Skyline iRT 保留时间预测

长久以来，预测肽保留时间一直是靶向蛋白质组学研究感兴趣的内容。早在 0.2 版时，Skyline 就针对其未修饰的序列将 SSRCale 疏水性计算1 整合为一种预测肽保留时间的方法，如“[靶向方法优化](https://skyline.gs.washington.edu/labkey/wiki/home/software/Skyline/page.view?name=tutorial_method_refine)”教程所述。到了 0.5 版，Skyline 即已支持靶向实验预定采集中最先进的内容。“[靶向方法优化](https://skyline.gs.washington.edu/labkey/wiki/home/software/Skyline/page.view?name=tutorial_method_refine)”教程也对这种技术进行了介绍，包括首先测定您将用于多次重复测定实验系统上的所有未预定的靶向肽。只要无需色谱变化，未预定的注射的保留时间均用于安排所有后续采集。

未预定测定技术有一项缺点，即无论质谱图何时发生变化，无论该变化是否归因于实验室内的方法共享、单个实验室中使用多种工具，甚至实验中单个仪器发生列变化，都需要为每种预定方法运行多种潜在质量规格。在一次 MacCos 实验室实验中，在 45 次以上的重复测定过程中，需要进行 5 次未预定运行才能为单一方法采集安排 780 个离子对。NCI-CPTAC 验证工作组最近进行的一项研究表明，需要 6 次未预定运行才能为 150-200 次注射实验中的单一方法采集安排 750 个离子对。这项研究涉及跨 11 个实验室的 14 种仪器，以及需要一些实验室发生列变化的足够注射。显然，如果一项技术允许存储先前测定的肽保留时间，在仅需进行单一的校准后即可将其用于跨实验室、跨仪器甚至跨梯度变化重复使用，则这将极大地简化靶向实验中所用预定方法的产生。

更准确的保留时间预测也使预测的保留时间得以成为一种更强大的峰标识验证工具。例如，如果离平均值的 2 个标准偏差为 5 分钟，则相比之下，标准偏差为 1 分钟时将会有更多可信的候选峰值。

Skyline 1.2 版支持 iRT 标准2，该标准由我们的合作者在 Biognosys (<http://www.biognosys.ch/>) 提出，可实现高预测精度和保留时间可移植性。在本教程中，您将把在 30 分钟梯度基础上凭经验测定的保留时间存储为 iRT 值，然后使用这些值为 90 分钟梯度安排靶向方法。您还将了解借助于 iRT 减少保留时间错误如何能够提高峰值鉴别的可靠性。此外，您还将会把通过数据依赖型采集 (DDA) 实验构建的谱图库中的肽保留时间转化为 iRT 值，同样，可以通过一次校准注射即可将该值直接用于从发现实验安排靶向实验。

# 入门指南

如要开始本教程，请下载下列 ZIP 文件：

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

将其中的文件解压到您的电脑文件夹，如：

C:\Users\brendanx\Documents

这将创建一个新文件夹：

C:\Users\brendanx\Documents\iRT

其中包含本教程所需的所有文件。通过在 Windows Explorer 中双击此文件夹中的“iRT-C18 Standard.sky”文件，或通过单击 Skyline “文件”菜单中的“打开”，均可打开该文件。

# 校准 iRT 计算器

虽然在本教程中，您将使用 Biognosys 肽标准配合 (<http://www.biognosys.ch/products/rt-kit.html>) 处理 Biognosys 定义的 iRT-C18 标准，但 iRT 本身是一项通用概念，适用于能够使用任何标准肽集轻松测定的所有肽，并涵盖大多数梯度。更改已打开的文档之前，单击“文件”菜单中的“另存为”，并将新副本保存至 iRT 文件夹中，文件名为“iRT-C18 Calibration.sky”。

此时，若要开始本教程，正如您已在自己的仪器上测量所需的标准肽，请通过执行以下操作来准备校准新的 iRT 计算器：

* 在“文件”菜单上，选择“导入”并单击“结果”。
* 单击“导入结果”表单中的“确定”按钮。
* 选择您为本教程创建的 iRT 文件夹中列示的前两个 .raw 文件。
  + A\_D110907\_SiRT\_HELA\_11\_nsMRM\_150selected\_1\_30min-5-35.raw
  + A\_D110907\_SiRT\_HELA\_11\_nsMRM\_150selected\_2\_30min-5-35.raw
* 单击“打开”按钮。
* Skyline 要求删除公共前缀时，单击“删除”按钮。
* 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“肽段比较”(Ctrl-F8)。

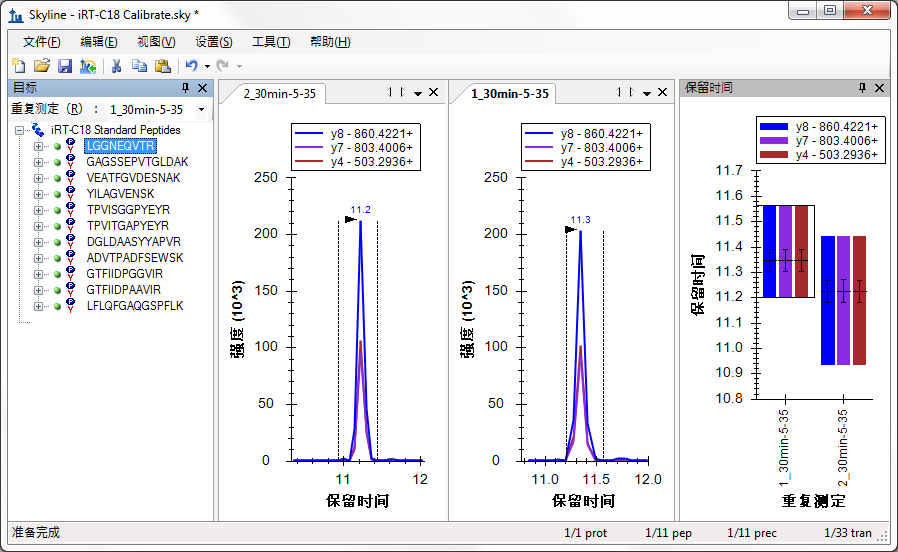
此时 Skyline 将呈现显示如下图形的“保留时间”视图：



为您呈现在 30 分钟的平均梯度条件下，洗脱每个肽时的顶层视图。通过执行以下操作来继续查看数据：

* 在“视图”菜单上，选择“保留时间”并单击“重复测定比较”。
* 通过单击“保留时间”视图标题栏，将“保留时间”视图拖至 Skyline 窗口的边缘，直到鼠标光标位于图标内侧，右侧边缘附近，如图所示：  
  
