

Thermo

# PepFinder

用户手册

软件版本 2.0

XCALI-97715 修订版 A 2014 年 8 月



**Thermo**  
SCIENTIFIC

© 2014 Thermo Fisher Scientific Inc. 保留所有权利。

PepFinder、Orbitrap Elite、Q Exactive、PinPoint 和 Q Exactive Plus 均为 Thermo Fisher Scientific Inc. 的商标，而 Accela、Orbitrap、Orbitrap Fusion、Tribrid、LCQ、LTQ、LTQ FT、Thermo Scientific、Chromleon 和 Xcalibur 均为其在美国的注册商标。

Mascot 是 Matrix Science Ltd. 在美国的注册服务商标。

Microsoft、Windows 和 Excel 是 Microsoft Corporation 在美国以及其他国家和地区的注册商标。

所有其他商标都是 Thermo Fisher Scientific 及其子公司的财产。

Thermo Fisher Scientific Inc. 为购买产品的客户提供本文档，供其在操作产品时参考。本文档受版权保护，未经 Thermo Fisher Scientific Inc. 书面许可，严禁复制本文档或本文档中的任何部分。

本文档的内容可能随时更改，恕不另行通知。本文档中的所有技术信息仅供参考。本文档中的系统配置和规格将取代购买者先前获得的所有信息。

本文档不属于 Thermo Fisher Scientific Inc. 和购买者之间的销售合同的一部分。任何情形下，都不得使用本文档来取代或修改任何“Terms and Conditions of Sale（销售条款与条件）”，若两份文档信息发生冲突，则以“Terms and Conditions of Sale（销售条款与条件）”中的信息为准。

发行历史：修订版 A，2014 年 8 月

软件版本：PepFinder 2.0.x

**仅供研究使用。不可用于诊断。**

## 目录

	<b>前言</b> .....	<b>v</b>
	了解 PepFinder 应用程序.....	v
	相关文档.....	vii
	系统要求.....	viii
	激活或取消激活软件许可证.....	ix
	安全和特殊注意事项.....	ix
	联系我们.....	x
<b>第 1 章</b>	<b>处理数据</b> .....	<b>1</b>
	采集数据.....	2
	下载样品文件.....	2
	创建流程.....	3
	添加和修改蛋白质序列.....	4
	添加蛋白质序列.....	4
	处理蛋白酶和修饰定义.....	5
	修改 Data Processing Options（数据处理选项）.....	10
	设置 Peak Detection（峰检测）值.....	12
	对齐离子.....	15
	测量质量数.....	15
	识别肽段.....	16
	自动生成报告.....	19
	保存数据处理选项.....	19
	选择解卷积方法.....	20
	载入数据文件.....	22
	处理数据.....	23
	解析结果.....	25
	保存实验结果.....	25
<b>第 2 章</b>	<b>在 Main（主要）窗口中处理结果</b> .....	<b>27</b>
	在 Main（主要）窗口中查看结果.....	29
	编辑 Main（主要）窗口内容.....	30
	处理 Ion List（离子列表）视图.....	30
	处理 Chromatogram（色谱图）视图.....	38
	处理 Spectrum（质谱图）视图.....	45

	使用 De Novo 测序识别组分 .....	54
	设置 De Novo 测序 .....	54
	使用 De Novo 测序识别多个离子 .....	57
	处理实验结果 .....	57
	导出离子列表 .....	58
	为所有文件导出离子列表 .....	58
	生成文件导出实验数据 .....	59
	创建序列覆盖图谱 .....	62
	创建修饰总结 .....	64
<b>第 3 章</b>	<b>在 Sequence (序列) 窗口中查看结果 .....</b>	<b>67</b>
	在 Sequence (序列) 窗口中修改数据 .....	67
	查看蛋白质序列 .....	67
	修改序列 .....	72
	修改残基属性 .....	74
	执行理论消化 .....	75
	在 Sequence (序列) 窗口中检索 .....	76
	检索特定质量数 .....	77
	检索二硫键连接的肽段, 查找特定质量数 .....	78
	检索二硫键的归属 .....	80
	显示蛋白质水解的碎片 .....	81
	处理氨基酸置换 .....	82
<b>第 4 章</b>	<b>在 MS/MS 窗口中查看结果 .....</b>	<b>85</b>
	使用 MS/MS 窗口查看质谱图 .....	85
	打开 MS/MS 窗口 .....	86
	在 MS/MS 窗口中查看质谱图 .....	86
	在 MS/MS 窗口中修改 Spectrum (质谱图) 视图 .....	89
	使用 MS/MS 窗口修改质谱图 .....	92
	定义质谱图属性 .....	92
	重新校正质谱图 .....	94
	处理质谱图文件 .....	94
	处理离子 .....	100
	移除离子标签 .....	100
	分析离子 .....	101
	处理碎片离子 .....	102
	处理肽段 .....	104
	预测 MS/MS .....	105
	执行肽段列表的批次预测 .....	106
<b>附录 A</b>	<b>参考 .....</b>	<b>109</b>
	<b>索引 .....</b>	<b>111</b>

## 前言

本手册介绍了如何使用 PepFinder™ 自动软件解决方案完成重组（或其他）蛋白质蛋白酶解的肽质量指纹分析（也称作肽指纹图谱），以及随后产生的肽段识别。该应用程序自动找到一次 MS/MS 或 LC/MS 运行中的所有离子（排除背景离子），确定它们的价态和质量数，然后识别 MS/MS 或 LC/MS 肽图谱实验中的每个离子。

### 目录

- [了解 PepFinder 应用程序](#)
- [相关文档](#)
- [系统要求](#)
- [激活或取消激活软件许可证](#)
- [安全和特殊注意事项](#)
- [联系我们](#)

## 了解 PepFinder 应用程序

该 PepFinder 应用程序执行下列程序：

- 检测并定量分析肽离子，从背景信号中识别出真正的 LC 组分。
- 将目标蛋白质序列的肽段或者修饰肽段的实验串联质谱图与预期串联质谱图进行匹配，从而识别每个肽离子。预期质谱图还可以说明糖基化肽段的裂解类型。
- 使用容错检索识别用户指定修饰和非预期修饰。
- 识别二硫键连接的肽段，包括由多个二硫键结合的多个肽段。
- 根据匹配的 MS 和 MS/MS 肽段生成肽图谱。
- 定量分析修饰的位点占有率。

- 以电子数据表的格式比较不同 LC/MS 运行中的离子。可以将多个 LC/MS 运行导入该应用程序，以便同时处理。然后，可以将这些运行中找到的所有离子导入电子数据表应用程序，相同的离子被放入同一行中。最后，使用 PepFinder 应用程序在电子数据表应用程序中直接比较这些离子，以检测这些运行之间的任何差别。

PepFinder 应用程序提供其他输出格式：

- 色谱峰都具有质量数或肽识别标签
- 一个保留时间表格，包括  $m/z$  值、离子强度和峰面积；价态、平均质量数和单同位素质量数；以及每个离子所属的肽

可以将实验结果导出，其格式与下列产品兼容

- 目标物定量实验
  - PinPoint™
  - Chromeleon™
- 污染物识别
  - Mascot<sup>SM</sup>
- De novo 肽识别
  - MSBlast<sup>1</sup>

PepFinder 应用程序只读取 Thermo 原始数据文件（使用 Thermo Scientific™ 仪器，例如 Orbitrap™、Orbitrap Fusion™、Orbitrap Elite™、Q Exactive™、LCQ™、LTQ™ 和 LTQ FT™ 质谱仪采集的数据）。对于其他类型的 Thermo 仪器，可以手动执行某些分析，包括碎片离子归属、采用一次 MS/MS 扫描或质谱图进行肽识别（使用 Clipboard [剪贴板] 导入）等。PepFinder 的这个版本可以兼容较早版本 PepFinder 所创建的实验文件。

该应用程序使用三个主要窗口：Main（主要）应用程序窗口，Sequence（序列）窗口和 MS/MS 窗口。可以从 View（视图）菜单访问 Sequence（序列）窗口和 MS/MS 窗口。该应用程序在 MS/MS 窗口中执行 top-down 蛋白质表征。

Main（主要）窗口包括三个视图区域：离子列表视图、色谱图视图和质谱图视图。所有视图都互相影响。有关查看和修改这些视图中结果的信息，参阅第 2 章，“在 Main（主要）窗口中处理结果”。

Sequence（序列）窗口显示用于识别的蛋白质序列。当点击离子列表中的离子时间时，该窗口与 Main（主要）窗口互相影响。有关使用 Sequence（序列）窗口的信息，参阅第 3 章，“在 Sequence（序列）窗口中查看结果”。

<sup>1</sup> The Washington University BLAST 2.0 (Mass Spec Best Local Alignment Search Tool) [Rel.2.0MP-WashU, 01-Jan-2006] is provided by W. Gish via Washington University server.

MS/MS 窗口显示实验测定的和预期的 MS/MS 质谱图，以及预期的序列。当点击离子列表中的离子时间时，该窗口也与 Main（主要）窗口互相影响。有关使用 MS/MS 窗口的信息，参阅第 4 章，“在 MS/MS 窗口中查看结果”。

Main（主要）窗口

Sequence（序列）窗口



MS/MS 窗口

## 相关文档

除了本手册，PepFinder 应用程序还包括 *PepFinder 快速入门手册*（*PepFinder Quick Start Guide*）和 Help（帮助）。

若要访问文档或应用程序 Help（帮助），可执行下列程序。

### ❖ 若要查看产品手册

从 Microsoft™ Windows™ 任务栏执行下列步骤，选择 **Start（开始）** > **All Programs（所有程序）** > **Thermo PepFinder > Manuals（手册）** 或从该应用程序上选择 **Help（帮助）** > **Manuals（手册）**。

### ❖ 若要打开 PepFinder 应用程序的 Help（帮助）

从该应用程序窗口选择 **Help（帮助）** > **PepFinder Help（PepFinder 帮助）**。

更多信息可访问 [www.thermoscientific.com](http://www.thermoscientific.com)。



## 系统要求

PepFinder 应用程序需要许可证。此外，用户系统必须符合以下最低要求。

系统	要求
硬件	<ul style="list-style-type: none"><li>• 64 位双核处理器计算机，具有 4 GB RAM</li><li>• 1700 MHz 处理器</li><li>• 30 GB 硬盘</li><li>• NTFS 格式化的硬盘</li><li>• CD/R-ROM 驱动器</li><li>• 显卡和显示器分辨率达到 1680×1050 (SXGA)</li></ul>
仪器（支持的或所需的）	所有离子阱和基于 Orbitrap 的仪器
软件	<ul style="list-style-type: none"><li>• 带 Service Pack 1 的 Microsoft™ Windows™ 7 Professional 64 位操作系统</li><li>• Microsoft .NET Framework 4.0</li><li>• MSFileReader 3.0</li></ul>



## 激活或取消激活软件许可证

使用 Thermo Scientific Product Licensing（产品许可）向导激活或者取消激活 PepFinder 应用程序。若要激活 PepFinder 应用程序，必须有 Thermo Fisher Scientific 提供的激活码。在把许可证转移到另一台计算机之前，必须取消激活 PepFinder 应用程序。

### ❖ 若要打开 Product Licensing（产品许可）向导

1. 打开 PepFinder 应用程序。
2. 选择 **File（文件） > About PepFinder（关于 PepFinder）**。
3. 点击 **Activate（激活）**（或 **Deactivate [取消激活]**）开始激活或取消激活程序。

## 安全和特殊注意事项

确保遵循本手册中发布的事先声明。安全和其他特殊注意事项显示在方框中。

安全和特殊注意事项包括以下内容：

**重要信息** 强调防止软件损害、数据丢失或无效测试结果必需的信息；或可能包含获得系统最佳性能的重要信息。

**注释** 强调普遍关注的信息。

**提示** 强调能够帮助简化工作的信息。

## 联系我们

可以通过多种方式联系 Thermo Fisher Scientific，获取所需信息。

用于 Thermo Scientific™ 产品	通过手机、传真、电子邮件或网站获取
<b>技术支持</b>	<p>(美国) 电话: 1 (800) 532-4752 传真: 1 (561) 688-8736</p> <p>电子邮箱: <a href="mailto:us.techsupport.analyze@thermofisher.com">us.techsupport.analyze@thermofisher.com</a></p> <p>网址 — 用于获取产品支持、技术文档和知识库: <a href="http://www.thermoscientific.com/support">www.thermoscientific.com/support</a></p>
<b>客户服务</b> (销售和维修)	<p>(美国) 电话: 1 (800) 532-4752 传真: 1 (561) 688-8731</p> <p>电子邮箱: <a href="mailto:us.customer-support.analyze@thermofisher.com">us.customer-support.analyze@thermofisher.com</a></p> <p>网址 — 用于获取产品信息: <a href="http://www.thermoscientific.com/lc-ms">www.thermoscientific.com/lc-ms</a></p> <p>网址 — 用于自定义服务需求:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. 从任意 Products &amp; Services (产品和服务) 网页上点击 <b>Contact Us (联系我们)</b>。</li><li>2. 在 Contact Us (联系我们) 框内，完成所需信息，滚动至底部并点击 <b>Send (发送)</b>。</li></ol>
<b>用户文档</b>	<p>网址 — 用于下载文档: <a href="http://mssupport.thermo.com">mssupport.thermo.com</a></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. 在 Terms and Conditions (条款与条件) 网页上点击 <b>I Agree (我同意)</b>。</li><li>2. 在左窗格中点击 <b>Customer Manuals (用户手册)</b>。</li><li>3. 为了找到文档，点击 <b>Search (检索)</b> 并输入检索标准。对于 Document Type (文档类型)，选择 <b>Manual (手册)</b>。</li></ol> <p>电子邮件 — 若要直接将反馈发送给 Technical Publications (技术出版部门): <a href="mailto:techpubs-lcms@thermofisher.com">techpubs-lcms@thermofisher.com</a></p> <p>网址 — 若要完成有关本 Thermo Scientific 文档的调查: <a href="http://www.surveymonkey.com/s/PQM6P62">www.surveymonkey.com/s/PQM6P62</a></p>

