设置为 **Fixed**。使用正确的语法（例如 HC:22-HC:97）指定预期的二硫键。
 - 链名必须与 **Sequence** 选项卡中指定的名称匹配。
- 对于还原样本：将 **Connectivity** 设置为 **None**。

Peptide Chromatograms 选项卡:

- 查看此活动的结果时，这些设置控制肽色谱图的布局，并且无需更改。

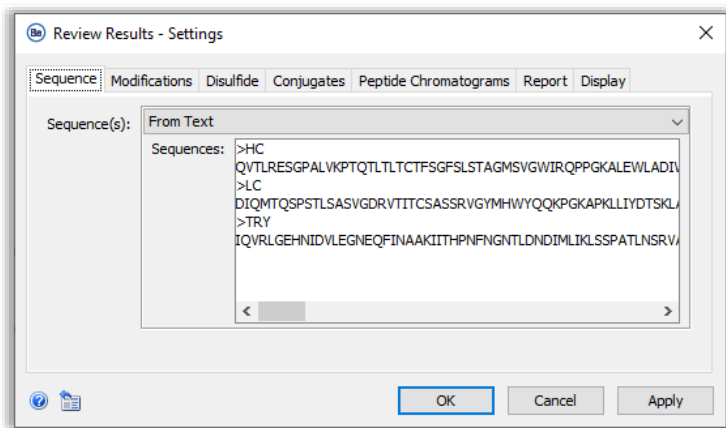
Report 选项卡:

- 我们建议将使用 QTOF 系统采集所得数据的 **Volume** 设置为 **Observable**。

Review Results: 配置设置



Review Results



Sequence 选项卡:

- **Sequence(s):** 粘贴为文本或作为 FASTA 文件上传。
 - 在 *Peptide Mapping* 活动节点和 *Review Results* 活动节点中使用相同的 FASTA 蛋白质序列。

Review Results: 审核肽图分析结果



Review Results

- 打开 *Review Results* 活动节点，查看任何先前的 *Peptide Mapping* 活动节点的组合结果。

The screenshot displays the 'Review Results' window. At the top, there are tabs for 'Peptide Map', 'Peptide Chromatogram', 'Fragment Spectra Viewer', and 'Fragment Spectra Peak Table'. The 'Peptide Map' shows a protein sequence with highlighted peptides. The 'Fragment Spectra Viewer' shows a mass spectrum with peaks labeled Z1+1, Z2+2, Z1+1, and Z14+1. The 'Peptide Table' is the main focus, with a red box around the 'Review' button and the table content. The table has columns for Range, Peptide, Modifications, Mod. Locations, Glycans, Calc. Mass, and Flag. The 'Fragment Spectra Table' shows a single entry for the peptide EVQLV... with a scan index of 224.

Range	Peptide	Modifications	Mod. Locations	Glycans	Calc. Mass	Flag
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]	EVQLVESGGGLVQPGRSLRSLSCAASGFTDDYAMHWVR	Carbamidom...	[C22]		4195.04	
7 HC[1-38]	EVQLVESGGGLVQPGRSLRSLSCAASGFTDDYAMHWVR	Carbamidom...	[C22] [M34]		4211.03	
8 HC[1-43]	EVQLVESGGGLVQPGRSLRSLSCAASGFTDDYAMHWVRQ...	Carbamidom...	[C22]		4676.3	

1. 激活 **Review** 模式并接受所有相关峰的某个标注。
2. 拒绝所有其他多余的标注。
3. 单击 **Save** 以应用更改。

该活动节点会再次运行，自动重新计算肽的数量。

Review Results: 异构体区分



Review Results

- 使用 EAD 进行 MS/MS 分析期间，会产生能够区分异构氨基酸残基的诊断性内部碎片离子。

- 要确认亮氨酸 (Leu) 或异亮氨酸 (Ile) 的存在情况：

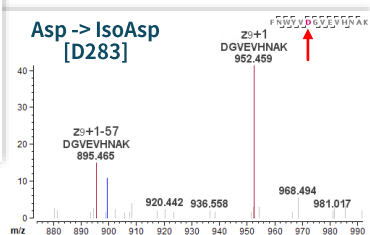
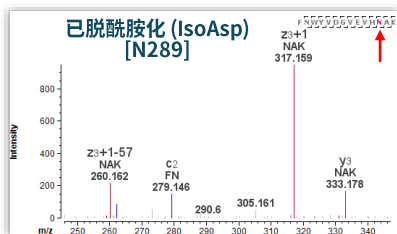
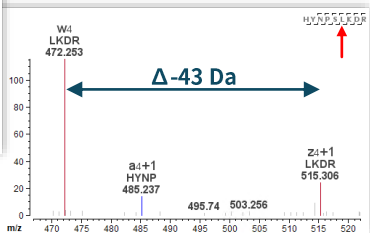
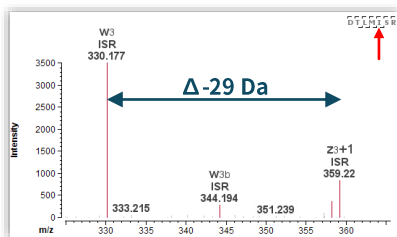
- 离子在 MS/MS 谱图中被标注为 w_n 或 w_{nb} 。

- 亮氨酸： w_n 离子所在位置与相应的 $z+1$ 离子有 43 Da 的质量偏移。
- 异亮氨酸： w_n 离子所在位置与相应的 $z+1$ 离子有 29 Da 的质量偏移。

- 要确认天冬氨酸 (Asp) 或异天冬氨酸 (IsoAsp) 的存在情况：

- 离子在 MS/MS 谱图中被标注为 c_n+57 或 z_m+1-57 。

- 在 MSMS 谱图中标注了 c_n+57 或 z_m-157 离子则表明存在异天冬氨酸。
- 因为肽骨架中没有亚甲基组，天冬氨酸不会产生这些诊断性内部碎片离子。



注：为了获得最佳结果，在 Peptide Mapping 活动中使用的 m/z Tolerance 应 < 20 ppm。

Review Results: 异构体区分 (环化和脱酰胺化)



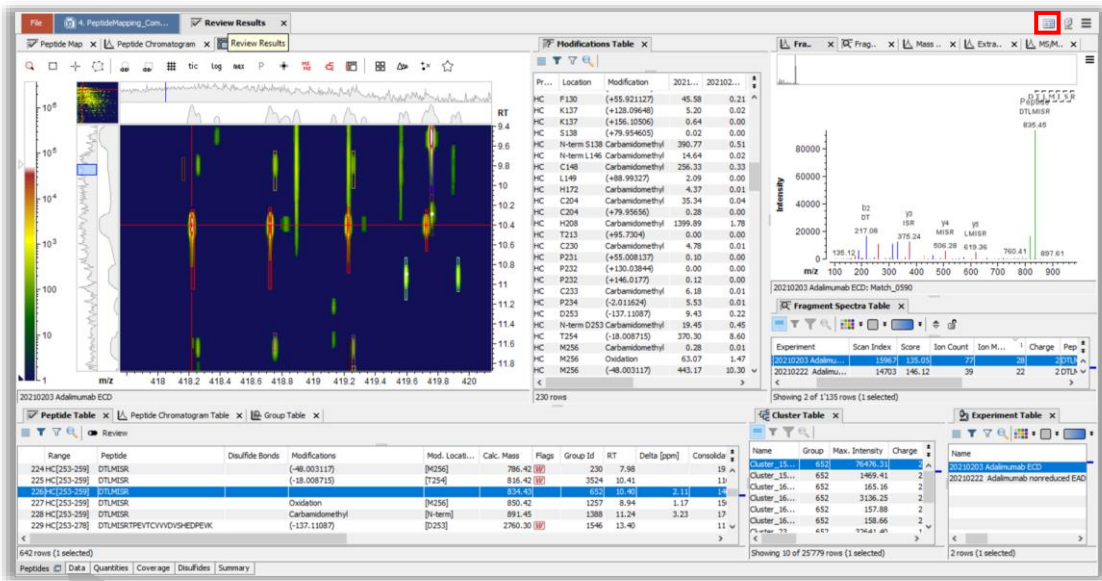
Review Results

✓ 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]

- 为了简化数据审核，可对相关修饰进行筛选。例如：
 - Asp → IsoAsp
 - 已脱酰胺化
 - 已脱酰胺化 (IsoAsp)
- MS/MS 谱图中存在的诊断性内部碎片离子而后也可用于确认区分情况，并根据需要接受或拒绝结果。