* 选择文档中的首个肽 LGGNEQVTR。

此时，Skyline 将显示如下：

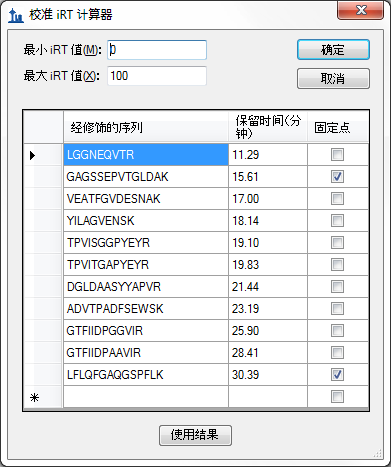


使用向下箭头键分别查看 Biognosys 标准配合中的 11 个肽，确保整合正确无误，并且两个重复测定均在相似的保留时间显示整合峰值。自动整合非常适用于这些肽，您将无需执行任何手动更改。本教程仅包括两种重复测定。如果您已亲自实际校准新的 iRT 计算器，则可能需要使用更大的数字以改善对肽平均保留时间的估计。要求 Skyline“使用结果”校准保留时间计算器时，将使用每个肽测定的平均值，这些值作为肽的真正保留时间的估计值，其精度与测量次数的平方根呈正比。

验证校准数据的质量之后，执行以下步骤，创建新的 iRT 计算器并对其进行校准：

* 在“设置”菜单上，单击“肽段设置”。
* 单击“预测”标签。
* 单击（“保留时间计算器”）按钮，并单击所示菜单中的“添加”。
* 在“编辑 iRT 计算器”表单中的“名称”字段中，输入“iRT-C18”。
* 单击“创建”按钮。
* 在“创建 iRT 数据库”表单中，导航至您为本教程创建的 iRT 文件夹（如有需要）。
* 在“文件名”字段中，输入“iRT-C18”。
* 单击“保存”按钮。
* 单击“编辑 iRT 计算器”表单中的“校准”按钮。
* 单击“校准 iRT 计算器”表单中的“使用结果”按钮。
* 选中肽 GAGSSEPVTGLDAK 所在行中的“固定点”复选框。

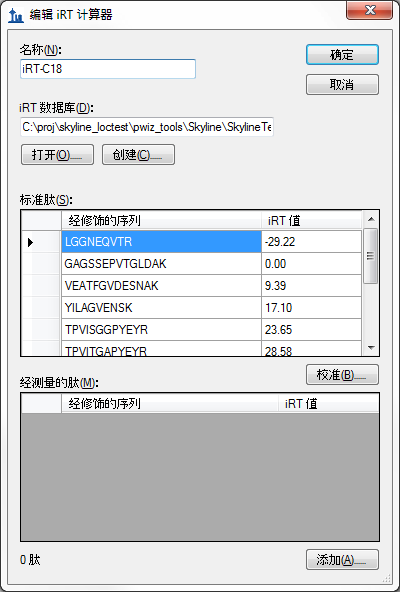
此时，“校准 iRT 计算器”表单将显示如下：



* 单击“确定”按钮。

注意：这仅是 Biognosys 定义 iRT-C18 尺度的方式。如果您定义了自己的尺度，则可以将固定点保留为第一个和最后一个洗脱肽，或使用您所选的其他任意肽。固定点和尺度的选择具有一定的随意性。相对保留时间尺度，您可定义任何独立时间，然后在其中映射 iRT 值的剩余部分。

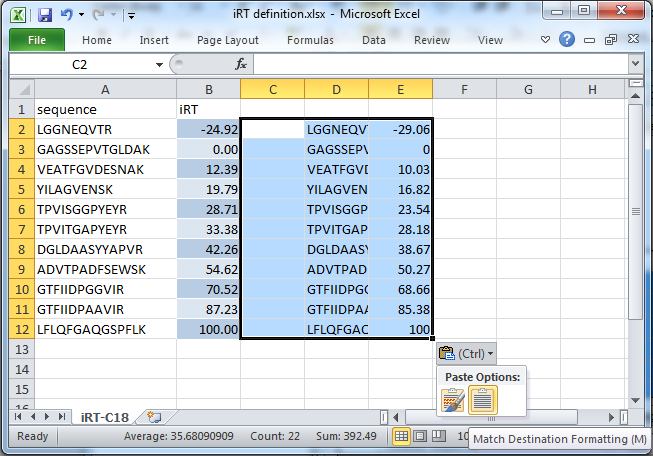
此时，“编辑 iRT 计算器”表单将显示如下：



就是这样。您已借助测定数据校准了新的 iRT 计算器。然而在这种情况下，Biognosys 团队已大概使用 2 次以上重复测定，校准其标准配合。因此，在本教程中，您只需将此校准更换为规范校准，但首先要通过执行以下步骤了解两者之间的关联程度：

* 单击“标准肽”网格。
* 按下 Ctrl-A 选择所有行。
* 按下 Ctrl-C 复制选定单元格中的文本。
* 在 Windows Explorer 中，导航至您为本教程创建的 iRT 文件夹。
* 双击 iRT 文件夹中的“iRT definition.xlsx”文件。
* 选择电子表格中的单元格 C2。
* 按下 Ctrl-V 粘贴复制的单元格。
* 按下 Ctrl 键并释放，然后按下 M 键以匹配目标格式。