# 处理数据

使用 PepFinder 应用程序执行重组（或其他）蛋白质蛋白酶解的肽质量指纹分析，以及通过 LC/MS 实验识别肽段。该应用程序基于疏水性或 LC/ 串联质谱仪系统，利用高质量数精度和保留时间匹配完整肽质量数，从而识别肽。可以比较不同 LC/MS 运行所识别的肽，并使用该应用程序内的互动工具比较结果，包括修饰总结报告。

## 目录

- 采集数据
- 下载样品文件
- 创建流程
- 添加和修改蛋白质序列
- 修改 Data Processing Options（数据处理选项）
- 载入数据文件
- 解析结果
- 保存实验结果

## 采集数据

PepFinder 应用程序可以解析来自 Thermo Scientific 仪器的任何类型的 MS/MS 数据，包括 CID（碰撞诱导解离）、ETD（电子转移解离）和 HCD（高能碰撞诱导解离）。使用以下其中一种方法处理 LC/MS/MS 运行：

- 对于 Orbitrap 或 LTQ FT 仪器，使用高分辨扫描以及随后的多个 MS/MS 扫描采集数据，扫描采用高或低分辨率。PepFinder 应用程序还可以处理全扫描数据，所以这是另一个处理选项。
- 对于 LCQ/LTQ 仪器，在三连播模式下采集数据，例如，全扫描之后是数据依赖扫描或者 ultra-zoom 扫描，再之后是棒状图模式下的数据依赖 MS/MS 扫描。

## 下载样品文件

若要下载样品文件，包括蛋白质序列，执行下列程序。

### ❖ 若要下载示例数据文件

1. 从该应用程序安装位置双击 **Thermo Launcher**（**Thermo 启动器**）。
2. 点击 **Next**（**下一步**）。
3. 从 PepFinder Setup（PepFinder 设置）页面点击 **Example Data**（**示例数据**）。

该应用程序在浏览器中打开 Thermo Fisher Scientific Life Sciences Mass Spectrometry（Thermo Fisher Scientific 生命科学质谱仪）网站。

4. 如果尚未在网站注册，完成注册表格并点击 **Submit**（**提交**）。

如果已经注册，则登录并转至[步骤 6](#)。

5. 从 Thermo Fisher Scientific 收到一封邮件后完成密码信息，然后登录。
6. 点击 **Mass Spec BioSoftware SW**（**质谱仪生物软件 SW**），然后点击 **PepFinder Example Data**（**PepFinder 示例数据**）下载 ZIP 文件，该文件包括原始数据文件和序列文件。

PepFinder 2.0 可以兼容较早版本 PepFinder 所创建的实验文件。


7. 解压缩文件并将结果文件放入一个合适的地方。

## 创建流程

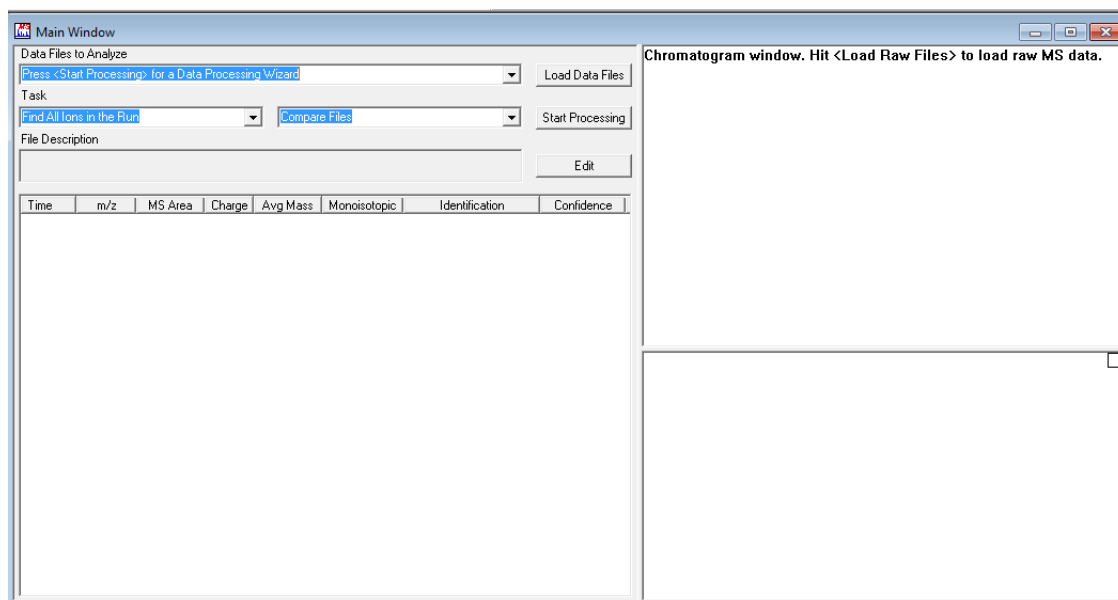
本部分为设置实验提供详细的描述。有关本应用程序的说明，参阅 *PepFinder 快速入门手册* (*PepFinder Quick Start Guide*)。

由于该应用程序在数据处理时重复访问原始数据文件，如果该应用程序通过网络访问原始数据文件，数据处理时间会非常长。将原始数据文件复制到本地电脑上，可加快处理速度。

### ❖ 若要定义新实验

双击 **PepFinder** 图标 (  ) 打开该应用程序。

该应用程序在 Main (主要) 窗口显示一个空白项目。



## 添加和修改蛋白质序列

该序列建立目标蛋白质并帮助该应用程序识别检测到的离子。若没有蛋白质序列，PepFinder 应用程序仍然执行分析，但是离子列表不提供识别信息。

- [添加蛋白质序列](#)
- [处理蛋白酶和修饰定义](#)

### 添加蛋白质序列

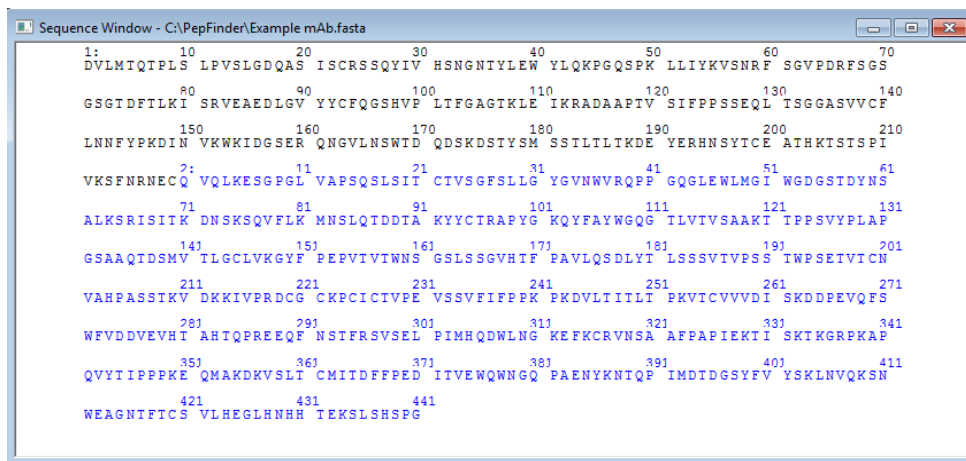
#### ❖ 若要添加蛋白质序列

1. 选择 **View (视图) > Sequence Window (序列窗口)**。
2. 选择 **File (文件) > Add a Protein Sequence (添加蛋白质序列)** 在序列窗口中添加一个序列。

该应用程序显示一个浏览器，在此可以定义包括目标蛋白质序列的文本文件。可以使用 FASTA 格式的文件一次导入多个序列（IgG 轻链和重链）。

3. 若要替换 Sequence (序列) 窗口中的序列，选择 **File (文件) > Import Protein Sequence (导入蛋白质序列)**。
4. 若要手动编辑一个序列，选择 **Sequence (序列) > Input/Edit (导入 / 编辑)**。
5. 选择蛋白质序列文件（一个文本或 FASTA 文件）并点击 **Open (打开)**。

该应用程序以新的或修饰的序列更新 Sequence (序列) 窗口。



```

Sequence Window - C:\PepFinder\Example mAb.fasta
1: 10 20 30 40 50 60 70
DVLMTQIPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQYIV HSNNGTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS
80 90 100 110 120 130 140
GSGIDFILKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP LTFGAGTKLE IKRADAAPTIV SIFPPSSEQL TSGGASVVCF
150 160 170 180 190 200 210
LNNFYPKDIN VKWKIDGSR QNGVLNSWTD QDSKDSITYSM SSTLTLIKDE YERHNSYICE ATHKSTSTSPI
2: 11 21 31 41 51 61
VKSFNRNECQ VQLKESGPGI VAPSQSLSIIT CIVSGFSLIG YGVNWRQPP GQGLEWLMGI WGDGSDYNS
71 81 91 101 111 121 131
ALKSRISITK DNSKSQVFLK MNSLQIDDTA KYICTRAPYG KQYFAYWQG TLVTVSAAKT TPPSVYPLAP
141 151 161 171 181 191 201
GSAAQIDSMV TLGCLVKGYF PEPVIVTWSN GSLSSGVHTF PAVLQSDLYI LSSSVIVPSS TWPSEIVTCN
211 221 231 241 251 261 271
VAHPASSTKV DKKIVPRDCG CKPCICTVBE VSSVFIFPPK PKDVLITILI PRVTCVVVDI SKDDPEVQFS
281 291 301 311 321 331 341
WFVDDVEVHI AHTQPREEQF NSTFRSVSEL PIMHQDWLNG KEFKCRVNSA AFPAPIEKTI SKIKGRPKAP
351 361 371 381 391 401 411
QVYTIIPPPKE QMAKDKVSLT CMITDFFPED ITVEWQWNGQ PAENYKNTQP IMDIDGSYFV YSKLNVQKSN
421 431 441
WEAGNTFTCS VLHEGLHNNH TEKSLSHSPG
  
```

## 处理蛋白酶和修饰定义

使用下列过程选择和定义蛋白酶，该物质用于消化目标蛋白质和定义样品分析中预期的可变修饰。氧化的蛋氨酸和脱酰胺是这类修饰的常见例子。

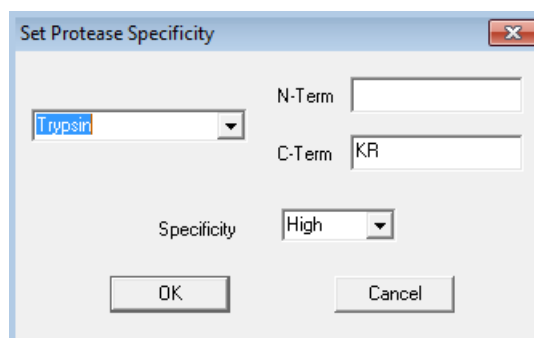
- [选择蛋白酶](#)
- [处理修饰列表](#)
- [定义质量数计算](#)

### 选择蛋白酶

使用 Set Protease Specificity（设置蛋白酶特异性）对话框选择用于消化目标蛋白质的蛋白酶，并定义蛋白酶的特异性。

#### ❖ 若要定义蛋白酶值

1. 在 Sequence（序列）窗口中，选择 **Options（选项） > Select Protease（选择蛋白酶）** 打开 Set Protease Specificity（设置蛋白酶特异性）对话框。



如果蛋白酶没有显示在列表中，可以打开 Sequence（序列）视图并选择 Sequence（序列） > Edit Protease and Modification List（编辑蛋白酶和修饰列表）添加自定义的蛋白酶。若希望在以后的分析中使用这个蛋白酶，Thermo Fisher Scientific 推荐这项操作。通过使用文本编辑器修改 Mspep.ini 文件也可以添加蛋白酶至列表中。

2. 若要为蛋白酶特异性选择一个水平，从 Specificity（特异性）列表中四个不同的选项选择一个。

当选择特异性水平（Strict [严格]、High [高]、Medium [中] 或 Low [低]）时，该应用程序选择满足所选特异性水平的肽。若要使用该应用程序识别肽，两个剪切位点中至少有一个必须满足该蛋白酶的用户自定义特异性水平。

若要将水平设定为 Strict（严格），该应用程序只查找那些匹配理论肽段的、100% 遵守蛋白酶规则的，以及剪切位点只位于 N 端或 C 端的肽段。



其他水平（高、中和低）都是该应用程序用于确定最后置信度分数的置信度因子，而且只将这些因子应用于肽段两端满足蛋白酶特异性要求的肽段（不影响半酶切 trypsin 肽段）。因此对于同一肽段而言，如果设定水平为高，那么该因子比设定水平为中时的因子高。当两个或者更多肽段同时匹配一张质谱图时，但是其中只有一个肽段符合蛋白酶特异性要求，则应用程序会根据这种差别为这个肽段分配更高的置信度分数。如果样品中存在大量未酶切位点，那么可以使用中或低水平。