Review Results: 创建自定义布局

单击以保存或加载已保存的布局。



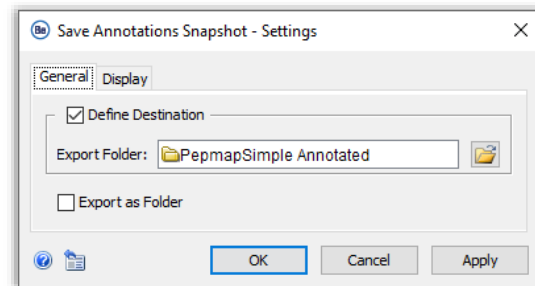
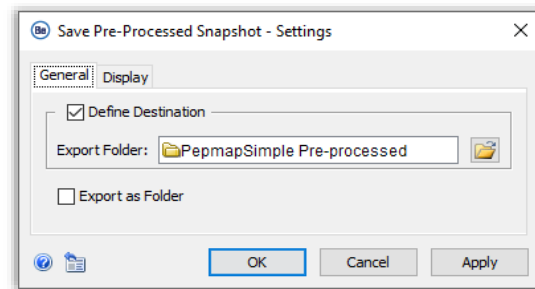
des Data  Q

单击以断开 Data 选项卡窗口的连接。

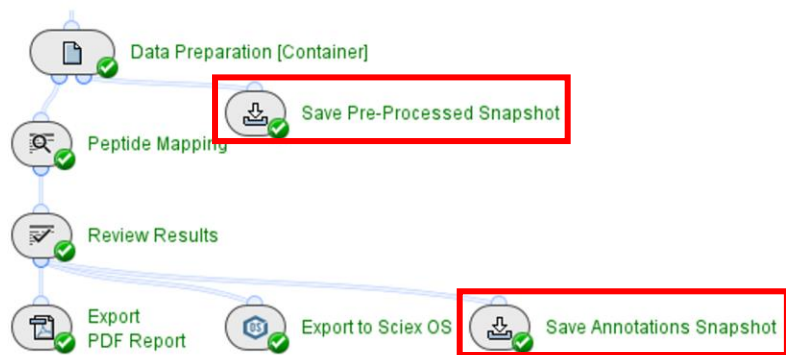
- 用户可以断开每个窗格的连接并使其停靠在新位置。
- 断开的窗格将要停靠的位置会用蓝色框突出显示。
- 要将离子图移动到 **Peptides** 选项卡中，请执行以下操作：
 1. 选择 **Data** 选项卡，然后单击该图标以断开 **Data** 选项卡窗口的连接。
 2. 随后可以移除离子图或 **Data** 选项卡窗口中的任何窗格，并将其拖动到 **Peptides** 选项卡上的新位置。
- 收藏的布局可以通过布局图标保存和访问。

报告：定义快照和报告的目标位置

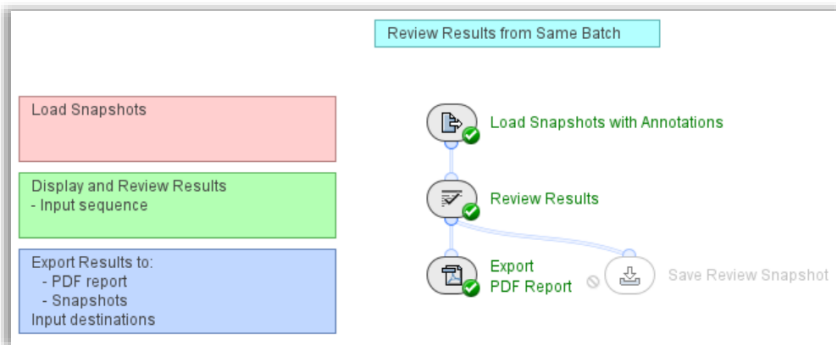
- 选择将要存储结果的文件夹。
- 有两种类型的结果可供储存：
 - **Snapshots:**
 - 快照是可永久保存为 sbf 文件的中间结果。
 - 通过预处理数据保存的快照可存储完成 *Chromatogram Chemical Noise Subtraction* 和 *Chromatogram RT Alignment* 后生成的中间结果。
 - 完成 *Review Results* 后保存的快照可存储所有中间信息，包括特征的标注。
 - **包括以下内容的 PDF Reports:**
 - 一个 PDF 文件。
 - 一个含有来自去卷积的谱图信息的 Excel 文件。
 - 一个已执行的工作流程（xml 文件），包括用于生成结果的设置。
 - 要打开 xml 文件，请将其拖放到 Biologics Explorer 工作流程的主页。



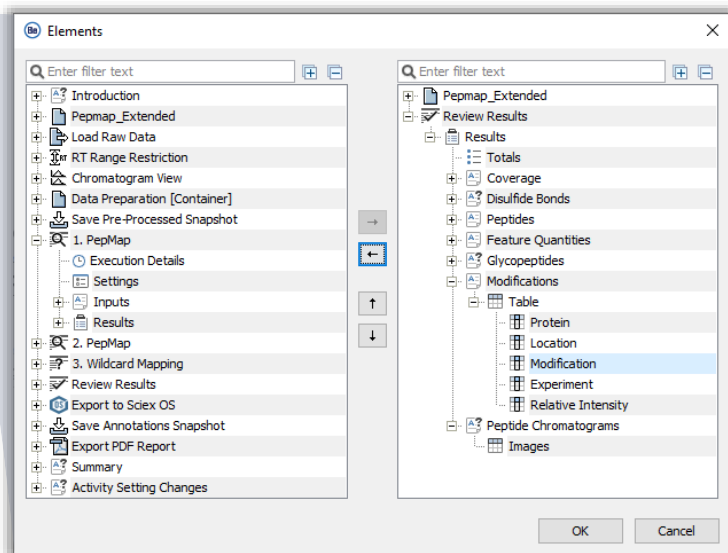
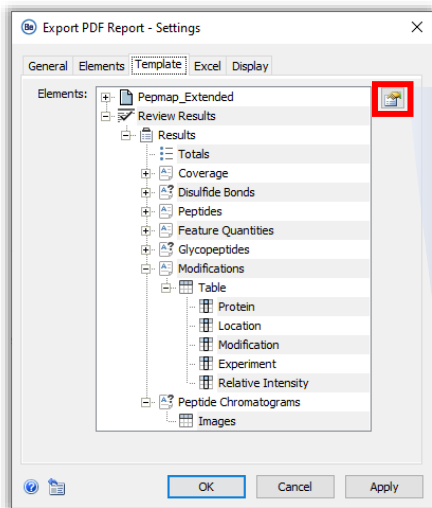
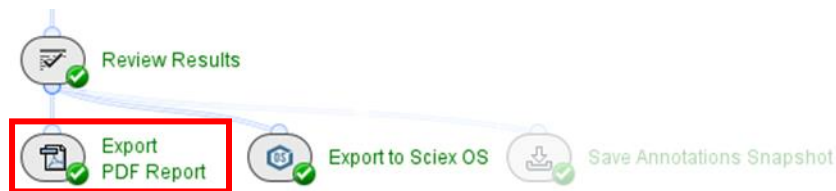
报告：保存中间结果



- 在整个工作流程的不同活动节点之后存储中间结果。
 - *Save Snapshot* 活动节点可创建包含已处理数据的必要属性的文件 (sbf)。
- 要查看存储的数据，请打开位于 Pepmap_ReviewSnapshots 工作流程中的 *Load Snapshots* 活动节点的 sbf 文件。
 - 加载 *Save Annotations Snapshot* 中的快照，以审核相同数据集的结果。
 - 加载 *Save Pre-processed Snapshot* 中的快照，以分析不同批次的结果。
- 已保存的 sbf 文件也可以加载到任何工作流程中的 *Load Raw Data* 活动节点中。
 - 加载 *Save Annotations Snapshot* 中的快照，并跳过所有活动节点（进行肽图分析所需的活动节点除外），以便为某项分析添加更多搜索。

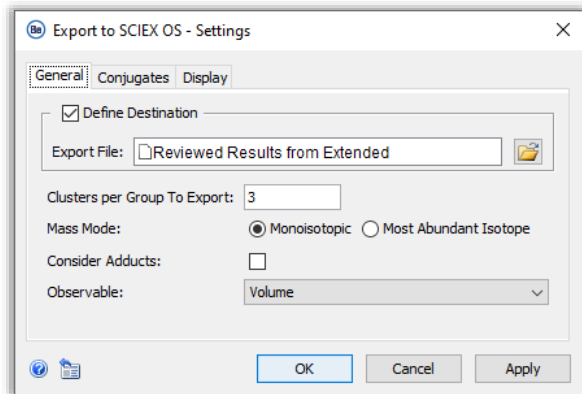
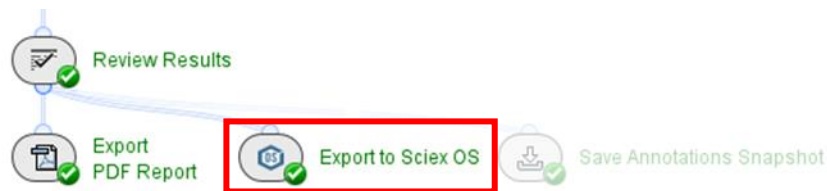