此时，电子表格将显示如下：



正如您所看到的那样，新计算出的 iRT 值相当接近定义值，但您应使用定义中提供的值得出最佳结果。如要实现此目的，请执行下列步骤：

* 选择 Excel 中的 A2 到 B12 单元格。
* 按下 Ctrl-C 复制这些单元格。
* 切换回“编辑 iRT 计算器”表单。
* 按下 Ctrl-V 粘贴定义值。

您将看到将肽更改为定义值的可视变化的次数。

* 单击“编辑 iRT 计算器”表单中的“确定”按钮。
* 单击“肽段设置”表单中的“确定”按钮。

要查看定义值和测定肽之间的相关性，请执行下列步骤：

* 双击“保留时间”视图的标题栏，将其移除。
* 在“视图”菜单中，选择“保留时间”并单击“线性回归”(Shift-F8)。

Skyline 将显示如下图形：



在图形的左上角，可见 Pearson 相关系数为 0.9991。如果您未在 x 轴下方看到 iRT-C18，则需要执行下列操作：

* 右键单击“保留时间”图形，选择“计算器”并单击“iRT-C18”。

如果您要分别查看两个已导入重复测定的回归图，请执行下列操作：

* 右键单击“保留时间”图形，选择“重复测定”并单击“单一”。

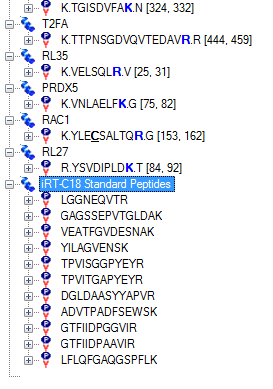
此时，如果单击两个重复测定的色谱图图形，将看到截距值从 1\_30min-5-35 时的 15.15 变为 2\_30min-5-35 时的 15.04。差异非常微小，但您会发现您需要通过更加复杂的数据集执行这类审查。

# 为新的靶向肽添加 iRT 值

您现在已经拥有完全校准的 iRT-C18 计算器，但如果没有除标准以外的任何肽的 iRT 值，则对您用处不大。在此部分，您将根据从 SRM 实验得出的实验结果，把首个目标肽添加至计算器。开始处理新肽之前，保存当前文件，然后执行下列步骤创建允许您计算新目标肽 iRT 值的文档：

* 在“文件”菜单，单击“打开”。
* 双击您创建的 iRT 文件夹中的“iRT Human.sky”文件。
* 按下 END 键选择位于“肽视图”底部的插入元素。
* 在“文件”菜单，选择“导入”并单击“文档”。
* 双击“iRT-C18 Standard.sky”文件。
* 如果遗漏上述步骤，并将结果保存至此文档，则 Skyline 可能询问对这些结果采取什么操作。在这种情况下，您应选择“删除结果信息”并单击“确定”按钮。
* 向下滚动查看并确认“iRT-C18 标准肽”列表已添加至文档末端。

“肽视图”将显示如下：



将此文档另存为“iRT Human+Standard.sky”，然后再次将其另存为“iRT Human+Standard Calibrate.sky”。

## 创建 iRA 采集方法

如果您在自己的仪器上收集了数据以计算新的 iRT 值，则需要采集该数据的仪器方法。通过查看 Skyline 窗口的右下角，您将看到此文档当前包含 1231 个离子对，对其进行未预定的测定可能需要几次注射，但您可利用以下两个事实，从而使其更易管理：

1. 文档已经过设置，用于测定稳定同位素标记的参考肽。
2. 您只对保留时间值感兴趣，对定量测定并不感兴趣。

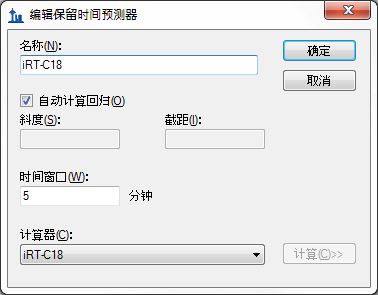
要将离子对数量几乎减半，请执行下列步骤以删除此文档中的重母离子：

* 在“编辑”菜单中，选择“调整”并单击“高级”。
* 在“删除标记类型”字段中，选择“heavy”。
* 单击“确定”按钮。

您将看到离子对数量减少至 632。导出测定这些新肽保留时间的方法之前，需要说明正在使用新的 iRT-C18 计算器，以便 Skyline 知道将标准肽的离子对包括在所有方法之内。您也可以通过执行下列步骤执行此操作：

* 在“设置”菜单上，单击“肽段设置”。
* 单击“预测”标签（如果其尚未处于活动状态）。
* 在“保留时间预测器”字段中，选择“<添加……>”。
* 在“编辑保留时间预测器”表单的“名称”字段中，输入“iRT-C18”。
* 在“计算器”字段中，选择新的计算器“iRT-C18”。
* 选中“自动计算回归”复选框。
* 在“时间窗口”字段中，输入“5”。

表单将显示如下：

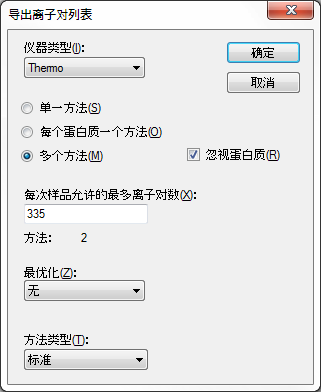


* 单击“确定”按钮。
* 确保“保留时间预测器”字段包含新的预测器“iRT-C18”。
* 单击“肽段设置”表单上的“确定”按钮。

要导出未预定的离子对列表以测定新的目标肽，请执行下列步骤：

* 在“文件”菜单中，选择“导出”并单击“离子对列表”。
* 单击“多个方法”选项。
* 选中“忽视蛋白质”复选框。
* 在“每次样品允许的最多离子对数”字段，输入“335”。