默认：High（高）

如果将该水平设定为 Strict（严格），则肽段两端必须匹配所选的蛋白酶特异性。

肽段内的未酶切位点的最大数目没有限制。

3. 若要设定蛋白酶特异性，从 Specificity（特异性）列表选择一个选项。

## 处理修饰列表

可以使用 PepFinder 应用程序指定用于检索的修饰列表。该应用程序可以检索并指定固定修饰和可变修饰。使用 Select Modifications for Searching（选择用于检索的修饰）对话框为自动检索修饰肽段和修饰位点选择或修改修饰类型。

可以使用翻译后修饰（例如磷酸化）或假象修饰（由样品处理或消化引起的修饰，例如烷基化、氧化或脱酰胺）。在 Data Processing Options（数据处理选项）对话框中选择 N 糖基化、容错检索以及氨基酸取代。有关详细信息，参阅第 10 页上的“修改 Data Processing Options（数据处理选项）”。

- 选择应用程序用于检索的固定修饰
- 选择应用程序用于检索的可变修饰
- 修改修饰列表

### 选择应用程序用于检索的固定修饰

#### ❖ 若要选择固定修饰

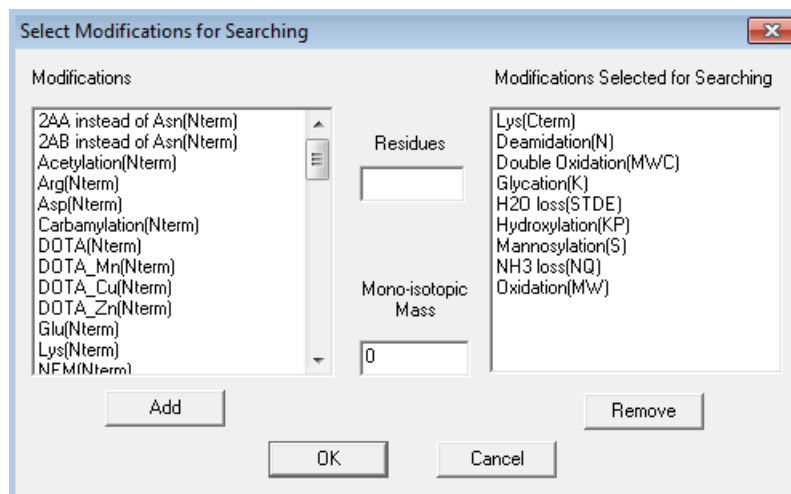
1. 在 Sequence（序列）窗口中，双击任意氨基酸打开对话框。
2. 选择用于特定残基的修饰类型。  
根据所选残基，可能有多个选项。
3. 若要将该修饰应用到蛋白质序列中的所有残基，选择 **Apply to All（应用至全部）** 复选框。
4. 完成后单击 **OK（确定）**。

当添加一个固定修饰时，序列窗口中的氨基酸变成红色。如果在对话框中选择 Apply to all（应用至全部），所有残基变成红色。结果表中的固定修饰不会显示为一个修饰。PepFinder 应用程序假定用于检索的氨基酸  $m/z$  值。

## 选择应用程序用于检索的可变修饰

### ❖ 若要选择可变修饰

1. 在 Sequence（序列）窗口中选择 **Sequence（序列） > Select Modifications for Searching（选择用于检索的修饰）** 打开对话框。



对话框左侧列表显示可用修饰，右侧列表显示识别过程中用作可变修饰的所选修饰列表。

若列表中没有显示用户需要的修饰，可以打开 Sequence（序列）视图并选择 Sequence（序列） > Edit Protease and Modification List（编辑蛋白酶和修饰列表）添加修饰。若希望以后在分析中仍使用这个修饰，Thermo Fisher Scientific 推荐使用这项操作。也可以使用文本编辑器修改 Mspep.ini 文件添加修饰。

若要自动识别修饰位点，在 Select Modifications for Searching（选择用于检索的修饰）对话框中确认选中了该修饰。如果信息足够多，可以检测到大多数未指定的修饰。

2. 若要移除 Modifications Selected for Searching（用于检索的所选修饰）列表中的修饰，选择该修饰并点击 **Remove（移除）**。
3. 若要向 Modifications Selected for Searching（用于检索的所选修饰）列表中添加修饰，选择该修饰并点击 **Add（添加）**。
4. 点击 **OK（确定）** 接受修改。

有关修改修饰列表的详细信息，参阅[修改修饰列表](#)。

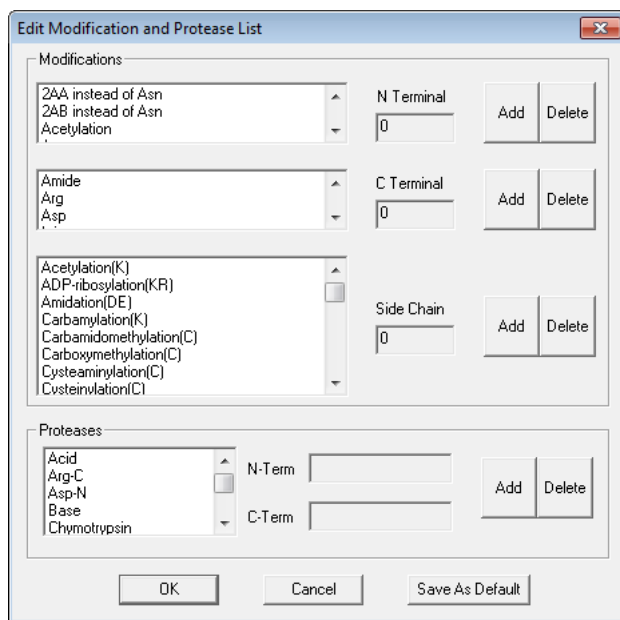
PepFinder 应用程序根据已知的蛋白质序列以及选定的蛋白酶规则检索离子质量数，从而识别蛋白质水解的肽段。两个剪切位点必须至少有一个匹配蛋白酶特异性，该肽段才能被视作候选肽段。当应用程序识别候选肽段时，肽段内的未酶切位点的最大数目没有限制。<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 出处：Zhang, Z. Large-scale Identification and Quantification of Covalent Modifications in Therapeutic Proteins. *Anal. Chem.* **2009**, 81(20), 8354-8364.

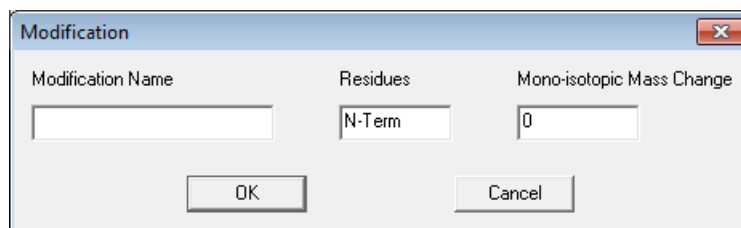
## 修改修饰列表

### ❖ 若要编辑修饰列表

1. 在 Sequence（序列）窗口中选择 **Sequence（序列） > Edit Modification and Protease List（编辑修饰和蛋白酶列表）** 打开对话框。



2. 若要选择待编辑的修饰类型，点击 **Add（添加）** 打开对话框。



3. 输入一个名称和单同位素质量数变化值，然后点击 **OK（确定）**。
4. 点击 **Save as Default（另存为默认）** 使应用程序保存修饰，以备使用。
5. 点击 **OK（确定）**。

### ❖ 若要手动编辑修饰列表

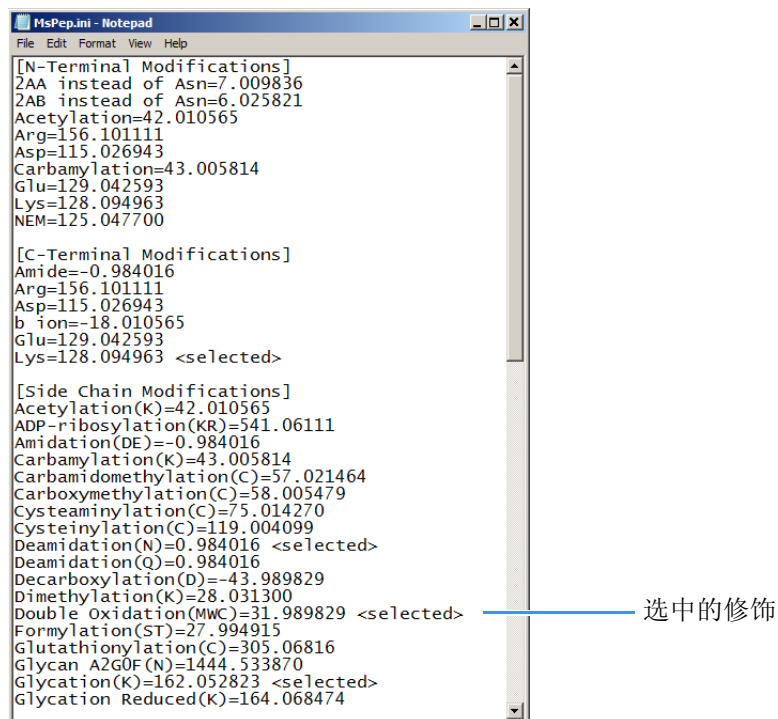
1. 打开 **C:\ProgramData\Thermo\PeptideFinder** 文件夹。

可用修饰的默认列表在 Mspep.ini 文件内。可以通过在修饰末尾添加或移除 <selected>（选中的）条目编辑默认修饰列表。Thermo Fisher Scientific 建议使用 Edit Modification and Protease（编辑修饰和蛋白酶）对话框添加新修饰，可从 Sequence（序列）窗口的 Edit（编辑）菜单进入该对话框。在该对话框所做的修改都保存在 Mspep.ini 文件中。有关更多信息，参阅第 5 页上的“处理蛋白酶和修饰定义”。

2. 在其他位置保存 MSpep.ini 文件的备份。

**重要信息** 确保正确编辑 MSpep.ini 文件，否则应用程序无法准确识别肽段。

3. 选择 **MSpep.ini** 文件，右击并用文本编辑器（例如 Notepad）打开。



4. 若要在 Select Modifications for Searching（选择用于检索的修饰）对话框中修改 Modifications Selected for Searching（用于检索的所选修饰）默认列表，在不需要的条目后面去掉 <selected>（选中的），然后在需要的条目后面加上 <selected>（选中的）。
5. 将该文件保存到相同位置。

## 定义质量数计算

### ❖ 若要指定显示理论质量数的方法

1. 在 Sequence（序列）窗口中，若要显示所有已显示质量数计算的单同位素质量数，选择 **Options（选项） > Mass（质量数） > Monoisotopic（单同位素）**。
2. 若要显示所有已显示质量数计算的平均质量数，选择 **Options（选项） > Mass（质量数） > Averaged（平均值）**。


# 修改 Data Processing Options（数据处理选项）

使用数据处理选项控制各选项，包括峰检测、保留时间校准、单同位素和平均质量数测定以及肽段识别。PepFinder 应用程序自动测定某些参数，比如根据原始数据文件确定绝对信号阈值和保留时间漂移，同时必须手动选择其他参数，比如用于样品分析的肽段识别参数。

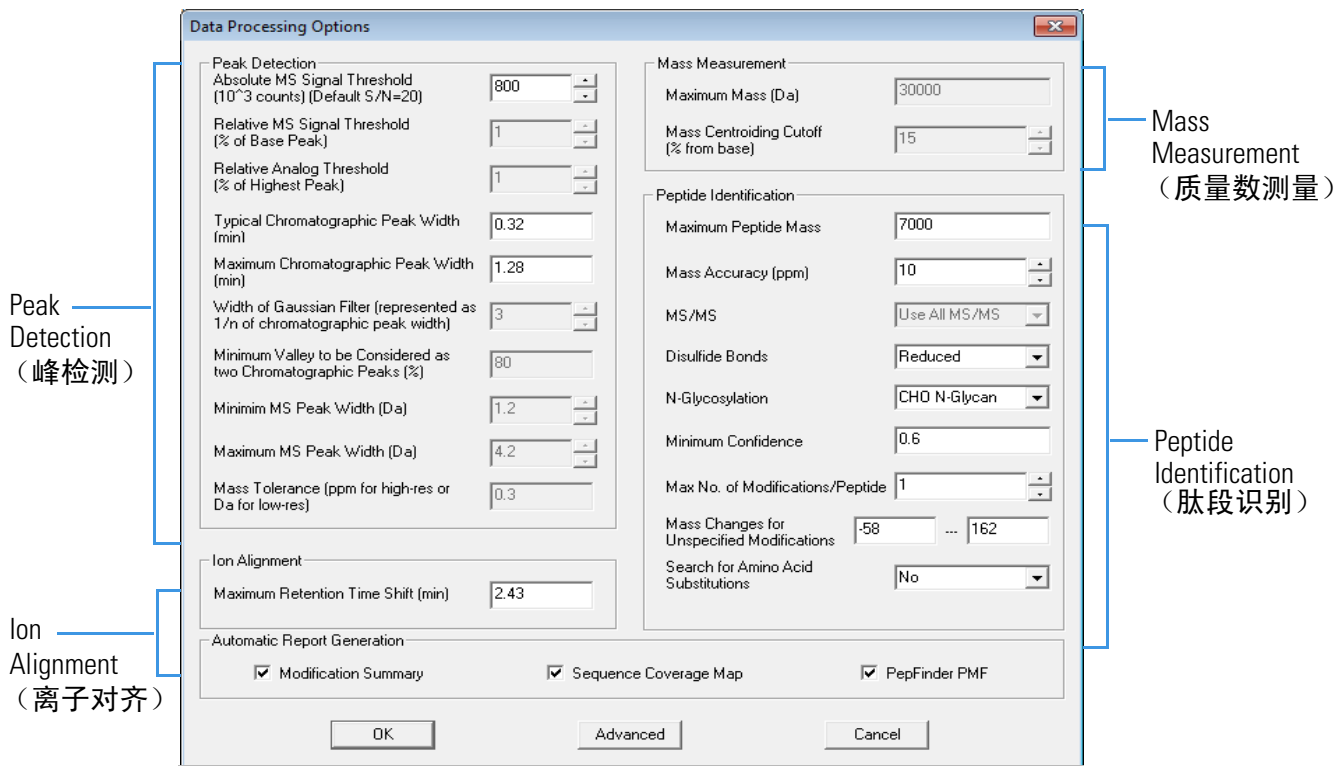
Data Processing Options（数据处理选项）对话框分为四个不同子过程：Peak Detection（峰检测）、Ion Alignment（离子对齐）、Mass Measurement（质量数测量）和 Peptide Identification（肽段识别）。有关每个参数的处理和数值信息，参阅以下内容：