报告: *Export PDF Report*



- **General** 选项卡: 定义导出报告的目标位置。
- **Template** 选项卡: 自定义报告的内容。
- **Excel** 选项卡: 自定义将与报告一起导出的表格。

报告: *Export to SCIEX OS*



- **General** 选项卡:

- 定义已审核结果的目标位置。
- 定义导出的要求, 例如每个组所需的团簇数量。

- *Export to SCIEX OS* 活动节点不应与 *Wildcard Mapping* 活动节点结合使用。

- 在相关工作流程中, 可以跳过 *Wildcard Mapping* 活动节点。

注: 使用 *Export to SCIEX OS* 活动节点导出的修饰位置与肽相关, 与蛋白质无关。例如, DTL[M]ISR 会是 M4, 而不是 M255。

B 部分

工作流程和应用

特定肽图分析工作流程的指南

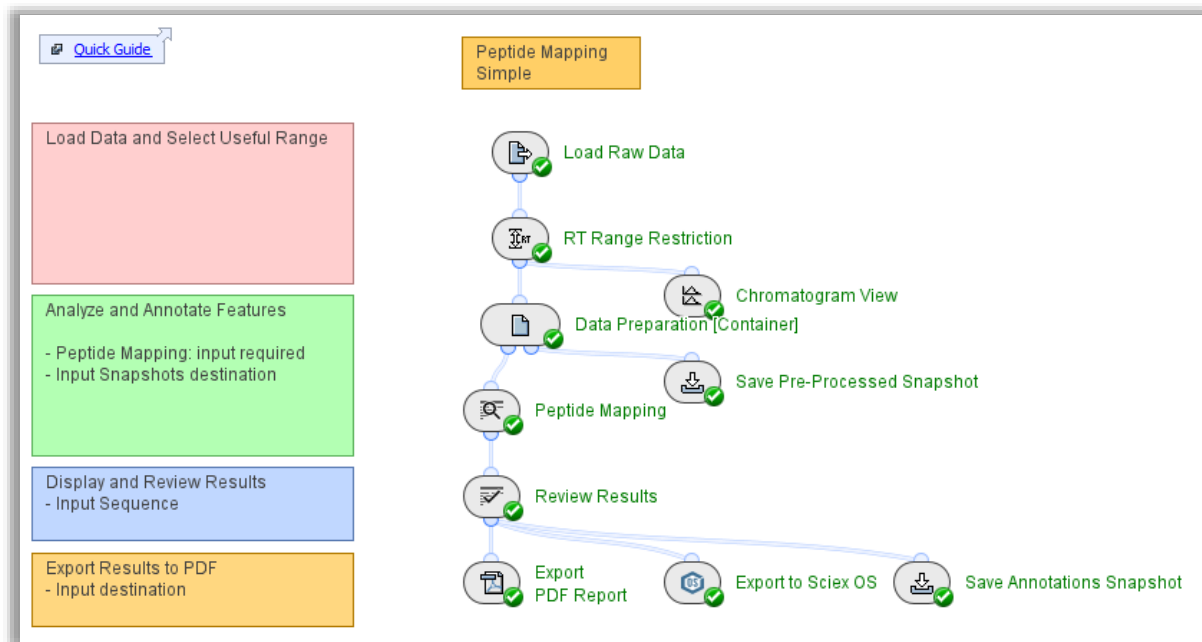


简单的肽图分析

工作流程特定指南

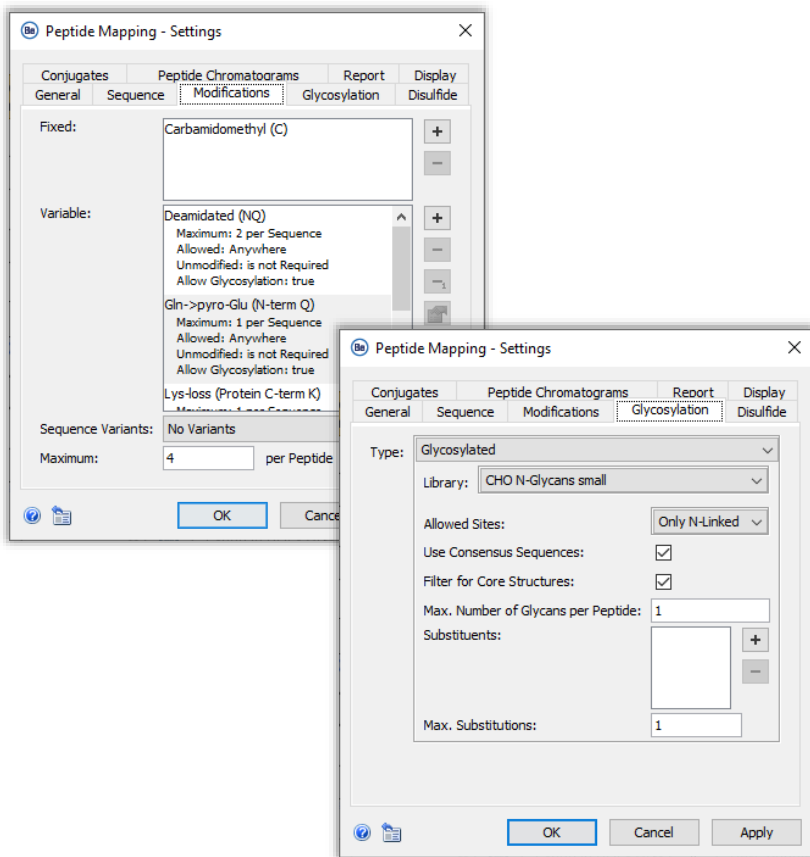


简单的肽图分析工作流程：设计



Pepmap_Simple

简单的肽图分析工作流程：概述



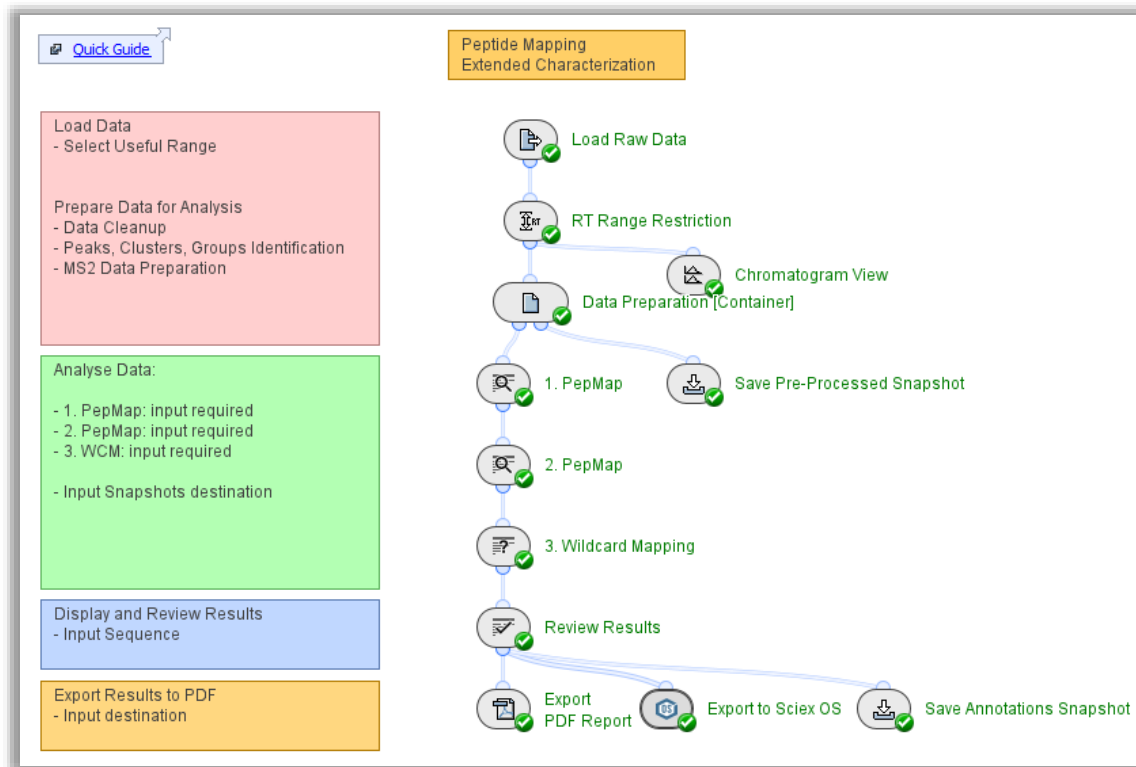
- 如使用不复杂的生物治疗分子完成常规分析，可使用此工作流程。
- *Peptide Mapping* 活动节点中的搜索参数组合可识别通常预期的肽和修饰，包括糖基化。