此时，“导出离子对列表”表单将显示如下：



* 单击“确定”按钮。
* 在“导出离子对列表”保存表单的“文件名”字段中，输入“iRT Human+Standard Calibrate”。
* 单击“保存”按钮。

您刚刚借助两者均包括的 Biognosys 标准配合中的肽生成了两个用于测定新目标肽的离子对列表，以便为目标肽计算新的 iRT 值。重要的是，将根据每次注射对标准进行测定，且 Skyline 将自动为您处理此问题，即使每次重复测定过程中预定方法涉及多种注射。

在自己的实验中，您可以选择直接导出至仪器方法，从而避免必须手动加载离子对列表。您还可能需要选择更小的最大离子对级别。的确，您所寻求的不过是足以为您提供有效保留时间测定的可识别峰值，但 335 的计数已经具有很好的说服力。生成此数据的 Biognosys 团队非常熟悉这些目标肽。如本教程介绍中提到的实验使用的情况一样，此任务的更常见的值可能为 100 到 150。

通过 Excel 打开生成的 CSV 文件“iRT Human+Standard Calibrate\_0001.csv”和“iRT Human+Standard Calibrate\_0002.csv”，您将看到适用于 Thermo TSQ 仪器的正态离子对列表。在每个文件的底部，您将看到用于测定 iRT 计算器中所示标准肽的离子对。

## 导入并审核数据

本教程文件夹包括具有如刚创建的离子对列表采集数据的文件。实际上，您已在本教程的 iRT 校准部分导入这些文件。您只需选择忽视人类肽的色谱图。要将文件导入当前文档，请执行下列步骤：

* 在“文件”菜单上，选择“导入”并单击“结果”。
* 单击“添加一个新的重复测定”选项。
* 单击“导入结果”表单中的“确定”按钮。
* 选择您为本教程创建的 iRT 文件夹中列示的前两个 .raw 文件。
  + A\_D110907\_SiRT\_HELA\_11\_nsMRM\_150selected\_1\_30min-5-35.raw
  + A\_D110907\_SiRT\_HELA\_11\_nsMRM\_150selected\_2\_30min-5-35.raw
* 单击“打开”按钮。

要查看 iRT-C18 计算器如何为这些新肽计算分数，请执行下列步骤：

* 在之前移除并设为显示线性回归的“保留时间”图形中，单击右键，选择“计算器”并单击“iRT-C18”。

完成数据导入之后，您将看到如下图形：



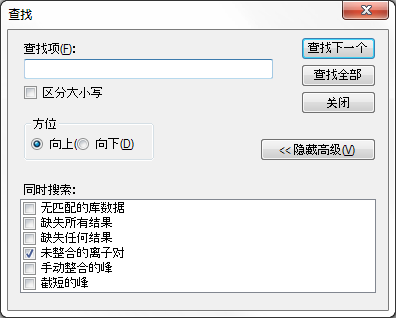
图形左侧的紫色点群表示这些肽尚无经校准的 iRT 值。 然而，计算 iRT 值之前，最好对峰值整合进行审查。如果您真正希望对自己的 iRT 值进行校准，则需要非常仔细地对所有肽执行此操作。

您可能需要首先使用这些未预定的注射创建可在多个重复测定中测定的预定方法，以在将其转化为 iRT 之前提高平均保留时间的估计值。在只进行单一测定的情况下，基本统计数据显示，平均 5% 的肽所具有的标准偏差将为其平均偏差的两倍。

然而，在本教程中，您将只能使用单一测定，并对整合仅执行粗略检查。要审查 Skyline 在其中发现整合问题的肽，请执行下列步骤：

* 在“编辑”菜单，单击“查找”(Ctrl-F)。
* 确保“查找项”字段清晰明了。
* 单击“显示高级”按钮。
* 在“同时搜索”列表，选中“未整合的离子对”复选框。

“查找”表单将显示如下：



* 单击“查找全部”按钮。
* 单击“关闭”按钮。

在 Skyline 窗口底部，您将看到“查找结果”视图，显示 8 个未整合的离子对：



要审查包含这些峰值的肽，请执行下列操作：

* 在“视图”菜单，选择“离子对”并单击“全部”(Shift-F10)。
* 在“视图”菜单，选择“自动缩放”并单击“最佳峰值”(F11)。
* 双击“查找结果”视图中的每一行。

您将看到若干具有干扰的离子对，且其信号低于最强离子对的 1%（按区域）。

Skyline 将排除这类离子对，从而帮助您确定保留哪些离子对用于最终定量方法。但是，如果您已做出该决定，最好强制 Skyline 连续合并所有包含的离子对。为此，请进行下列改变：

* 在“设置”菜单，单击“全部合并”。

## 计算 iRT 值

此时若要计算本文档中目标肽的 iRT 值，请执行下列步骤：

* 右键单击“保留时间”视图中的线性回归图，选择“计算器”并单击“编辑当前”。
* “编辑 iRT 计算器”表单中现在显示 iRT-C18 计算器，单击“添加”按钮，并单击按钮下方显示菜单中的“添加结果”。

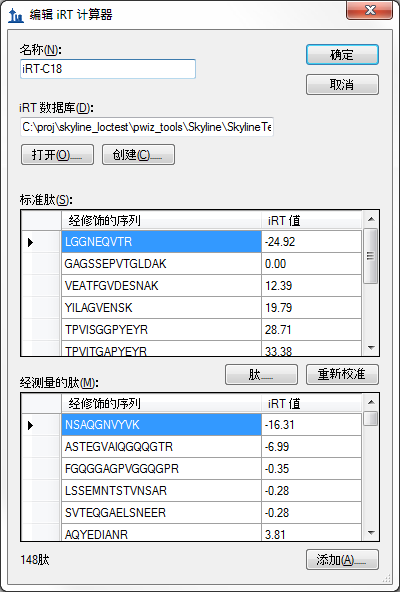
Skyline 将显示以下消息：



请注意，在为两次运行生成 iRT 值时，Skyline 已为每次运行分别执行了线性回归。它使用每次运行的线性回归计算该运行中肽的 iRT 值。如果多次运行包含相同的肽，则 Skyline 将采用这些最终计算所得 iRT 值的平均值。这与始于计算物理保留时间平均值大不相同，并允许跨多次运行出现梯度变化。