- [设置 Peak Detection（峰检测）值](#)
- [对齐离子](#)
- [测量质量数](#)
- [识别肽段](#)
- [自动生成报告](#)
- [保存数据处理选项](#)
- [选择解卷积方法](#)

❖ 若要打开 Data Processing Options (数据处理选项) 对话框

点击  或选择 Options (选项) > Process Options (处理选项) > Peak Detection/Mass Measurement/Peptide ID (峰检测 / 质量数测量 / 肽段识别)。

Data Processing Options (数据处理选项) 对话框打开。若要访问灰色的数值, 点击 Advanced (高级)。



## 1 处理数据

修改 Data Processing Options (数据处理选项)

### 设置 Peak Detection (峰检测) 值

使用 Data Processing Options (数据处理选项) 对话框定义处理过程中的峰检测选项。点击 **Advanced (高级)** 修改灰色选项。

#### ❖ 若要设置峰检测值

1. Absolute MS Signal Threshold (绝对 MS 信号阈值): 若要修改绝对 MS 信号阈值 (以计数为单位), 用于应用程序检测离子, 可在框内输入一个值。

Peak Detection	
Absolute MS Signal Threshold ( $10^3$ counts) (Default S/N=20)	800
Relative MS Signal Threshold (% of Base Peak)	1
Relative Analog Threshold (% of Highest Peak)	1
Typical Chromatographic Peak Width (min)	0.32
Maximum Chromatographic Peak Width (min)	1.28
Width of Gaussian Filter (represented as 1/n of chromatographic peak width)	3
Minimum Valley to be Considered as two Chromatographic Peaks (%)	80
Minimum MS Peak Width (Da)	1.2
Maximum MS Peak Width (Da)	4.2
Mass Tolerance (ppm for high-res or Da for low-res)	0.3

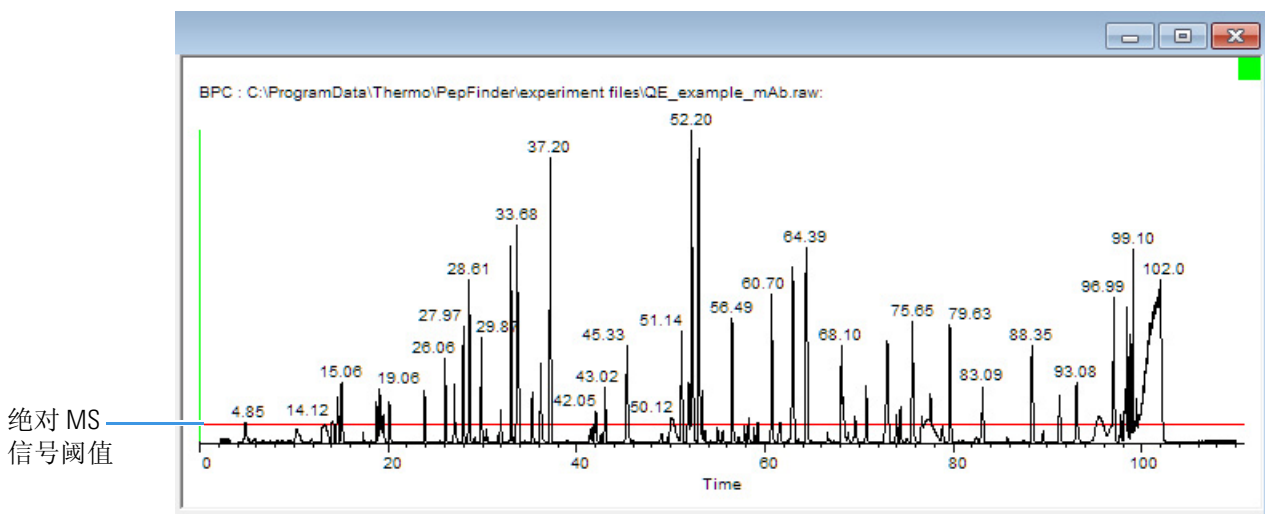
该应用程序从原始数据文件自动计算 MS 信号阈值 (噪声水平), 并按照信噪比水平 20 自动设定该值。

该应用程序在 Main (主要) 窗口的色谱图上显示一根很细的红色水平直线, 用于标记信号阈值。修改绝对 MS 信号阈值并点击 Data Processing Options (数据处理选项) 对话框中的 OK (确定) 后, 红色直线反映出色谱图上所做的修改。一般而言, 如果这根红线远低于基峰色谱图 (BPC) 或总离子色谱图 (TIC), 那么处理过程花费时间更长。

有效值: 该值取决于仪器。最小值是 0, 最大值不超过样品中组分的最高强度。

默认: 从原始数据文件计算。





2. Relative MS Signal Threshold (相对 MS 信号阈值): 若要设定相对 MS 信号阈值, 方便应用程序在色谱图指定点下进行离子检测, 可在框内输入一个数。

该 MS 信号阈值为色谱图指定点下要检测的离子设定最小 MS 信号。该参数定义相对阈值丰度百分比、用于检测与同一实验中浓度更高组分共洗脱的某个组分。

有效值: 0 至 100%

默认: 10%

3. Relative Analog Threshold (相对模拟阈值): 若要定义与色谱图中最大信号相比, 应用程序检测到的相对模拟阈值, 可在框内输入一个值。

仅当使用 Analog Chromatogram (模拟色谱图) 选项设置找峰过程时使用这个参数。有关设置过程的选项, 参阅第 3 页上的“创建流程”。

有效值: 0 至 100%

默认: 1%

4. Typical Chromatographic Peak Width (min) (典型色谱峰宽度, min): 若要设置 LC/MS 运行中的典型色谱峰宽度 (min), 可在框内输入一个值, 单位是分钟。

该应用程序自动确定 LC/MS 实验数据文件的典型色谱峰宽度, 单位是分钟, 并将该值设定为色谱图中最高峰的宽度。

有效值: 0.02 至 20 min

默认: 从原始数据文件计算。

## 1 处理数据

修改 Data Processing Options (数据处理选项)

5. Maximum Chromatographic Peak Width (min) (最大色谱峰宽度, min): 若要设置 LC/MS 运行中的最大色谱峰宽度 (min), 可在框内输入一个值, 单位是分钟。

该应用程序自动设定 LC/MS 运行中的最大色谱峰宽度。它将初始值设定为最高峰宽度和色谱图范围的几何平均数。应用程序将峰宽超过该值的任意峰看作背景峰, 而且不将此峰放入结果中。

有效值: 0.05 至 50 min

默认: 从原始数据文件计算。

6. Width of Gaussian Filter (Gaussian 滤波器宽度): 若要设定 Gaussian 滤波器宽度为典型色谱峰宽的  $1/n$ , 可在此框内输入一个值。

该应用程序使用 Gaussian 滤波器阅读 LC/MS 文件, 使用运动的 Gaussian 函数计算全扫描附近的平均值, 以提高每个扫描的信噪比。设置 Gaussian 滤波器宽度是优化每个扫描的 S/N 时的重要步骤。

例如, 数值 4 是指滤波器宽度是色谱峰宽的 40%。减少该值优化灵敏度, 而增加该值优化色谱分辨率。数值 1 代表 Gaussian 滤波器的最高灵敏度。

有效值: 1 至 10

默认: 3

7. Minimum Valley To Be Considered as Two Chromatographic Peaks (被视作两个色谱峰的最小峰谷值): 若要设定被视作两个色谱峰的最小峰谷值, 可在框内输入一个值。

有效值: 5 至 99.9%

默认: 80%

8. Minimum MS Peak Width (最小 MS 峰宽): 若要设置最小 MS 峰宽, 单位是 dalton, 可在此框内输入一个值。

该应用程序使用最大和最小 MS 峰宽 (单位 dalton) 生成离子的同位素峰轮廓范围。

有效值: 0.5 至 100 Da

默认: 4.2 Da

9. Maximum MS Peak Width (最大 MS 峰宽): 若要设置最大 MS 峰宽, 单位是 dalton, 可在此框内输入一个值。

该应用程序使用最大和最小 MS 峰宽 (单位 dalton) 生成离子的同位素峰轮廓范围。

有效值: 0.5 至 100 Da

默认: 1.2 Da

10. Mass Tolerance (质量数容许偏差): 若要设置不同扫描中同一离子的最大质量数差值, 可在框内输入一个值。

Mass Tolerance (质量数容许偏差) 是指不同扫描中同一离子的最大质量数差值。该应用程序测量高分辨率和低分辨率下的该值, 单位分别为 ppm 和 Da。

有效值: -0.01 至 50 ppm

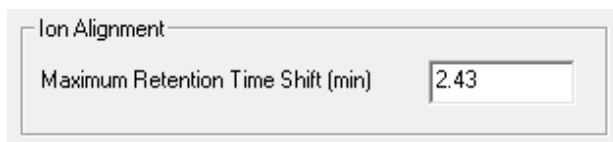
默认: 0.3 ppm

## 对齐离子

使用 Data Processing Options (数据处理选项) 对话框的 Ion Alignment (离子对齐) 区域设置最大保留时间漂移。

### ❖ 若要指定最大保留时间漂移

Maximum Retention Time Shift (最大保留时间漂移): 当比较两个或更多 LC/MS 运行时, 若要设定最大保留时间漂移, 单位是分钟, 可在框中输入一个值。



The screenshot shows a dialog box titled "Ion Alignment". Inside, there is a label "Maximum Retention Time Shift (min)" followed by a text input field containing the value "2.43".

有效值: 2 至 200 min

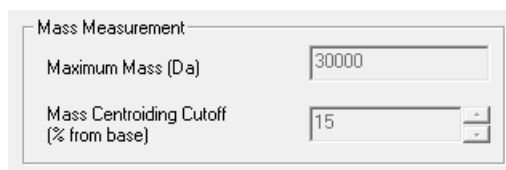
默认: 从原始数据自动计算

## 测量质量数

使用 Data Processing Options (数据处理选项) 对话框的 Mass Measurement (质量数测量) 区域定义处理过程中测量质量数的选项。点击 **Advanced (高级)** 修改灰色选项。

### ❖ 若要定义如何测量质量数

1. Maximum mass (最大质量数): 若要修改某个离子的平均质量数的计算值, 可在此框内输入一个值。可以设定 LC/MS 运行中肽段或蛋白质的最大质量数。



The screenshot shows a dialog box titled "Mass Measurement". It contains two fields: "Maximum Mass (Da)" with a value of "30000" and "Mass Centroiding Cutoff (% from base)" with a value of "15".