扩展式肽图分析

工作流程特定指南

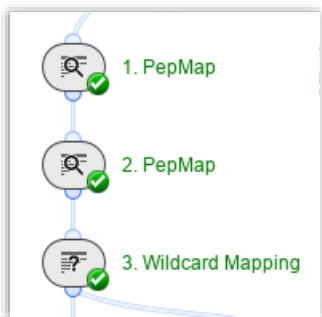


扩展式肽图分析工作流程：设计



Pepmap_Extended

扩展式肽图分析



- 如需进行更全面的肽图分析，可以合并多达三个连续活动节点的结果，以扩展搜索空间，并同时最大限度地减少假阳性：

1. PepMap

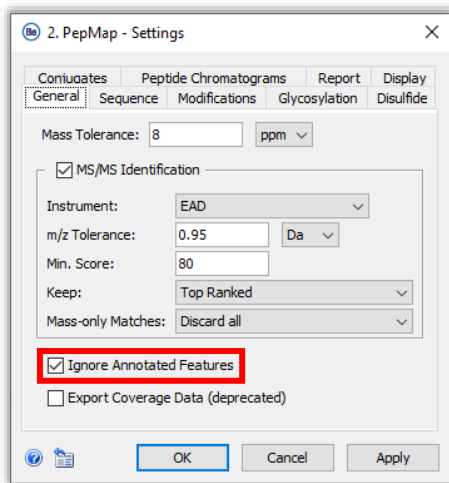
- 识别最期待的肽和修饰。

2. PepMap

- 对样本进行更深入的研究。
- Ignore Annotated Features:** 确保仅考虑先前搜索未标注的特征。

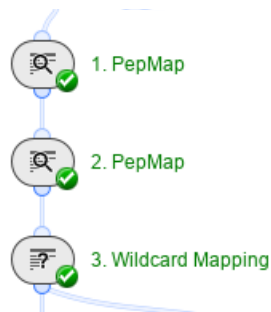
3. Wildcard Mapping

- 搜索意外修饰，随后可将其添加到 *1.PepMap* 或 *2.PepMap* 活动节点。



注：对于具有预期 *N*-和 *O*-糖基化的生物治疗药物，只要将 *1.PepMap* 用于识别预期的 *N*-聚糖，并使 *2.PepMap* 专注于不太好表征的典型 *O*-聚糖，假阳性就会减少。

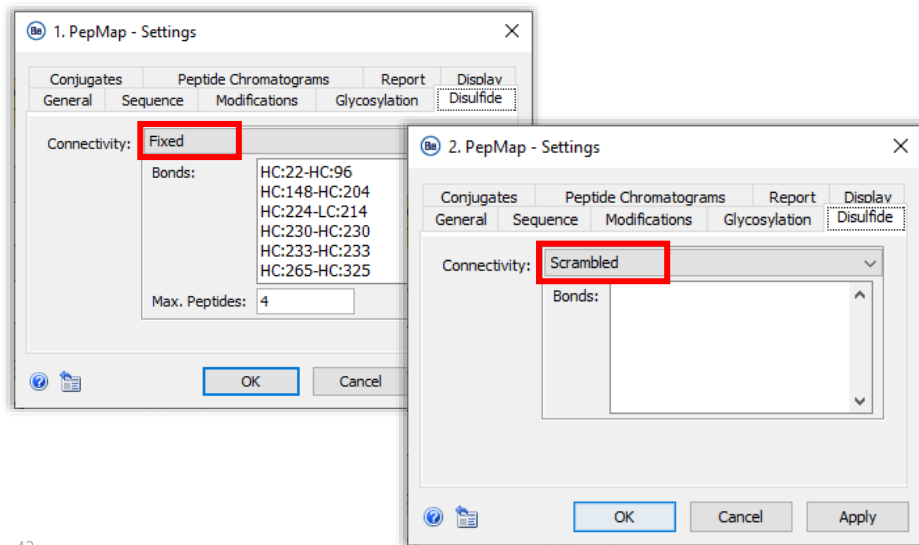
逐步肽图分析：应用示例



- 用户可以将三个连续的肽图分析步骤结合起来，具体取决于所需的分析类型。

示例 1：非还原样本的二硫键 (DSB) 分析。

- 此类分析的特定关键设置：



1. PepMap

- **Sequence** 选项卡：Enzyme - 完全指定。
- **Disulfide** 选项卡：Fixed Connectivity。
 - 使用正确的语法 (HC:22-HC:96) 定义预期的二硫键。

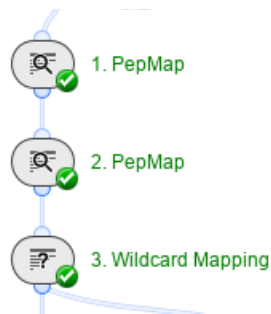
2. PepMap

- **Sequence** 选项卡：Enzyme - 完全指定。
- **Disulfide** 选项卡：Scrambled Connectivity。

3. Wildcard Mapping

- 利用 **All Peptide Candidates** 获取关于未知修饰的更多标注。

逐步肽图分析：应用示例



- 用户可以将三个连续的肽图分析步骤结合起来，具体取决于所需的分析类型。
示例 2：转译后修饰 (PTM) 分析。

- 此类分析的特定关键设置：

Glu->pyro-Glu	Glu->pyro-Glu	Oxidation	Trp->Kynurenin
Ammonia-loss	Carbamidomethyl	Deamidated	Dioxidation

1. PepMap

- **Sequence** 选项卡：Enzyme - 完全指定。
- **Modifications** 选项卡：丰度和预期修饰。

2. PepMap

- **Sequence** 选项卡：Enzyme - 部分指定。
- **Modifications** 选项卡：预期修饰的较短列表。

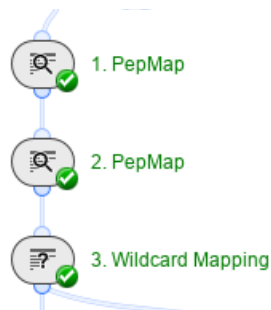
或：

- **Sequence** 选项卡：Enzyme - 完全指定。
- **Modifications** 选项卡：在低丰度下可能出现的一组不太常见的替代修饰。

3. Wildcard Mapping

- 利用 **All Peptide Candidates** 获取关于未知修饰的标注。

逐步肽图分析：应用示例



- 用户可以将三个连续的肽图分析步骤结合起来，具体取决于所需的分析类型。

示例 3：序列变异分析 (SVA)。

- 此类分析的特定关键设置：

1. PepMap

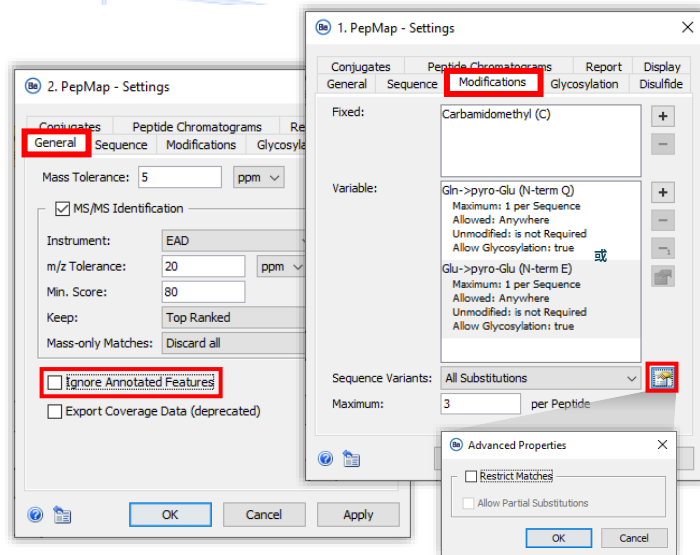
- **Sequence** 选项卡：**Enzyme** - 完全指定。无缺失分裂。
- **Modifications** 选项卡：固定烷基化 (cys)，仅限主要形式的可变修饰（如焦谷氨酸）。**Sequence Variants - All Substituents** (**Restrict Matches** 已取消勾选)。

2. PepMap

- **General** 选项卡：较低的 **Mass Tolerance**。取消勾选 **Ignore Annotated Features**。
- **Sequence** 选项卡：**Enzyme** - 部分指定。1-2 个缺失分裂。
- **Modifications** 选项卡：对常见修饰的氨基酸进行可变烷基化，以检测过度烷基化和所有其他预期的可变修饰。