* 单击“确定”按钮。

此时，“编辑 iRT 计算器”表单将显示如下：



* 单击“确定”按钮。

“保留时间”视图将发生变化并显示如下：



您刚刚使用在 30 分钟梯度基础上采集的数据校准了 147 个新人类肽的 iRT-C18 值。

# 使用 iRT 安排新采集

接下来，您将探索 iRT 如何让您能够通过现有方法进行新的色谱设置，甚至更改梯度长度，并在仅运行一次校准之后通过相对较短的时间窗口开始预定采集。

如果您在自己的实验室执行此操作，则需要打开原始“iRT Standard.sky”文件，为其导出方法，然后通过注入的标准配合在充分配制的样品上采集该方法。本教程文件夹包含严格按照这种方法创建的原始数据文件。尽管仅对标准肽进行了测定，但以上测定的相同样品会注入质谱仪（包括一个新列和 90 分钟梯度）。

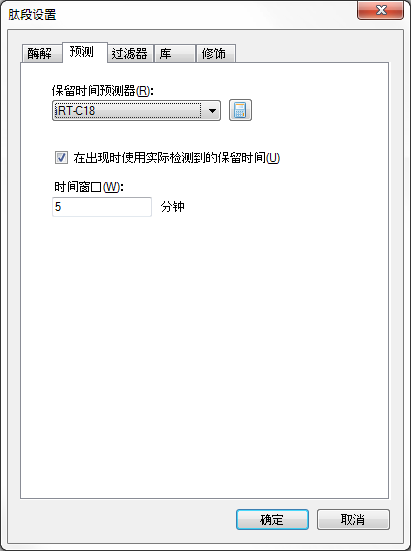
继续之前，请执行下列操作：

* 在“文件”菜单中，单击“保存”(Ctrl-S)。
* 关闭“查找结果”视图。

要重新校准为新列和 90 分钟梯度创建的方法，请执行下列操作：

* 在“文件”菜单，单击之前保存的“iRT Human+Standard.sky”文件 (Alt-F, 2)。
* 在“编辑”菜单中，单击“查找”(Ctrl-F)。
* 单击“隐藏高级”按钮。
* 在“查找项”字段，输入“NSAQ”。
* 单击“查找下一个”按钮。
* 单击“关闭”按钮。
* 按下 Delete 键删除您在另一个文档中删除的肽。
* 在“设置”菜单上，单击“肽段设置”。
* 单击“预测”标签。
* 在“保留时间预测器”下拉列表中，选择您创建的“iRT-C18”预测器。
* 选中“在出现时使用实际检测到的保留时间”复选框。
* 在“时间窗口”字段中，输入“5”。

“肽段设置”表单将显示如下：



* 单击“确定”按钮。
* 在“文件”菜单上，选择“导入”并单击“结果”。
* 单击“导入结果”表单中的“确定”按钮。
* 双击您为本教程创建的 iRT 文件夹中的“A\_D110913\_SiRT\_HELA\_11\_nsMRM\_150selected\_90min-5-40\_TRID2215\_01.raw”文件。

完成数据导入后，“保留时间”回归图将显示如下：



您可看到此时标准肽的时间范围约介于 15 至 65 分钟之间，此次运行中未对目标肽进行测定。然而，此时您已准备在这一新梯度上对其进行测定。

# 使用 iRT 预测器导出预定方法

创建预定方法之前，您可以通过执行以下操作，更好地了解如何通过潜在预定参数对离子对进行测定：

* 在“视图”菜单，选择“保留时间”并单击“时序安排”。

“保留时间”视图将发生变化并显示类似于下图的图形：



如果您未在上述图形中看到所有三条线，则可执行下列操作：

* 右键单击图形，并单击“属性”。
* 在“时序安排图形属性”的“时窗”字段，输入“2, 5, 10”。
* 单击“确定”按钮。

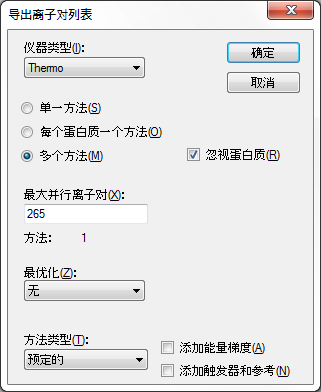
从此图可以看到窗口尺寸对于时序安排的影响。时间窗口越小，则在给定时间内允许同时测定的离子对越少，这使得能够在特定驻留时间内，对单一注射中的更多离子对进行测定。捕获一定百分比目标肽整个峰值所需的窗口尺寸近似函数如下：

其中“z”为标准偏差数量的临界值，其中所需百分比降至正态分布，例如，95% = 1.96。由于预测较为完美且峰值宽度或保留时间无差异，所需窗口大小正好为峰值宽度。即使预测较为完美，峰值宽度和保留时间的差异仍超过了所需窗口大小。最终，预测错误将进一步将其扩展。值得注意的是，即使预测保留时间采用的是最先进方法，但预定采集之前在目标系统上进行的单一不定期测定并不完善。自此您将尝试预测平均保留时间；该单一测定中，约 5% 的肽的标准偏差至少为其平均偏差的两倍。

iRT 方法允许在 90 分钟梯度基础上，在 5 分钟窗口内对本教程中的目标肽进行测定。上图表示可在单一循环中所测定离子对不超过 260 的情况下完成此操作。 在 10 毫秒的驻留时间内，最多将产生 2.6 秒的循环时间。要创建使用预定采集在这一新梯度上测定本文档中 1223 个离子对的单一方法，请执行下列步骤：