有效值: 1000 至 500000 Da

默认: 30000 Da

## 1 处理数据

修改 Data Processing Options (数据处理选项)

2. Mass Centroiding Cutoff (质量数棒状图阈值): 若要修改某个离子的平均质量数的计算值, 可在此框内输入一个值。

有效值: 0 至 99%

默认: 15%

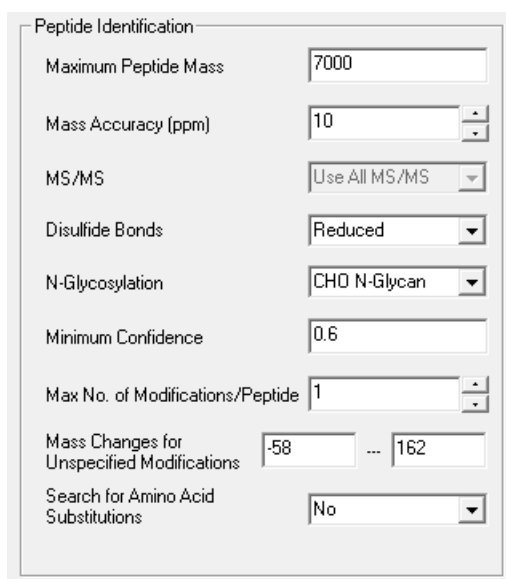
## 识别肽段

若要定义肽段处理选项, 使用 Data Processing Options (数据处理选项) 对话框的 Peptide Identification (肽段识别) 区域。

### ❖ 若要定义肽段选项

1. Maximum Peptide Mass (最大肽段质量数): 若要指定最大识别肽段质量数, 在 Maximum Peptide Mass (最大肽段质量数) 框内输入一个值。

当查看非还原性样品中的二硫键时, 增加这个值。



Parameter	Value
Maximum Peptide Mass	7000
Mass Accuracy (ppm)	10
MS/MS	Use All MS/MS
Disulfide Bonds	Reduced
N-Glycosylation	CHO N-Glycan
Minimum Confidence	0.6
Max No. of Modifications/Peptide	1
Mass Changes for Unspecified Modifications	-58 ... 162
Search for Amino Acid Substitutions	No

有效值: 500 至 20000 Da

默认: 7000 Da

2. Mass Accuracy (ppm) (质量数精度, ppm): 当比较一个特定离子的理论肽段质量数和计算质量数时, 若要设置最大质量数偏差 (ppm), 可在 Mass Accuracy (质量数精度) 框内输入一个值。

有效值: 1 至 2000 ppm

默认: 250 ppm

3. MS/MS: 若要打开 MS/MS 列表, 选择一个值以定义要处理的数据类型。

有效值: Use All MS/MS (使用全部 MS/MS)、Use CID/HCD (使用碰撞诱导解离 / 高能碰撞诱导解离)、Use ETD/ECD Only (只使用电子转移解离 / 只使用电子捕获解离)、Ignore MS/MS (忽略 MS/MS)

默认: Use All MS/MS (使用全部 MS/MS)

4. Disulfide Bonds (二硫键): 使用该参数选择应用程序如何检索蛋白质中的二硫键。若在消化过程中二硫键被还原, 则选择 **Reduced (还原的)**。若没有发生还原, 二硫键保持完整, 则选择 **Non-Reduced (非还原的)**。

有效值: Reduced (还原的)、Non-Reduced (非还原的)

默认: Reduced (还原的)

5. N-Glycosylation (N 糖基化): 若要检索 N-Glycosylation (N 糖基化), 从 N-Glycosylation (N 糖基化) 列表中选择一个值。修改糖基化参数以匹配表达系统 (中国仓鼠卵巢 [CHO] 细胞系、人类粒细胞系或无), 该系统用于目标蛋白质。

有效值: CHO Glycan (CHO 糖基)、Human N-Glycan (人类 N 糖基)、None (无)

默认: CHO Glycan (CHO 糖基)

6. Minimum Confidence (最小置信度): 将肽段归属报告的最低置信度水平设定为 0 到 1 的值, 最高置信度水平是 1。

有效值: 0 至 1

默认: 0.8

7. Max No. of Modifications/Peptide (修饰的最大数量 / 肽段): 若要指定每个肽段上修饰的最大数量, 在 Max No. of Modifications/Peptide (修饰的最大数量 / 肽段) 框内输入一个值。

增加该数量可能显著增加处理时间。

有效值: 0 至 8

默认: 1

8. Mass Changes for Unspecified Modifications (未指定修饰的质量数变化): 若要获得目标蛋白质的完整表征, 必须识别未指定的修饰。

若要识别未指定的修饰, PepFinder 应用程序通过用户定义的质量数变化检索与未知肽段类似的已识别肽段序列。

如果无法精确确定修饰位点, 应用程序在修饰位点前面加一个波浪 (~) 字符, 指示未指定修饰的大概位置。例如, 肽段上一个未指定修饰, ~C310-57.0212 代表 Cys-310 附近 57.0212 Da 的质量数丢失, 代表一次不完整的烷基化。由于在检索中没有指定 -57.0215 Da 的丢失, 该应用程序识别该质量数丢失。

有效值: 所有正负整数

默认: -58 至 162

9. Search for Amino Acid Substitutions (检索氨基酸置换): 在 Search for Amino Acid Substitutions (检索氨基酸置换) 列表中, 选择一个合适的选项:

- 若要避免检索置换, 选择 **No (否)**。
- 在两个氨基酸的密码子中, 由 DNA 突变导致的氨基酸置换极少具有一个以上的碱基变化, 因此, 若要检索 DNA 突变, 选择 **Single Base Change (单个碱基变化)**。选中该选项后, 该应用程序显示氨基酸置换, 该置换只包括密码子的一个碱基变化。
- 若要找出所有置换, 选择 **All Substitutions (所有置换)**。

有效值: No (否)、All Substitutions (所有置换)、Single Base Change (单个碱基变化)

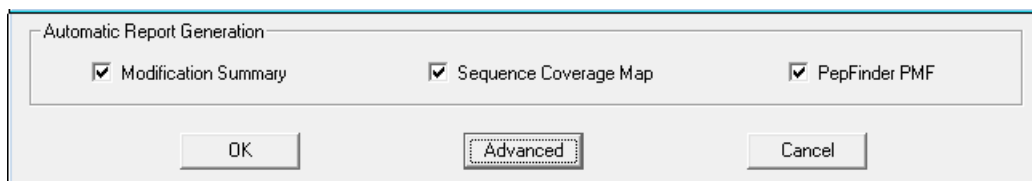
默认: No (否)

## 自动生成报告

数据处理完成后，可以使应用程序自动生成 Modification Summary Report (修饰总结报告) 和 Sequence Coverage Map (序列覆盖图谱)。该应用程序也可以自动保存实验文件。

### ❖ 若要自动生成报告

1. 若要在数据处理后自动生成修饰总结报告，选中 Data Processing Options (数据处理选项) 中的 **Modification Summary (修饰总结)** 复选框。



2. 若要在数据处理后自动生成序列覆盖图谱，选中 Data Processing Options (数据处理选项) 中的 **Sequence Coverage Map (序列覆盖图谱)** 复选框。
3. 若要自动创建和保存一个实验文件，选中 **PepFinder PMF** 复选框。
4. 点击 **OK (确定)** 保存选项。
5. 当准备处理数据时，在 Main (主要) 窗口中点击 **Start Processing (开始处理)**。

软件开始处理数据。处理完成后，应用程序显示 Data Processing Finished (数据处理完成) 消息。

6. 点击 **OK (确定)**。

处理完成后，应用程序自动创建用户所选的报告，并在网页浏览器中将其打开。该应用程序将序列覆盖图谱保存在原始数据文件所在位置，并在原始文件名上附加 .pmf 文件后缀，包括日期和时间戳。

如果实验包括不止一个原始数据文件，该软件使用第一个 .raw 文件名命名文件，类似于以下于 2014/6/24 5:16 pm 处理的文件：

02.raw\_140624171639.pmf

6/24/2014 at 5:16 pm

## 保存数据处理选项

### ❖ 若要保存数据处理选项

在作出修改后，点击 **OK (确定)** 关闭选项对话框。



## 选择解卷积方法

若要使用 Gaussian 解卷积以外的其他方法执行价态解卷积，或定义数据处理的变换选项，以便应用程序确定单同位素质量数，可执行下列程序。

### ❖ 若要定义变换选项

1. 单击右上方激活 Spectrum (质谱图) 视图。
2. 在 Main (主要) 窗口中，将光标移动到 Spectrum (质谱图) 视图上。
3. 右击质谱图打开快捷菜单，然后选择 **Transform Options (变换选项)**。

Transform Options (变换选项) 对话框打开。

4. 若要定义可能的最小和最大质量数，单位是 dalton，在 Mass Range (Da) (质量数范围，Da) 框内输入一个值。

有效值：0 至 400 000 Da

默认：1 Da (低值) 30 000 Da (高值)

5. 若要定义最小峰宽 (半峰高，包括所有同位素峰)，单位 dalton，在 Min Peak Width (Da) (最小峰宽，Da) 框内输入一个值。

有效值：0.1 至 50 Da

默认：从原始数据文件计算，单位是 dalton

6. 若要定义最大峰宽 (包括所有同位素峰)，单位 dalton，在 Max Peak Width (Da) (最大峰宽，Da) 框内输入一个值。

有效值：0.2 至 100 Da

默认：从原始数据文件计算

7. 若要定义变换质量数定义域中数据点之间的间隔 (单位是 dalton), 在 Mass Unit/Point (质量数单位 / 点) 框内输入一个值。  
有效值: 0 至 200 Da  
输入 **0** 使应用程序进行自动选择。  
默认: 1 Da
8. 若要设定变换质谱图信号中的最小信噪比, 在 S/N Threshold (S/N 阈值) 框内输入一个值。  
有效值: 1.01 至 100  
默认: 5
9. 若要设定变换质谱图可能导出质量数的最大数量, 在 Max No. of Species (组分的最大数量) 框内输入一个值。  
有效值: 1 至 99  
默认: 2
10. 若要指定原始质谱图中的质量数测量精度, 在 Mass Accuracy (Da) (质量数精度, Da) 框内输入一个值。  
有效值: 0.001 至 10 Da  
默认: 0.01 Da
11. 若要设定单个同位素峰的半峰宽 (单位 dalton) 或设定质谱图分辨率, 无论哪个是常量, 均可在 Isotopic Peak Width (同位素峰宽) 或 Resolution (分辨率) 框内输入一个值。  
应用程序使用这个参数通过同位素峰测定价态。  
有效值: 0.0001 至 1e+700  
默认: 从原始数据文件中读取
12. 若要选择测定价态的方法, 从 Charge Determined By (价态测定方法) 列表中选择一个选项。  
对于完整蛋白质的低分辨数据, 选择 **Charge Envelope Only (仅根据价态峰分布)** 选项。对于转换肽段或小分子量蛋白质的高分辨数据, Thermo Fisher Scientific 推荐选择 **Isotope, then Charge (先根据同位素峰, 再根据价态峰分布)**。  
有效值: Charge Envelope Only (仅根据价态峰分布); Charge Isotope Only (仅根据同位素峰分布); Charge, then Isotope (先根据价态峰, 再根据同位素峰分布); Isotope, then Charge (先根据同位素峰, 再根据价态峰分布)  
默认: Isotope, then Charge (先根据同位素峰, 再根据价态峰分布)

13. 当导入新质谱图或改变选项时，若要自动开始变换，可从 Auto Transform（自动变换）列表中选择一项。

有效值：On（开）、Off（关）

默认：On（开）

14. 若要显示零电荷质量数或 MH<sup>+</sup> 的绝对质谱图，可从 Mass Domain Charge（绝对质量的价态）列表中选择一项。

有效值：Zero-Charged（零电荷）、Protonated（MH<sup>+</sup>）（质子化，MH<sup>+</sup>）

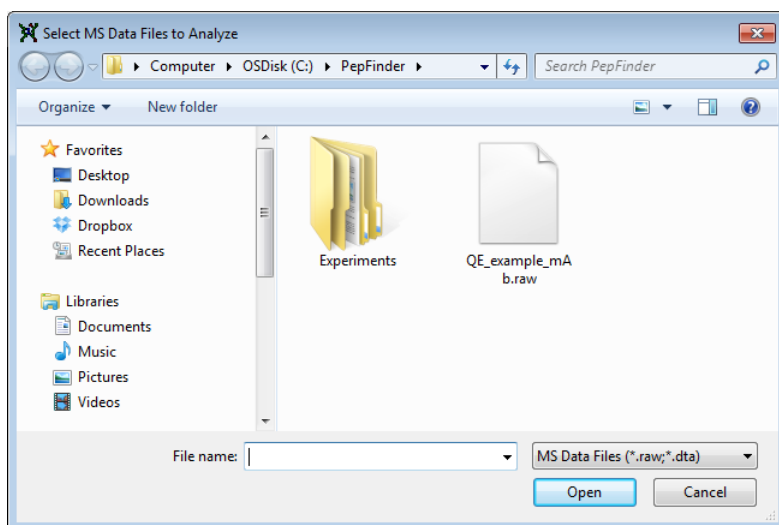
默认：Zero-Charged（零电荷）

## 载入数据文件

在打开数据文件之前，必须导入一个蛋白质序列。有关详细信息，参阅第 4 页上的“添加和修改蛋白质序列”。若没有序列，PepFinder 应用程序执行离子检测后离子列表中的条目没有识别信息。若执行初始离子检测以识别离子时没有导入序列，应导入一个序列并选择 **Actions（操作） > Identify All Ions（识别所有离子）**。

### ❖ 若要选择并载入原始数据文件

1. 在 Main（主要）窗口中点击 **Load Data Files（载入数据文件）** 打开浏览窗口。



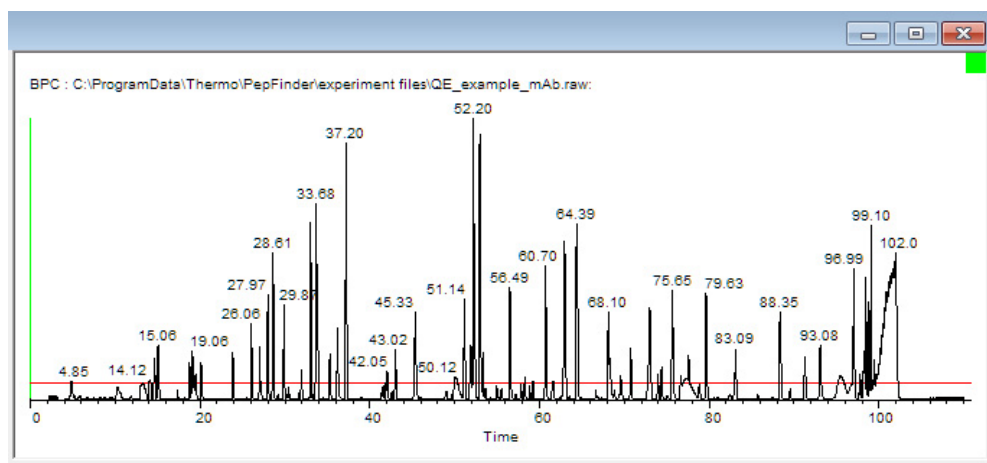
2. 浏览到保存文件的位置，然后选择 Thermo 原始数据文件进行处理。

按下 CTRL 或 SHIFT 键选择所有原始数据文件同时进行分析。

3. 点击 **Open（打开）**。

4. 应用程序打开文件后，查看 Ion List（离子列表）视图右侧显示的色谱图。

如果红线低于一般噪声水平，在处理前适当增加峰检测值。



## 处理数据

### ❖ 若要开始处理数据

1. 从 Main（主要）窗口的第一个 Task（任务）列表定义实验任务。

默认任务是 Find All Ions in the Run（找到该运行中的所有离子）。离子列表中显示每个离子的信息，包括保留时间、 $m/z$ 、MS 峰面积、电荷等。根据第 33 页上的“为离子列表设置显示选项”中的说明自定义离子列表中的信息。