3. Wildcard Mapping

- 利用 **Only Annotated Peptides**。
- 使用 *Review Results* 来比较同一特征上的附加标注，以排除假阳性。

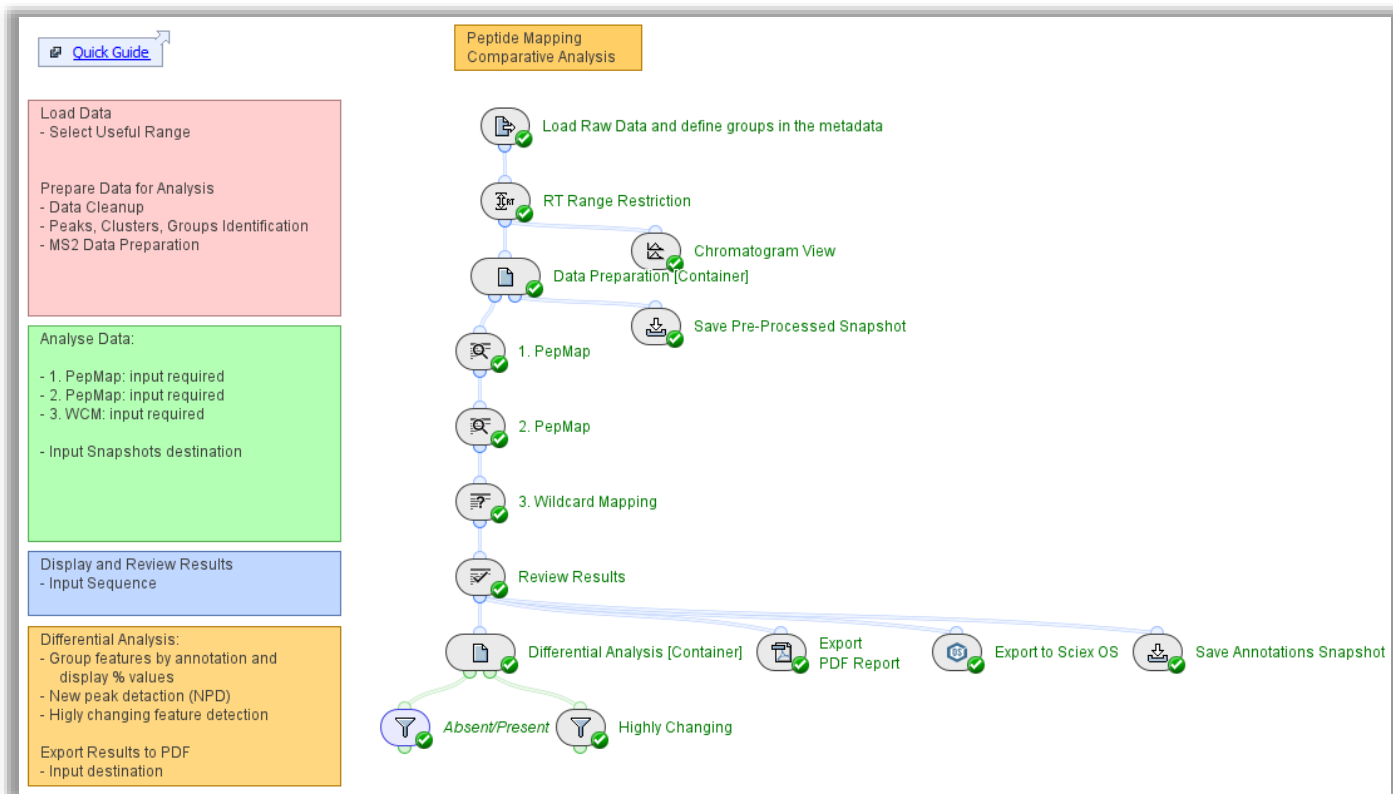


比较型肽图分析

工作流程特定指南



比较型肽图分析工作流程：设计



Pepmap_Comparative

比较型肽图分析

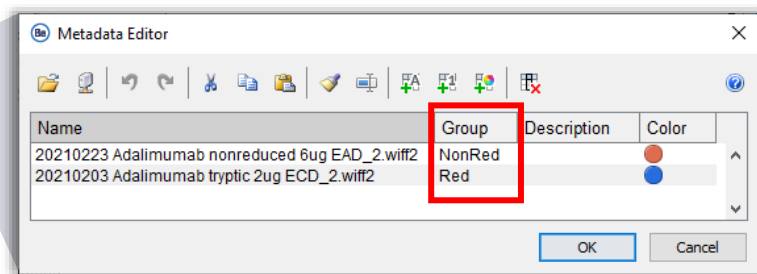
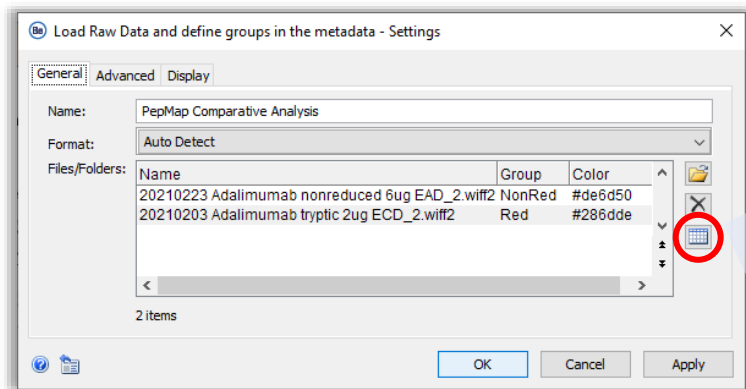


这些统计活动节点可识别在工作流程中被比较的两个样本组之间显著不同的特征。

- 用绿线连接的活动节点包含统计工具。
- 这些统计活动节点可用于比较两个数据集，并报告符合以下任一条件的肽：
 - 在某个样本组中不存在，但存在于其他样本组。
 - 样本组之间具有特定的倍数变化差异。

- 用例示例：
 - 比较还原和非还原样本。
 - 比较已受压和未受压的样本。
 - 比较参考样本与新批次的样本。

Load Raw Data 和定义组



- 单击 **General** 选项卡上的表格图标以打开 **Metadata Editor**。
 - 指定待比较文件的 **Group** 名称。
 - 也可以选择添加 **Color** 列并定义每组的颜色。

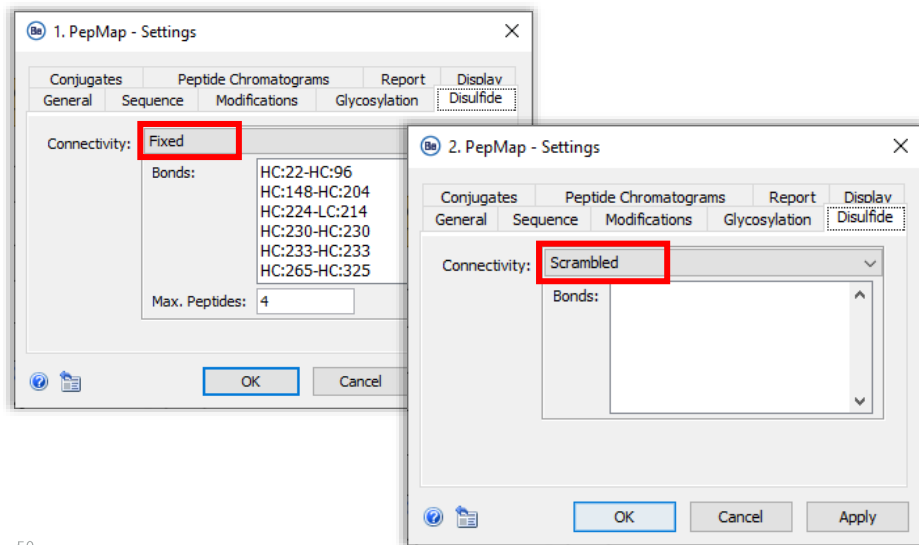
逐步肽图分析：应用示例



- 用户可以将三个连续的肽图分析步骤结合起来，具体取决于所需的分析类型。

示例 1：用于比较还原和非还原样本的 DSB 分析。

- 此类分析的特定关键设置：



1. PepMap

- **Sequence** 选项卡：完全指定。
- **Disulfide** 选项卡：**Fixed Connectivity**。
 - 使用正确的语法 (HC:22-HC:96) 定义预期的二硫键。
- **Modifications** 选项卡：可变烷基化 (cys)。