* 在“文件”菜单中，选择“导出”并单击“离子对列表”。
* 在“方法类型”字段中，选择下拉列表中的“预定的”。
* 在“最大并行离子对”字段中，输入“260”。

“导出离子对列表”表单将显示如下：



您也可简单地选择“单一方法”选项，但表单实际显示“方法：1”，确认可借助 5 分钟窗口在单一注射中测定离子对，并且任何时间测定的并行离子对数量均不会超过 260。对于定量测定而言，这可能仍然稍微偏高，但却好于 2 次注射中所需测定离子对数量的一半 335。您还可以根据自己的喜好将此数字降至 130，您将看到 Skyline 显示实现这个目标需要进行两次注射；如果需要将此数字降至 90，则显示需要进行 3 次注射。但是，继续之前，需确保将此数字恢复为 260。

* 单击“确定”按钮。
* 在“文件名”字段，输入“iRT Human+Standard”。
* 单击“保存”按钮。

在 Windows Explorer 中，您将发现此操作将在 iRT 文件夹中为本教程创建“iRT Human+Standard\_0001.csv”文件。在 Excel 中，您将发现此文件包含全部 1223 个离子对，预定起始和终止时间间隔为 5 分钟。

# 审查预定数据

要审查采用刚刚创建的方法采集的数据，首先通过执行下列操作删除 90 分钟梯度校准数据：

* 在“编辑”菜单上，单击“管理结果”(Ctrl-R)。
* 单击“删除所有”按钮。
* 单击“确定”按钮。

此时，通过执行下列操作使用 iRT 导入通过预定方法采集的数据：

* 在“文件”菜单中，选择“导入”并单击“结果”。
* 单击“导入结果”表单上的“确定”按钮。
* 双击本教程 iRT 文件夹中的“A\_D110913\_SiRT\_HELA\_11\_sMRM\_150selected\_90min-5-40\_SIMPLE.raw”文件。

加载数据时，您可通过执行下列操作将“保留时间”视图切换回“线性回归”：

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

数据加载完成后，“保留时间”视图将显示如下：



从此图形中，显而易见有 6 个异常肽，可能的原因有当前数据中的峰值整合遗漏，或用于计算 iRT 值的校准数据中的峰值整合遗漏。在这种情况下，存在问题的是 iRT 在 30 分钟梯度校准期间，Skyline 自动选择的峰值。您正在查看的数据实际并非通过上述生成的预定方法所收集，了解这一点非常重要。如果是根据上述生成预定方法收集，则异常肽的色谱图几乎不包括此处检测到的峰值。此数据是在更加彻底地审查校准数据（本教程跳过）之后，通过创建的预定方法收集的。

如果您想知道图例中的“异常值”为何只有一个异常点实际显示为紫色，这是因为所设置的相关系数阈值尚不适用于相关性如此高的计算器。您可执行下列操作，更改相关性阈值：

* 右键单击“保留时间”图形，并单击“设置阈值”。
* 在“阈值”字段，输入“0.998”。
* 单击“确定”按钮。

此时，“保留时间”图形将显示如下：



现在您可单击每个异常点，使 Skyline 在肽视图中对其进行选择。然后，按下 Esc 恢复主窗口，并按下 Ctrl-C 复制肽标记。您也可将这些内容收集到单独的编辑器中，供以后审查使用，或者在之前创建的“iRT Human+Standard Calibrate.sky”文件上打开另一个 Skyline 实例。然后，您可使用“查找”表单审查这两个肽：

EVVEEAENGR  
LLADQAEAR

在这两种情况下，很难在校准数据中看到能够明确确认为重要肽的内容。这也说明了为何校准运行过程中，您应该尽可能小心。

现在您可根据这些更准确的数据重新计算本文档中所有肽的 iRT 值，这些数据使用标记的参考肽以确保选择正确的峰值。重复上述校准步骤，如有要求，选择“替换现有值”。然而在本教程中，您可通过执行下列步骤除去校准不正确的肽：

* 右键单击“保留时间”图形，单击“删除异常值”。

将删除图形中的 6 个异常值，肽数量应减去 2，降至 156。



请注意，上图中名为“预测器”的线性方程为 Skyline 使用本文档中标准肽的测定时间回归除以其 iRT 值自动计算得出，如选中“编辑保留时间预测器”表单中的“自动计算回归”复选框后直接执行的操作一样。

现在单击肽视图，并使用向下箭头键审查肽色谱图。 Skyline 将显示如下图形：

****

您将看到除标准肽以外的所有肽都具有轻母离子对和重母离子对，并且每个峰值通常比未预定数据具有更多的点。您还将看到 Skyline 在注释标记“预测”下方显示了峰值的预测时间。

在这种情况下，数据源自单一注射，但是，因为“自动计算回归”设置，Skyline 将为每次注射（甚至需要多个预定注射才能测定其所有肽的文档）分别计算回归，如果您要确保量化更加精确，则可采用此方法。在为此类文档导出方法时，Skyline 将包括用于每种方法标准肽的离子对。这种自动回归功能可确保比针对所有注射只计算一个线性方程所得的保留时间预测更加精确，这样做会使“预测”注释成为更加强大的肽身份验证工具。

# 根据 MS/MS 谱图计算 iRT 值

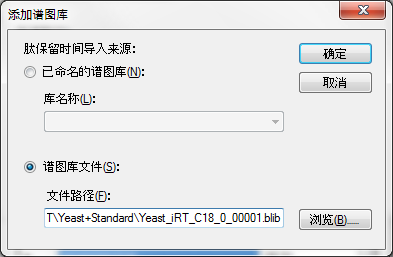
如果您收集数据独立型采集 (DDA) 运行，其中包括用于 iRT 计算器的标准肽，密度足够高，支持稳定采样和验证，则可以使用产生的数据，通过跟 SRM 数据几乎相同的处理方式计算 iRT 值。这些 iRT 值平均精确度较低，因为其依据是肽洗脱峰值上随处可能发生的扫描时间值。然而基于扫描的 iRT 值可用于直接从 DDA 发现实验转换为预定 SRM，节省大量仪器时间。