如果将一个项目设定为 Task（任务）列表中的非默认指定选项，然后关闭该应用程序，则用户必须在重新打开实验查看数据之前，将 Main（主要）窗口 Task（任务）选项重置为指定选项（例如，Find All Ions in the Run [找到该运行中的所有离子]）。

可以执行其他任务：

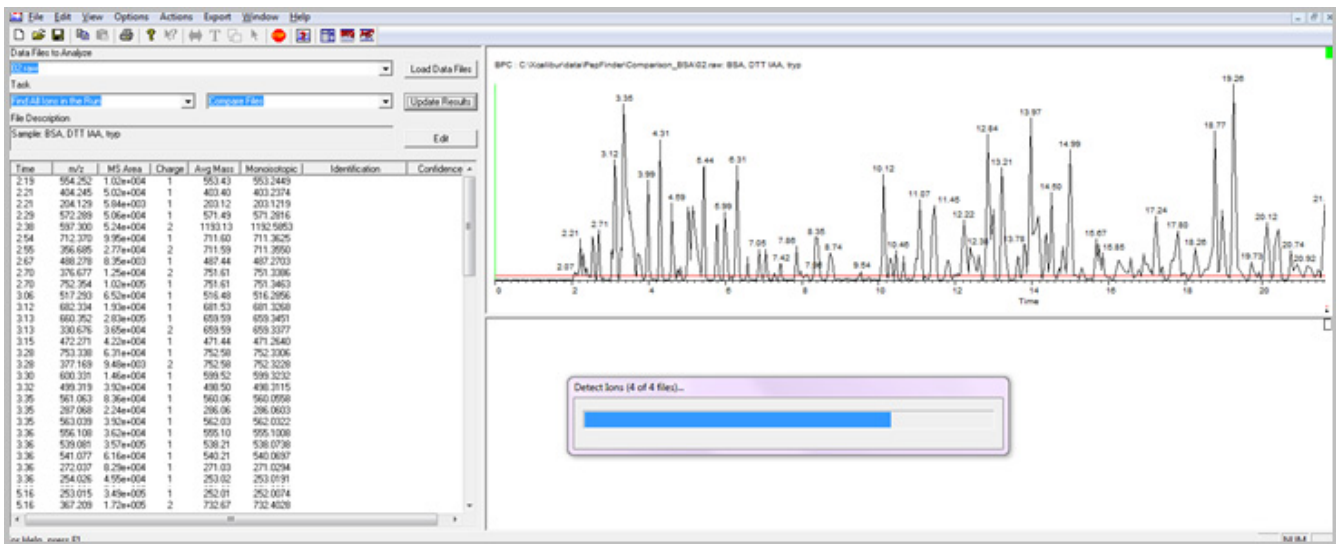
- Find all Ions in the Run（找到该运行中的所有离子）：将多个价态组合为一个条目。
- Find Peaks in the Total Ion Chromatogram（找到总离子色谱图中的峰）：检测总离子色谱图中的峰，解卷积谱图，并识别这些峰主要离子的 MS/MS 质谱图。
- Find Peaks in the Base Peak Chromatogram（找到基峰色谱图中的峰）：检测基峰色谱图中的峰，解卷积谱图，并识别这些峰主要离子的 MS/MS 质谱图。
- Find Peaks in the Analog Chromatogram（找到模拟色谱图中的峰）：检测模拟色谱图中的峰。
- Find all Ions with MS/MS（找到具有二级质谱图的所有离子）：检测具有二级质谱图的所有离子。


2. 从第二个 Task（任务）列表限制检索：

- 若要比较所有选中文件中的离子，选择 **Compare Files（比较文件）**。
- 若要单独处理文件，选择 **Process Files Separately（单独处理文件）**。
- 若要处理当前显示文件，选择 **Process Current File Only（仅处理当前文件）**。

3. 若要开始处理文件，点击应用程序 Main（主要）窗口内的 **Start Processing（开始处理）**。

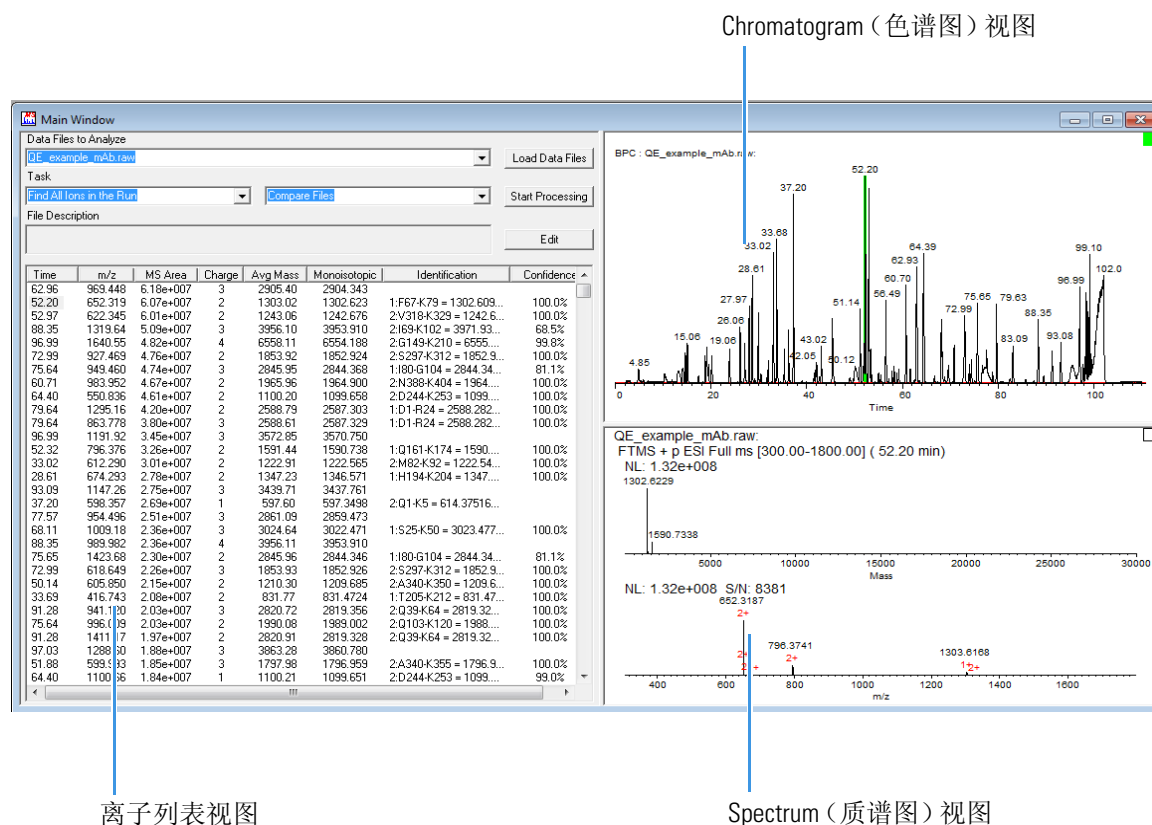
若要查看任意时间点的处理状态，点击 **Update Results（更新结果）**。可以根据需要随时点击该按钮。该应用程序更新离子列表，反映出最新检测并识别的离子。可以点击列表中的离子查看已经识别的 MS/MS 质谱图。



当需要停止最耗时的任务时，点击工具栏上的 **Stop Processing（停止处理）** 图标（）。该应用程序仍在离子列表中显示当前处理状态。

## 解析结果

在该应用程序解析完成后（每个大约需 5 至 10 分钟，取决于处理计算机），显示一个离子列表，窗口左侧是识别离子和置信度值，右侧是选中离子的 Chromatogram（色谱图）和 Spectrum（质谱图）视图。



对于查看和修改结果的信息，参阅第 2 章，“在 Main（主要）窗口中处理结果”。

## 保存实验结果

在该应用程序已完成实验处理，而且用户已经修改数据后，使用以下步骤保存结果。应用程序将该文件另存为一个 PMF 文件。若要在处理后使软件自动保存实验结果，选中 Data Processing Options（数据处理选项）对话框中的 **PepFinder PMF** 复选框。有关详细信息，参阅第 19 页上的“自动生成报告”。

### ❖ 若要保存实验结果

1. 若要在新名称下保存文件，可选择 **File（文件） > Save As（另存为）**。
2. 点击 **OK（确定）**。

– 或 –

- 若要覆盖该实验的旧文件，可选择 **File（文件） > Save（保存）**。



## 在 Main（主要）窗口中处理结果

PepFinder 应用程序完成数据处理后，在 Main（主要）窗口中显示处理信息。

### 目录

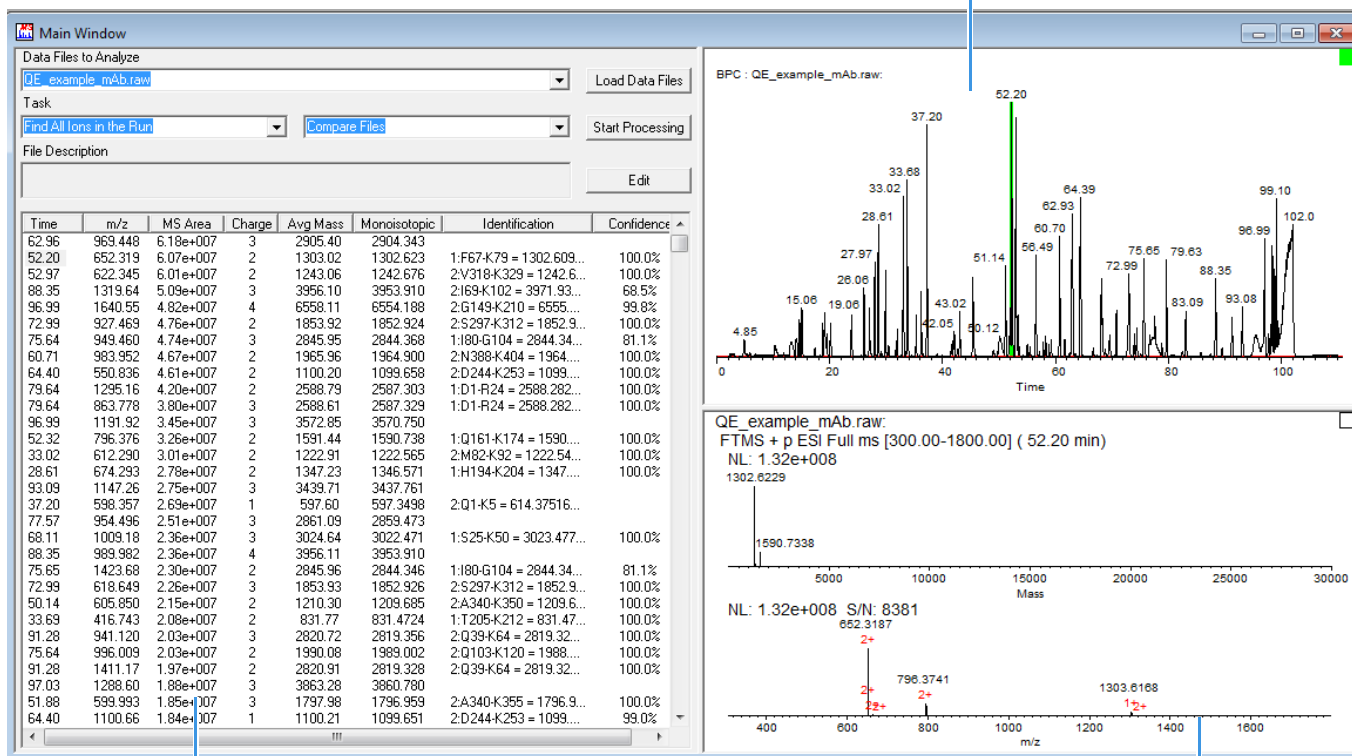
- [在 Main（主要）窗口中查看结果](#)
- [编辑 Main（主要）窗口内容](#)
- [使用 De Novo 测序识别组分](#)
- [处理实验结果](#)

Main（主要）窗口包括三个视图区域（参阅下一页上的图）。左侧视图显示离子列表。其他两个视图显示色谱图和质谱图。使用色谱图和质谱图视图手动分析数据（类似于 Xcalibur™ Qual Browser [Xcalibur™ 定性浏览器] 应用程序）。