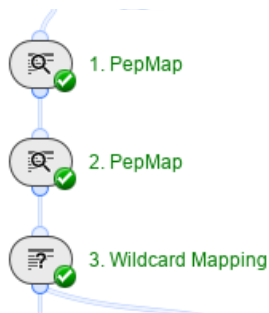
2. PepMap

- **Sequence** 选项卡：完全指定。
- **Disulfide** 选项卡：**Scrambled Connectivity**。

3. Wildcard Mapping

- 利用 **All Peptide Candidates** 获取关于未知修饰的更多标注。

逐步肽图分析：应用示例



- 用户可以将三个连续的肽图分析步骤结合起来，具体取决于所需的分析类型。

示例 2：压力测试和批次间可变性的比较分析。

- 此类分析的特定关键设置：

1. PepMap

- **Sequence** 选项卡：完全指定。
- **Modifications** 选项卡：丰度和预期修饰。

2. PepMap

- **Sequence** 选项卡：酶未指定。
- **Modifications** 选项卡：预期修饰的较短列表。

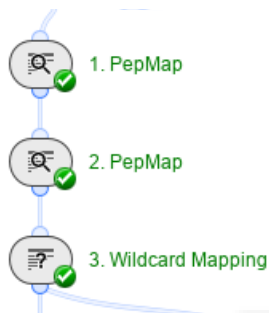
或：

- **Sequence** 选项卡：完全指定。
- **Modifications** 选项卡：在低丰度下可能出现的一组不太常见的替代修饰。

3. Wildcard Mapping

- 利用 **All Peptide Candidates** 获取更多标注。

逐步肽图分析：应用示例



- 用户可以将三个连续的肽图分析步骤结合起来，具体取决于所需的分析类型。

示例 3：用于比较野生型 (WT) 和突变型样本的 SVA。

- 此类分析的特定关键设置：

1. PepMap

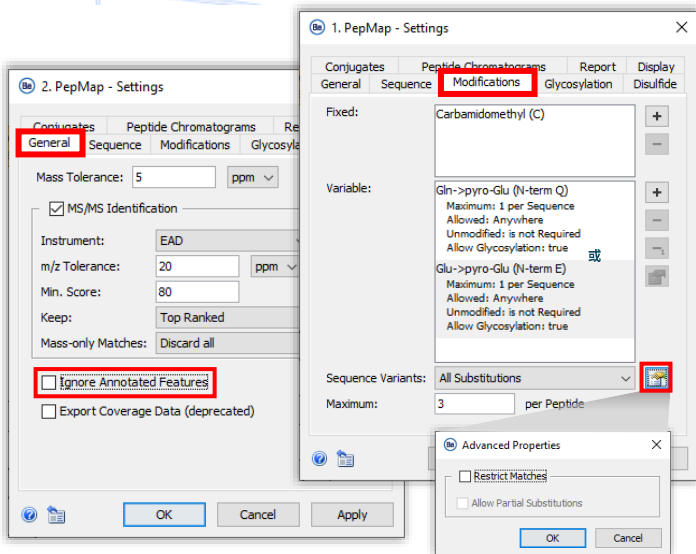
- **Sequence** 选项卡：**Enzyme** - 完全指定。无缺失分裂。
- **Modifications** 选项卡：固定烷基化 (cys)，仅限主要形式的可变修饰（如焦谷氨酸）。**Sequence Variants - All Substituents** (**Restrict Matches** 已取消勾选)。

2. PepMap

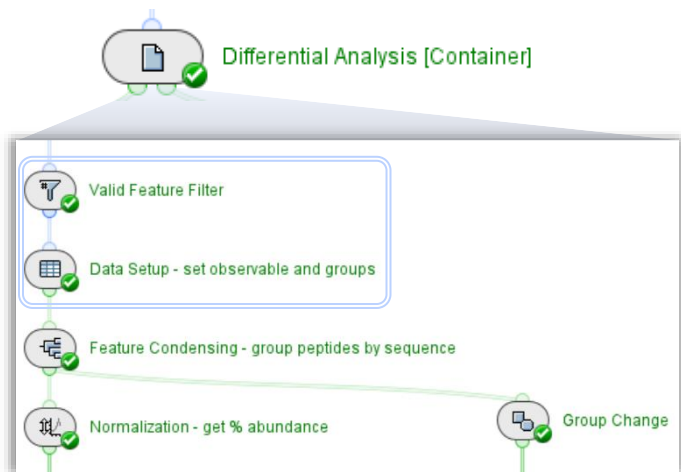
- **General** 选项卡：较低的 **Mass Tolerance**。取消勾选 **Ignore Annotated Features**。
- **Sequence** 选项卡：**Enzyme** - 部分指定。1-2 个缺失分裂。
- **Modifications** 选项卡：对常见修饰的氨基酸进行可变烷基化，以检测过度烷基化和所有其他预期的可变修饰。

3. Wildcard Mapping

- 利用 **Only Annotated Peptides**。
- 使用 **Review Results** 来比较同一特征上的附加标注，以排除假阳性。



Differential Analysis 活动节点设置



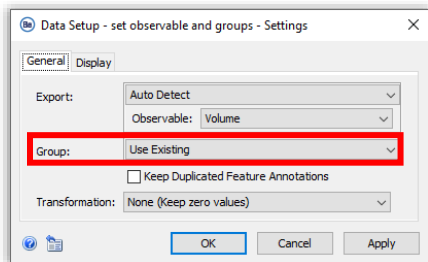
- **Group Change:** 计算不同实验组之间的相对和倍数变化差异。
 - 如果存在多个实验组，则报告的变化是任意两组之间的最大差异。

- **Valid Feature Filter:** 删除低于设定阈值的所有特征，以及出现少于某个设定百分比或实验数量的那些特征。
 - 此筛选可删除由于噪声或人为因素引起的不重要差异或任何信号。如果不存在预期的肽，则可优化此设置。
- **Data Setup:** 准备可用作筛选和统计任务之输入的矩阵式数据。
 - 如果未在 *Load Raw Data* 中设置组，则可以在此处定义。

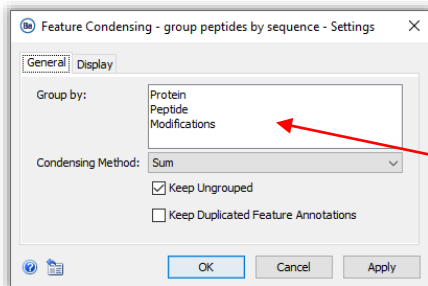
- **Feature Condensing:** 根据标注对特征进行分组。
 - 计算所创建的每个组的单个强度值。
- **Normalization:** 为进一步的统计分析提供可比较的基准。
 - **Percent Abundance:** 对每个实验的每个组的所有成员进行求和。将每个值除以相应组的总和，然后乘以 100。

注：将设置链接至此前的活动节点：在编辑 *Feature Condensing* 之前运行 *Data Setup*。

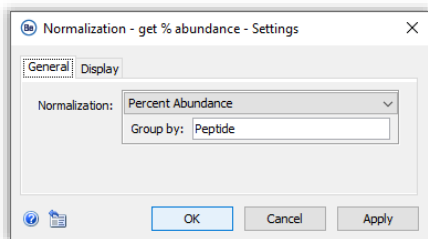
Differential Analysis: 数据准备



- 通过编辑元数据表，在 *Load Raw Data* 活动节点中定义组（首选项）。
- 必要时可使用 **Group: Manually** 定义 *Data Setup* 活动节点中的组，并将每个样本分配到一个组。

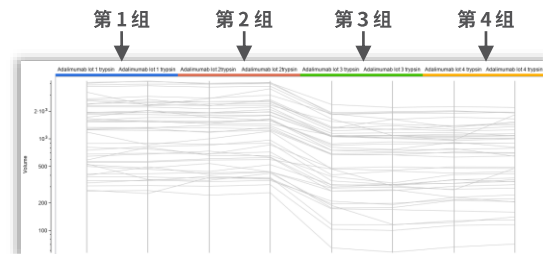


- **Feature Condensing**: 组合基于现有标注的特征，并计算每个组的单个强度值（总和、平均值、中位值或最大值）。例如，来自相同蛋白质且具有相同修饰的相同肽将使用这些设置进行求和。
 - 在编辑 *Feature Condensing* 设置之前，运行 *Data Setup* 活动节点。



- **Normalization**: 此项将报告相对于所选标注类型的浓缩特征的 **Percent Abundance**。例如，如果将 **Group by** 设置为 **Peptide**，则会按肽计算丰度百分比。如果将 **Group by** 留空，则会计算整个样本的丰度百分比。