在本教程的 iRT 文件夹中，您将发现包含谱图库“Yeast\_iRT\_C18\_0\_00001.blib”的子文件夹“Yeast+Standard”。此谱图库根据酵母分解物的两个 DDA 运行上的 SEQUEST 肽搜索结果而建立，添加了 Biognosys RT 标准配合。 如下所示，只要 iRT 数据库中的肽足够多，则导入的数据中将不一定需要包括标准肽。然而，您将需要使用 Skyline 建立的 BiblioSpec 库格式。其他格式不会分别维持每个质量规格运行的保留时间，因此无法通过相同的色谱法在保留时间集合上执行回归。

您可通过执行下列操作在此库中添加用于肽谱图匹配的 iRT 值：

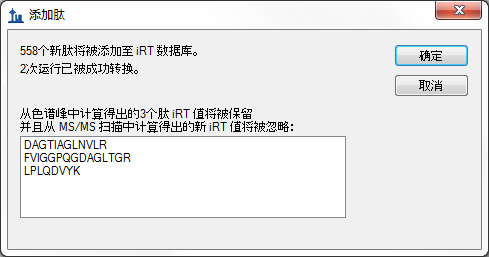
* 右键单击“保留时间”图，选择“计算器”并单击“编辑当前”。
* 单击“编辑 iRT 计算器”表单中的“添加”按钮，并单击“添加谱图库”。
* 单击“添加谱图库”表单中的“谱图库文件”选项。
* 单击“浏览”按钮。
* 双击“iRT”文件夹中的“Yeast+Standard”子文件夹。
* 双击“Yeast\_iRT\_C18\_0\_00001.blib”文件。

“添加谱图库”表单将显示如下：



* 单击“确定”按钮。

Skyline 将显示如下表单：



该表单显示 Skyline 可以为库中的两个 DDA 运行计算有效回归。已使用这些回归为 558 个新肽计算 iRT 值。此外，将使用其回归计算的线性转换为每次运行分别计算 iRT 值。两次运行中出现的肽将产生两个 iRT 值，然后计算这两个值的平均值。Skyline 还发现 3 个已根据色谱峰获取 iRT 值的肽，因此将跳过。

* 单击“确定”按钮。

此时，“编辑 iRT 计算器”表单将显示“经测量的肽”列表中有 705 个肽。

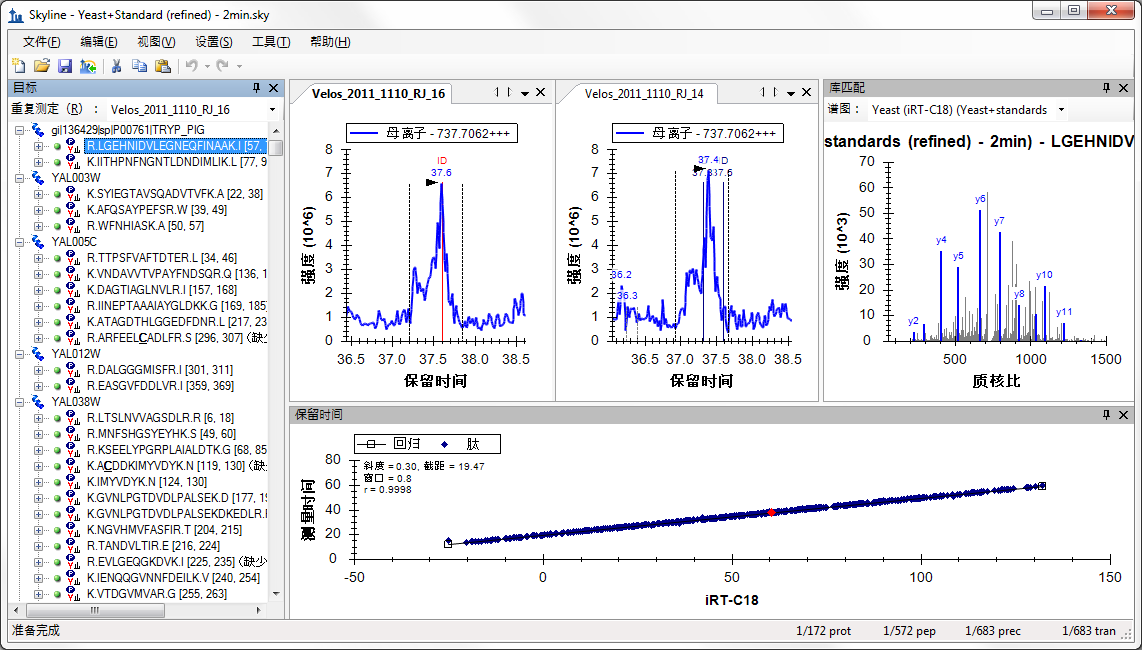
* 单击“确定”按钮。

# 将 MS/MS 扫描时间转换为色谱峰时间

现在您可使用刚刚根据 MS/MS 扫描时间计算所得的 iRT 值安排这些肽的 SRM 采集，然后使用 SRM 数据根据色谱峰时间获取更加精确的 iRT 值。但是，您也可以通过使用 Skyline MS1 过滤，直接从原始 DDA 运行提取色谱峰时间。可在 [MS1 过滤](https://skyline.gs.washington.edu/labkey/wiki/home/software/Skyline/page.view?name=ms1_filtering)教程中查看如何设置并将数据导入 MS1 过滤文档的完整详细信息。在本文档中，您可通过执行下列操作快速浏览已创建并导入数据的文档，包括用于创建谱图库的两次 DDA 运行：

* 在“文件”菜单中，单击“打开”(Ctrl-O)。
* 导航至“iRT”文件夹中的“Yeast+Standard”子文件夹。
* 双击文件“Yeast+Standard (refined) - 2min.sky”。
* 选择肽视图中的第一个肽。