## 2 在 Main（主要）窗口中处理结果

Chromatogram（色谱图）视图



离子列表视图

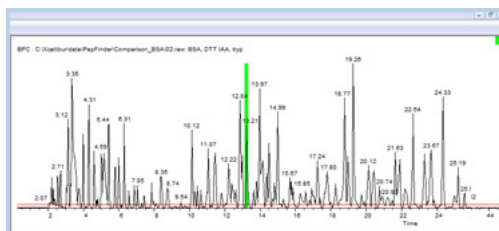
Spectrum（质谱图）视图

若要访问 PepFinder 应用程序菜单的一些命令，必须在特定区域中进行，比如 Main（主要）窗口的 Spectrum（质谱图）视图。

### ❖ 若要激活一个区域

执行下列操作之一：

- 点击右上角的方框。这个方框变绿，应用程序会相应地改变菜单选项。



绿色方框

– 或 –

- 选择一个目标，或将光标置于要激活的区域。

## 在 Main（主要）窗口中查看结果

❖ 若要打开 Sequence（序列）窗口

选择 View（视图） > Sequence Window（序列窗口），或点击 。

❖ 若要打开肽段 MS/MS Spectrum（MS/MS 质谱图）窗口

选择 View（视图） > MS/MS Window（MS/MS 窗口），或点击 。

❖ 若要显示或隐藏工具栏

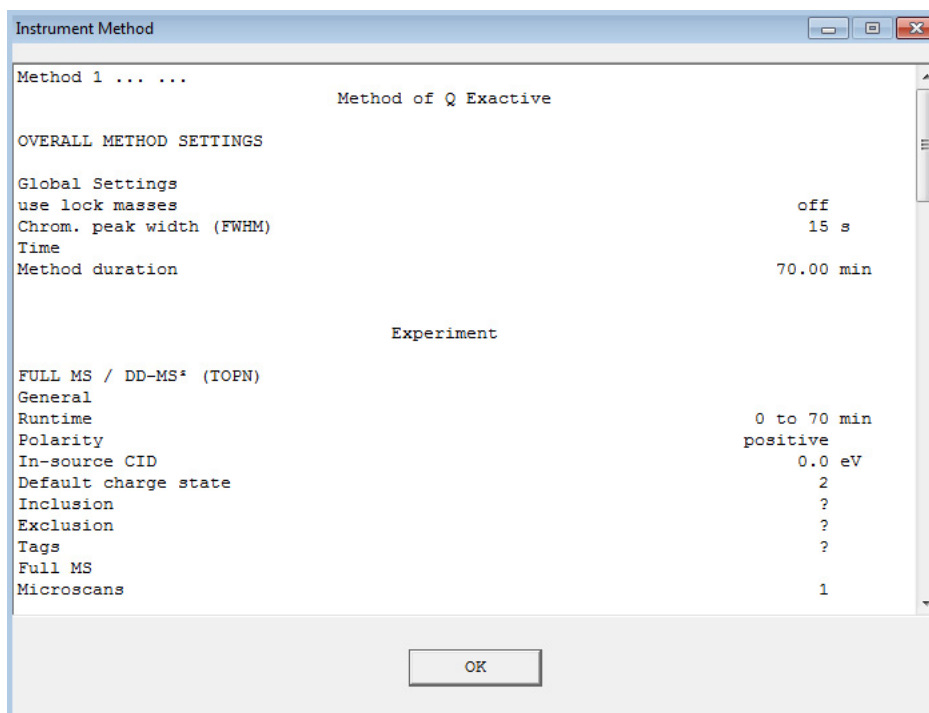
选择 View（视图） > Toolbar（工具栏）。

❖ 若要显示或隐藏状态栏

选择 View（视图） > Status Bar（状态栏）。

❖ 若要显示仪器方法

1. 若要查看仪器方法，点击离子列表视图将其激活。
2. 选择 View（视图） > Instrument Method（仪器方法）。



## 编辑 Main（主要）窗口内容

若要查看 Ion List（离子列表）视图、Chromatogram（色谱图）视图和 Spectrum（质谱图）视图中的结果数据，可执行以下程序。

- 处理 Ion List（离子列表）视图
- 处理 Chromatogram（色谱图）视图
- 处理 Spectrum（质谱图）视图

## 处理 Ion List（离子列表）视图

若要在 Ion List（离子列表）视图内检索和修改，可执行以下程序。

- 复制离子列表
- 检索离子列表
- 查看和修改指定离子
- 为离子列表设置显示选项

### 复制离子列表

#### ❖ 若要将某个项目的离子列表复制到 Clipboard（剪贴板）

1. 在 Main（主要）窗口中打开该项目，并选择 **Edit（编辑） > Copy Ion List（复制离子列表）**。

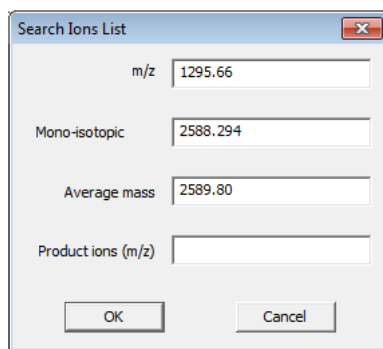
该应用程序将离子列表复制至 Clipboard（剪贴板）。

2. 打开一个文件并将列表粘贴进去。
3. 保存文件。

## 检索离子列表

### ❖ 若要检索离子列表

1. 从查看显示上选择 **Actions (操作) > Search Ion List (检索离子列表)** 显示 Search Ions List (检索离子列表) 对话框。



Field	Value
m/z	1295.66
Mono-isotopic	2588.294
Average mass	2589.80
Product ions (m/z)	

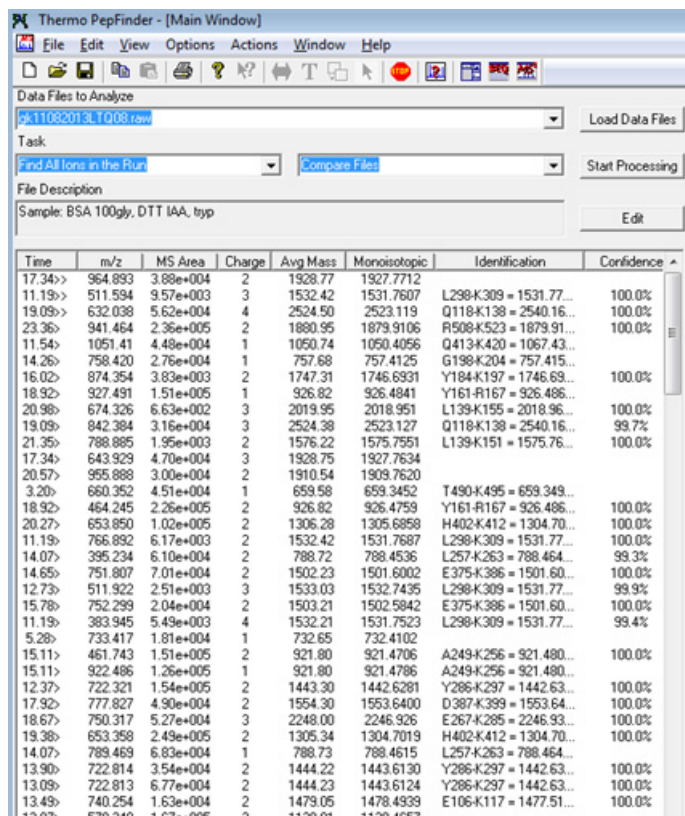
使用该对话框检索离子列表，寻找具有特定属性的离子。

2. 输入子离子的  $m/z$  值，数值之间由逗号分隔开（例如，**345.6,789.1,345.7**）。  
该应用程序在保留时间后面标记已识别的离子。
3. 输入单同位素质量数和平均质量数。
4. 点击 **OK (确定)** 开始检索。

## 2 在 Main（主要）窗口中处理结果

编辑 Main（主要）窗口内容

如果找到匹配，应用程序会在时间右侧放上 >>。



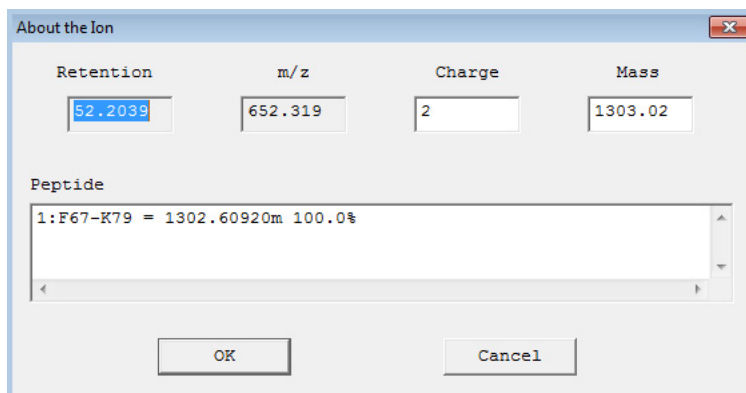
The screenshot shows the Thermo PepFinder software interface. The main window displays a table of ion data with columns for Time, m/z, MS Area, Charge, Avg Mass, Monoisotopic, Identification, and Confidence. The table contains multiple rows of data, with some rows having a '>>' symbol next to the Time column, indicating a match. The software interface includes a menu bar (File, Edit, View, Options, Actions, Window, Help), a toolbar, and a 'Data Files to Analyze' section with a dropdown menu and a 'Load Data Files' button. The 'Task' section has a dropdown menu set to 'Find All Ions in the Run' and a 'Compare Files' button. The 'File Description' section shows 'Sample: BSA 100gly, DTT IAA, ttyp' and an 'Edit' button.

Time	m/z	MS Area	Charge	Avg Mass	Monoisotopic	Identification	Confidence
17.34>	964.893	3.88e+004	2	1928.77	1927.7712		
11.19>	511.594	9.57e+003	3	1532.42	1531.7607	L298-K309 = 1531.77...	100.0%
19.09>	632.038	5.62e+004	4	2524.90	2523.119	Q118-K138 = 2540.16...	100.0%
23.36>	941.464	2.36e+005	2	1880.95	1879.9106	R508-K523 = 1879.91...	100.0%
11.54>	1051.41	4.48e+004	1	1050.74	1050.4056	Q413-K420 = 1067.43...	
14.26>	758.420	2.76e+004	1	757.68	757.4125	G198-K204 = 757.415...	
16.02>	874.354	3.83e+003	2	1747.31	1746.6931	Y184-K197 = 1746.69...	100.0%
18.92>	927.491	1.51e+005	1	926.82	926.4841	Y161-R167 = 926.486...	
20.98>	674.326	6.63e+002	3	2019.95	2018.951	L139-K155 = 2018.96...	100.0%
19.09>	842.384	3.16e+004	3	2524.98	2523.127	Q118-K138 = 2540.16...	99.7%
21.35>	788.885	1.95e+003	2	1576.22	1575.7551	L139-K151 = 1575.76...	100.0%
17.34>	643.929	4.70e+004	3	1928.75	1927.7634		
20.57>	955.888	3.00e+004	2	1910.54	1909.7620		
3.20>	660.352	4.51e+004	1	659.58	659.3452	T490-K495 = 659.349...	
18.92>	464.245	2.26e+005	2	926.82	926.4759	Y161-R167 = 926.486...	100.0%
20.27>	653.850	1.02e+005	2	1306.28	1305.6858	H402-K412 = 1304.70...	100.0%
11.19>	766.892	6.17e+003	2	1532.42	1531.7687	L298-K309 = 1531.77...	100.0%
14.07>	395.234	6.10e+004	2	788.72	788.4536	L257-K263 = 788.464...	99.3%
14.65>	751.807	7.01e+004	2	1502.23	1501.6002	E375-K386 = 1501.60...	100.0%
12.73>	511.922	2.51e+003	3	1533.03	1532.7435	L298-K309 = 1531.77...	99.9%
15.78>	752.299	2.04e+004	2	1503.21	1502.5842	E375-K386 = 1501.60...	100.0%
11.19>	383.945	5.49e+003	4	1532.21	1531.7523	L298-K309 = 1531.77...	99.4%
5.28>	733.417	1.81e+004	1	732.65	732.4102		
15.11>	461.743	1.51e+005	2	921.80	921.4706	A249-K256 = 921.480...	100.0%
15.11>	922.486	1.26e+005	1	921.80	921.4786	A249-K256 = 921.480...	
12.37>	722.321	1.54e+005	2	1443.30	1442.6281	Y286-K297 = 1442.63...	100.0%
17.92>	777.827	4.90e+004	2	1554.30	1553.6400	D387-K399 = 1553.64...	100.0%
18.67>	750.317	5.27e+004	3	2248.00	2246.926	E267-K285 = 2246.93...	100.0%
19.38>	653.358	2.49e+005	2	1305.34	1304.7019	H402-K412 = 1304.70...	100.0%
14.07>	789.469	6.83e+004	1	788.73	788.4615	L257-K263 = 788.464...	
13.90>	722.814	3.54e+004	2	1444.22	1443.6130	Y286-K297 = 1442.63...	100.0%
13.09>	722.813	6.77e+004	2	1444.23	1443.6124	Y286-K297 = 1442.63...	100.0%
13.49>	740.254	1.63e+004	2	1479.05	1478.4939	E106-K117 = 1477.51...	100.0%
13.92>	670.340	1.67e+006	2	1128.81	1128.4657		