批次间的可比性

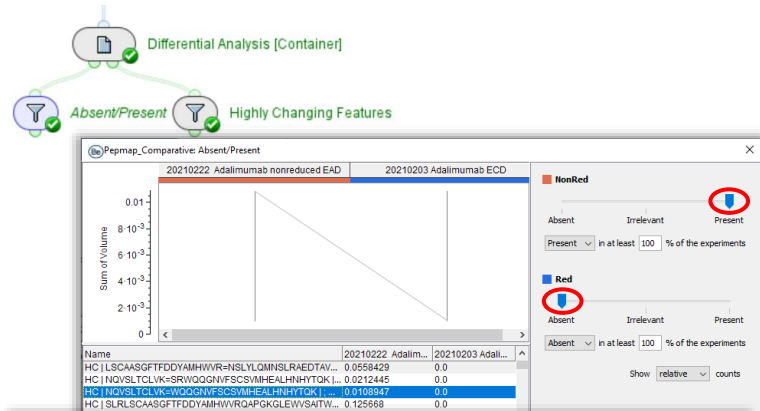


DSB 分析

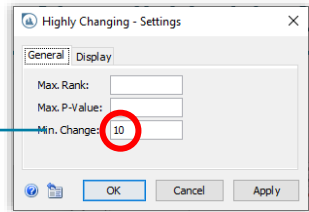
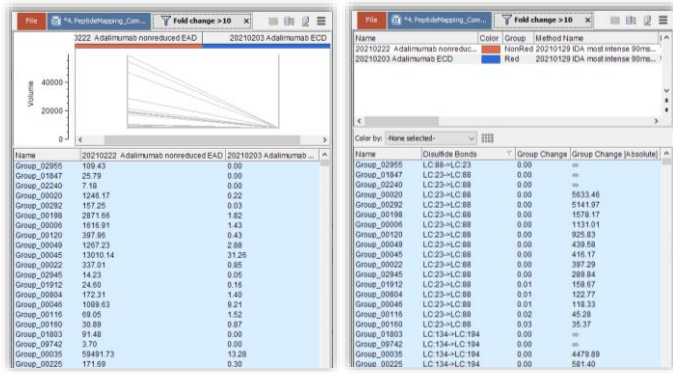
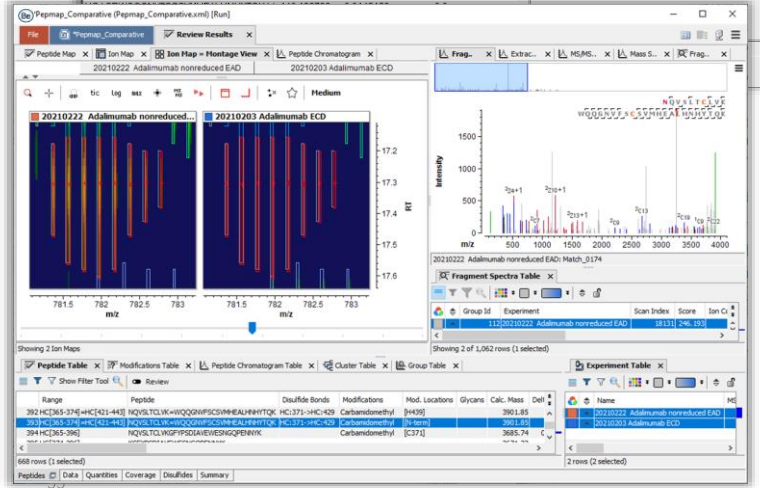
Name	20210222 Adalimumab non...	20210203 Adalimuma...
HC DTLMISR	78.46	70.35
HC DTLMISR (-18_01052015889502) [T2]	8.62	10.19
HC DTLMISR (-48_00280214761824) [M4]	10.89	4.93
HC DTLMISR Carbamidomethyl [I]	0.53	1.33
HC DTLMISR Oxidation [M4]	1.51	13.20



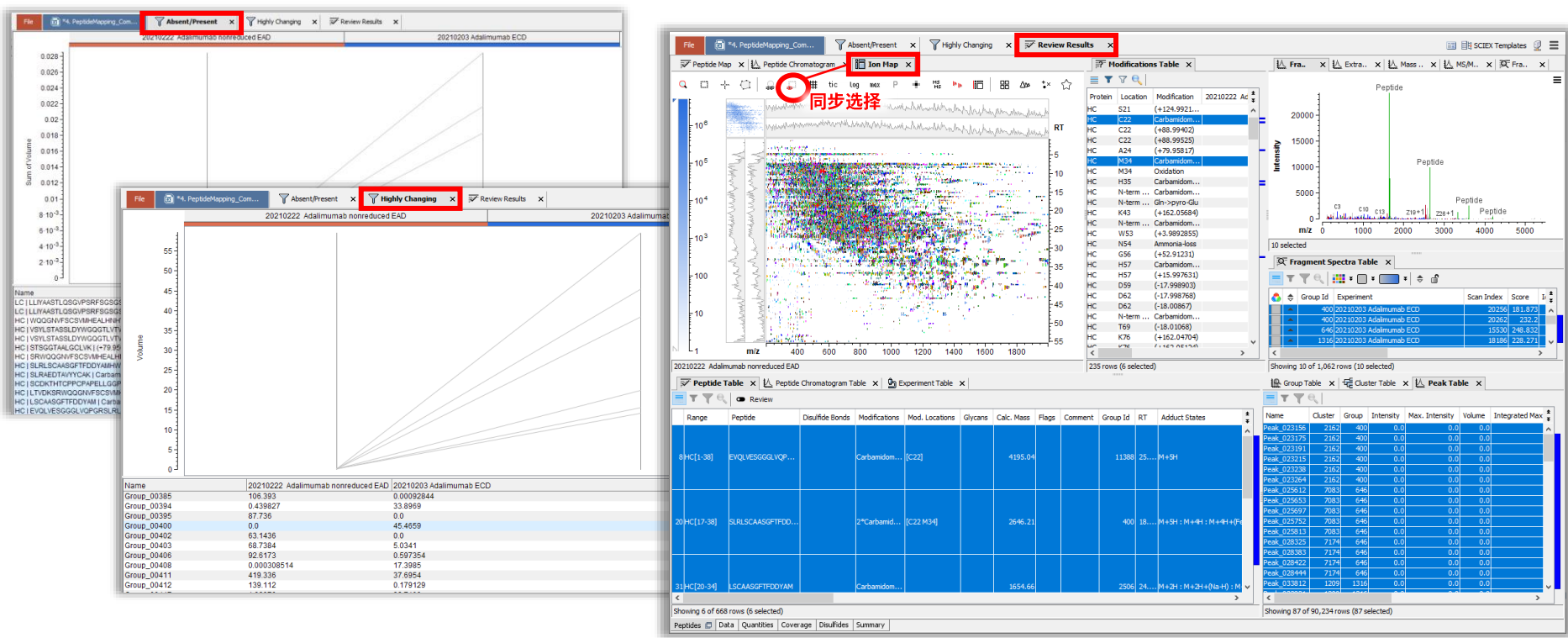
全新和高度变化的特征检测



- Absent/Present 活动节点可以促进新的峰检测 (NPD)。
 - 在活动节点运行时打开的输入窗口中也使用了滑块。
 - 移动这些滑块即可筛选结果。例如，对于 DSB 分析，预期特征在还原样本中预计为 **Absent**，而在非还原样本中为 **Present**。
- 对于 Highly Changing Features，必须在活动节点设置中设置所需的最小倍数变化。



简化数据审核的同步选择



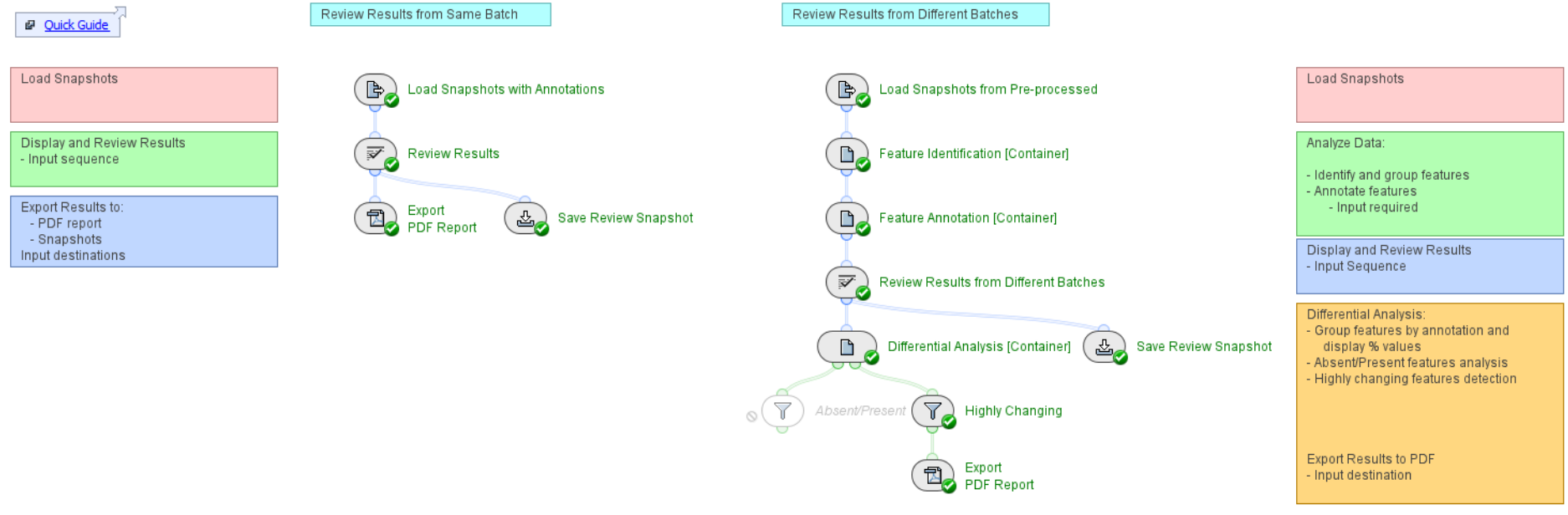
打开所有三个窗口，并激活 *Review Results* 中的 **Synchronize selection** 以进行动态链接。