Skyline 窗口将显示如下：



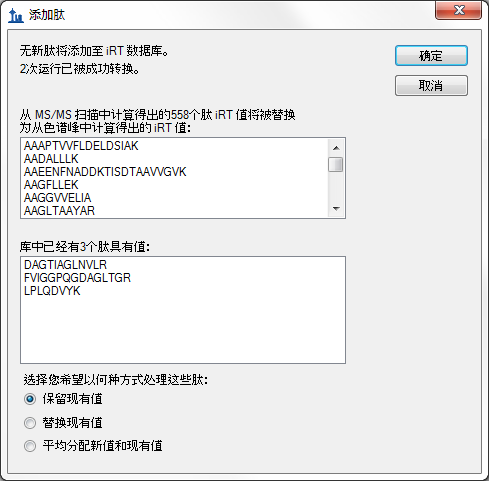
您可双击“保留时间”视图中的标题栏，以更好地查看该图形，并了解到以从库谱图计算所得的 iRT 值为依据的回归测定时间相关系数为 0.9998。因此，从使用色谱峰与使用 MS/MS 扫描时间获取的内容可能低于预期。另一方面，已手动调整此数据集，可保留仅在两次运行（两次运行均有明确的峰值）中检测到的肽。使用谱图库数据计算肽的初始数据 iRT 值时，您可能还需要附加一些检测条件。

您在此文件中看到的色谱图提取自用于建立谱图库的 DDA 运行的 MS1 扫描。您还可查看记录已确认 MS/MS 扫描的时间，这些时间在色谱图中已通过“ID”进行标记。此外，您还可以在 [MS1 过滤](https://skyline.gs.washington.edu/labkey/wiki/home/software/Skyline/page.view?name=ms1_filtering) 教程中学习如何使用这一对您有利的数据处理方法的更多相关信息。

要将使用 MS/MS 扫描时间计算所得的 iRT 值转化为本文档中使用色谱峰时间的值，请执行下列步骤：

* 右键单击“保留时间”图，选择“计算器”并单击“编辑当前”。
* 单击“编辑 iRT 计算器”表单中的“添加”按钮，并单击“添加结果”。

Skyline 将显示如下所示表单：



告诉您系统将替换您在上一部分添加的 558 个 iRT 值。由于您正在使用色谱峰时间，则您还可选择更换酵母和人类样品共享的 3 个肽，或使用两者的平均值。

* 单击“确定”按钮接受更改。

# 更多 iRT 计算器编辑选项

现在您拥有 705 个具有相当良好 iRT 值的肽，虽然这些值仅通过两次以内的重复测定计算得出。在这些初始情况下，您已使用包括在 iRT-C18 计算器定义中指定的肽标准配合的数据集。然而，并不需要这样。现在您可以通过与您正在使用的 iRT 数据库具有足够共同肽的任何数据集继续计算新的 iRT 值。只要存在至少 20 个相关性回归为 0.99 或更高的共同肽，Skyline 就将使用所有这些共同肽。

测试 Skyline 中的 iRT 支持时，将从 PeptideAtlas3 的公共数据创建上述谱图库和 Skyline 文档。此数据集包含 20 多次重复测定，产生了 1000 多个 iRT 值，但由于显然太大而无法涵盖在本教程中。

您可能还注意到菜单 Skyline 显示您单击“编辑 iRT 计算器”表单（包括“添加 iRT 数据库”操作）中“添加”按钮的时间。此菜单项可用于将现有 iRT 数据库合并至当前计算器。如果数据库使用相同的标准肽，则它们将用于执行从一个数据库转换到另一个数据库的回归。否则，与其他数据源一样，只要存在至少 20 个回归相关性为 0.99 或更高的肽，Skyline 就将使用两个数据库中的公共肽。

“编辑 iRT 计算器”表单中的“打开”按钮允许您使用现有的 iRT 数据库，该数据库可能是您从他人接收的数据库。

您也可使用“编辑 iRT 计算器”表单中的“肽”按钮，将标准肽更改为数据库中包含的任何肽集，并且您可使用“重新校准”按钮更改 iRT 尺度。

# 结论

在本教程中，您学习了如何使用 Skyline 支持 iRT，这是凭经验存储测定肽保留时间的标准方法，以便其可用于 SRM 采集时序安排和采集后肽身份验证。只要您为测定的肽存储了 iRT 值，则通常只需要进行单一校准即可预定任意数量的离子对。更加精确的保留时间预测也使 iRT 预测器成为一种比基于序列的预测更强大的肽身份确认工具。Skyline 支持使 iRT 方法易于使用，且易于生成 iRT 值。您可根据任何尺度和任何标准肽集计算 iRT 值。您甚至可以将内生于特定实验的肽集作为标准，只要它们可进行持续测定并跨越您试图测定的大多数梯度范围。此外，数据库具有共同肽时，Skyline 将使 iRT 数据库易于合并。您还学习了关于 iRT-C18 的内容，其最初为 Biognosys 团队使用 Biognosys 试剂盒定义的 iRT 尺度。您可将此试剂盒用于自己的实验，或者 Skyline 使得 iRT-C18 尺度易于使用，但需要将标准肽更改为根据该尺度校准的任何肽集，因为此时您已完成数百个常用人体肽和酵母肽的实验。

# 参考文献

1. Krokhin, O. V. *et al.*An improved model for prediction of retention times of tryptic peptides in ion pair reversed-phase HPLC: its application to protein peptide mapping by off-line HPLC-MALDI MS.*Mol.Cell Proteomics* **3**, 908-919 (2004).

2. Escher, C. *et al.*Using iRT, a normalized retention time for more targeted measurement of peptides.*Proteomics (accepted)* (2012).

3. Deutsch, E. W., Lam, H. & Aebersold, R. PeptideAtlas: a resource for target selection for emerging targeted proteomics workflows.*EMBO Rep* **9**, 429-434 (2008).