审核存储的结果

工作流程特定指南

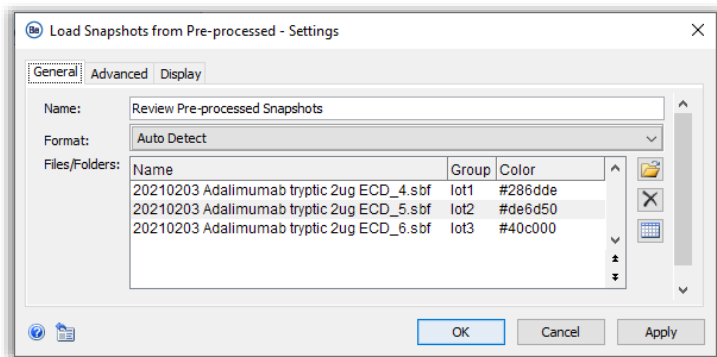


审核肽图分析快照工作流程：设计

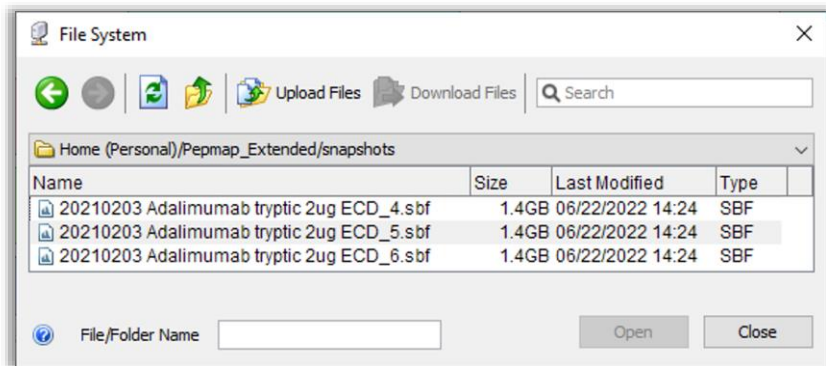


Pepmap_ReviewSnapshots

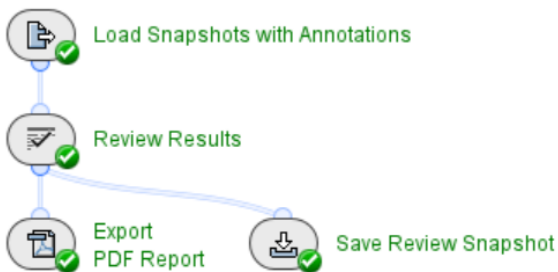
审核同一批次的结果



- 当在其他肽图分析工作流程中分析多个样本时，每个样本都会生成自己的 sbf 文件。
- 将已保存的快照加载到 Pepmap_ReviewSnapshots 工作流程中时，选择父文件夹中的所有单个 sbf 文件。
 - 如已选择父文件夹，将不会加载数据。

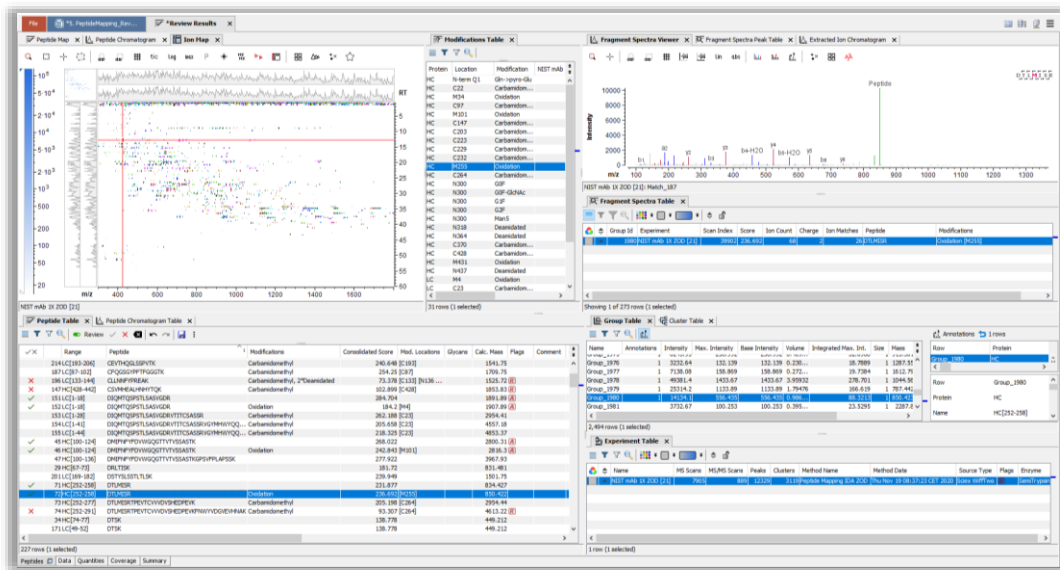


审核同一批次的结果

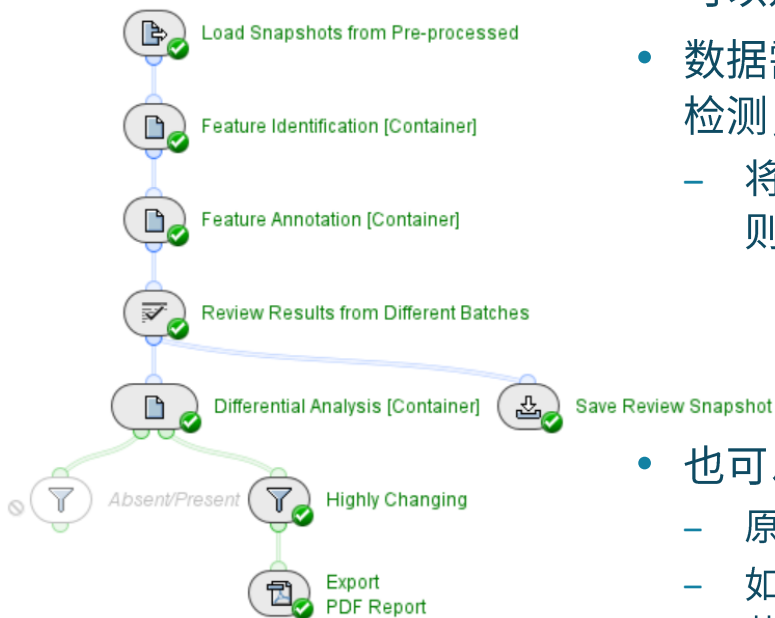


- 使用此工作流程查看此前一起分析过且带有肽标注的样本结果。

- Review Results* 活动节点会打开先前分析的副本，包括以前接受和拒绝的在 **Flags** 列中有相关条目的任何肽。
- 然后可以进行其他审核，必要时还可以保存已审核的快照。



审核不同批次的结果



- 可以对来自不同分析的数据独立进行预处理，然后再合并快照。
- 数据需要进行包括 *RT Alignment* 和共有 *Peak Detection* 的特征检测，然后进入 *Peptide Mapping* 活动节点以进行特征标注。
 - 将 *Pre-processed Snapshots* 用于处理同一批次的数据时，则可跳过 *RT Alignment* 活动节点。
- 也可以对不同的样本组进行比较。
 - 原始工作流程中定义的组将被保留。
 - 如果之前未定义组，则可以在 *Load Snapshots* 或 *Data Setup* 活动节点中进行定义。



The Power of Precision

详情请访问 SCIEX 网站 sciex.com,
或通过以下方式之一联系我们:

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



商标/许可

SCIEX 临床诊断组合是用于体外诊断。仅凭处方销售。产品并非所有国家均可获得。如需了解更多供货信息，请咨询当地的销售代表或访问 <https://sciex.com/diagnostics>。所有其他产品仅供研究使用。请勿用于诊断程序。

本文件提及的商标和/或注册商标（包括相关徽标）属于 AB Sciex Pte.Ltd. 或其各自所有者在美国和/或其他某些国家/地区的财产（请参阅 sciex.com/trademarks）。

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