### 查看和修改指定离子

#### ❖ 若要查看特定离子信息

1. 在离子列表中双击离子保留时间，显示 About the Ion（关于离子）对话框。

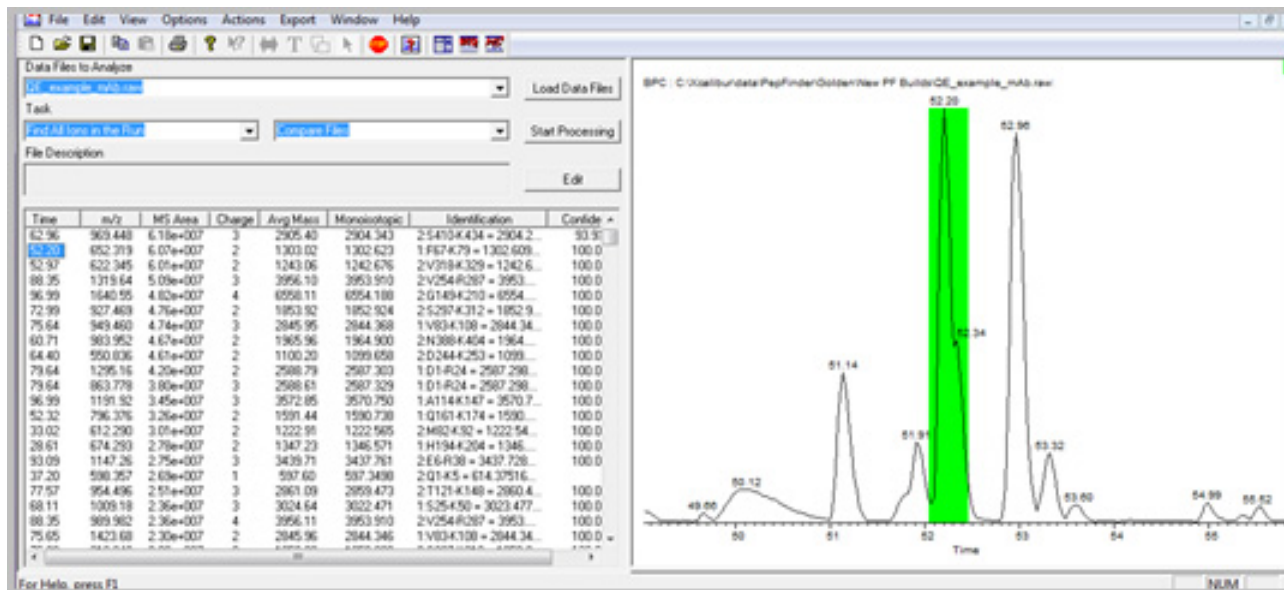


2. 若要修改电荷和质量数，在对应框内输入一个新值。  
还可以在 Peptide（肽段）区域内增加、修改或删除信息。
3. 单击 **OK（确定）** 保存更改并关闭对话框。

### ❖ 若要识别离子

1. 若要手动处理单个离子，右击目标离子的保留时间，打开快捷菜单。

该应用程序在色谱图中用绿色高亮显示离子位置。



2. 选择 **Identify/Re-identify This Ion (识别 / 重新识别该离子)**。

该应用程序定义离子列表中 Identification (识别) 列的分子式。

当选择 Start Processing (开始处理) 处理实验时，该应用程序根据所有可用信息识别肽段，包括所有文件中同一离子的 MS/MS 信息，同一肽段不同价态的 MS/MS 数据等。

但是，当选择 Identify/Re-identify This Ion (识别 / 重新识别该离子) 时，应用程序只查看特定文件中所选母离子的 MS/MS 信息。若该离子没有 MS/MS 数据，则其置信度分数会改变或者彻底消失。

### ❖ 若要从 Identification (识别) 域移除数据

1. 选择离子保留时间。
2. 右击并选择 **Remove Identification (移除识别)**。

应用程序移除该信息。

## 为离子列表设置显示选项

若要修改离子列表内的显示选项，并对离子列表排序，可执行以下程序。

- 若要查看离子列表
- 若要对离子列表中的离子排序
- 若要选择离子属性

## 2 在 Main（主要）窗口中处理结果

编辑 Main（主要）窗口内容

- 若要修改范围显示
- 若要定量特定离子内的降解
- 若要定量结果文件内的降解

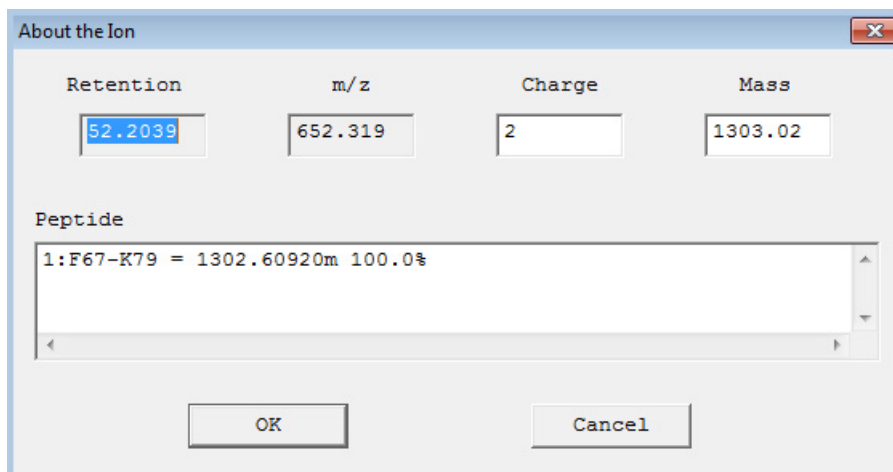
### ❖ 若要查看离子列表

1. 若要更新 Chromatogram（色谱图）视图、Spectrum（质谱图）视图、MS/MS 窗口和 Sequence（序列）窗口上的离子，并点击保留时间。

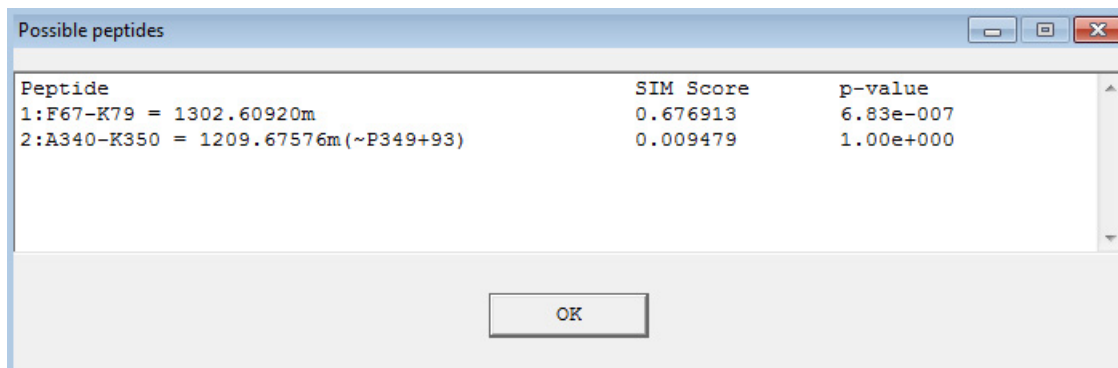
为所选离子（匹配过滤器和背景扣除）的信噪比优化 Spectrum（质谱图）视图中显示的质谱图。

2. 若要显示更多离子信息，双击保留时间。

可以编辑某些域。



3. 若要对单个离子进行归属，右击保留时间并从快捷菜单中选择 **Explore Possible Peptides（查找可能的肽段）**。



❖ 若要对离子列表中的离子排序

1. 若要查看 Main (主要) 窗口中的离子排序选项, 选择 **Options (选项) > Display Options (显示选项) > Sort Ions By... (离子排序按照 .....**)

也可以使用每列顶部的排序按钮按照离子属性对离子列表进行排序。点击离子列表中的任意条目的保留时间, 查看色谱图中离子的位置, 离子的全扫描质谱图及其解卷积质谱图。

2. 从列表选项中选择。
  - 若要按质荷比对离子列表排序, 可选择 *m/z*。
  - 若要对离子列表峰高排序, 可选择 **MS Peak Height (MS 峰高)**。
  - 若要对离子列表峰面积排序, 可选择 **MS Peak Area (MS 峰面积)**。
  - 若要对离子列表质量数排序, 可选择 **Mass (质量数)**。
  - 若要按离子位置从 N 到 C 对离子列表进行排序, 可选择 **Identification (识别)**。
  - 若要按置信度从高到低对离子列表进行排序, 可选择 **Confidence (置信度)**。
  - 若要列出标记的离子, 可选择 **Flag (标记)**。

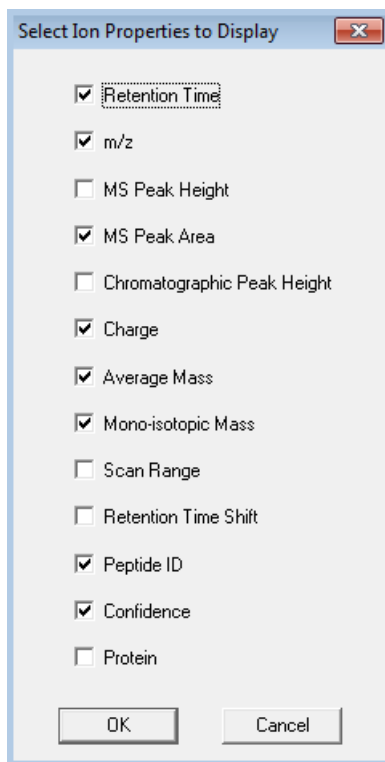
当 MS 峰面积明显不同时, 该应用程序标记来自不同文件的同一离子。



❖ 若要选择离子属性

1. 若要查看 Main（主要）窗口中的离子排序选项，选择 **Options（选项） > Display Options（显示选项） > Select Ion Properties to Display（选择要显示的离子属性）**。

Select Ion Properties to Display（选择要显示的离子属性）对话框打开。可以选择该应用程序要显示的属性。



2. 选择要在 Ion List（离子列表）视图中显示的特性，并清除要隐藏的特性。
3. 点击 **OK（确定）**。

❖ 若要修改范围显示

1. 选择一个离子保留时间并在 Spectrum（质谱图）视图中点击绿色方框。
2. 若要显示范围对话框，右击质谱图并选择 **Mass Range（质量数范围）**。  
该应用程序显示 Mass Range Information（质量数范围信息）对话框。
3. 在合适的区域内输入范围起始和结束值。
4. 点击 **OK（确定）**。

❖ 若要定量特定离子内的降解

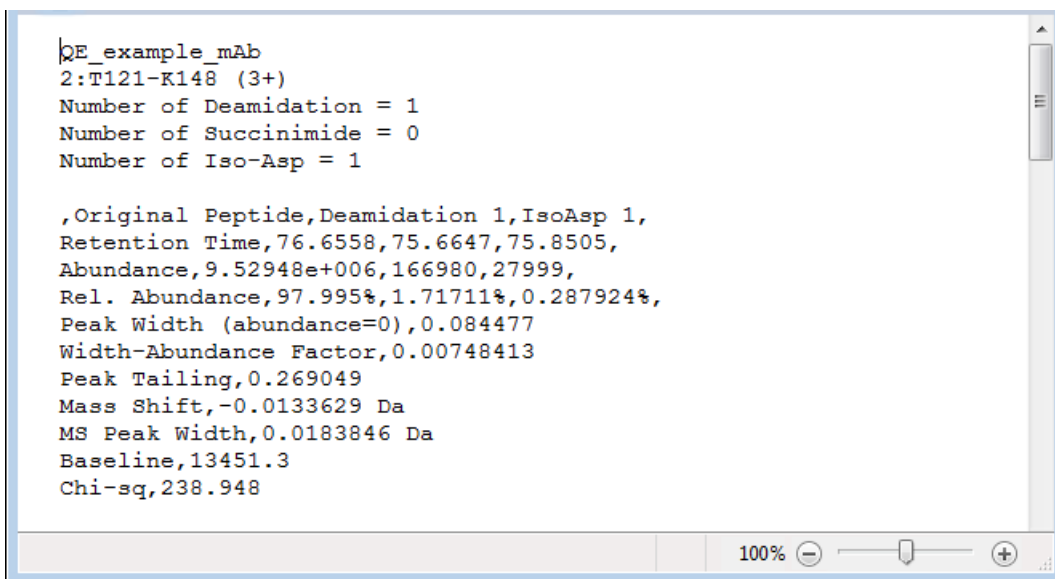
1. 若要定量脱酰胺后残基的降解量，右击离子保留时间并选择 **Quantify Deamidation (定量脱酰胺)**。
2. 选择一个未修饰的肽段，即只包括碱基序列信息（无黏附）的肽段，包括 N 或者 Q。

该应用程序将数据写入文本文件，并将其保存在标准 PepFinder 文件位置中。该文件名称包括原始数据文件名、肽段序列和价态。

❖ 若要定量结果文件内的降解

若要定量脱酰胺后生成残基的降解量，可选择 **Actions (操作) > Quantify Deamidation/Isomerization (定量脱酰胺 / 同分异构)**。

如下例所示，应用程序将每个肽段的数据写入文本文件，并将其保存在标准 PepFinder 文件位置中。该文件名称包括原始数据文件名、肽段序列和价态。



The screenshot shows a text window with the following content:

```
QE_example_mAb  
2:T121-K148 (3+)  
Number of Deamidation = 1  
Number of Succinimide = 0  
Number of Iso-Asp = 1  
  
,Original Peptide,Deamidation 1,IsoAsp 1,  
Retention Time,76.6558,75.6647,75.8505,  
Abundance,9.52948e+006,166980,27999,  
Rel. Abundance,97.995%,1.71711%,0.287924%,  
Peak Width (abundance=0),0.084477  
Width-Abundance Factor,0.00748413  
Peak Tailing,0.269049  
Mass Shift,-0.0133629 Da  
MS Peak Width,0.0183846 Da  
Baseline,13451.3  
Chi-sq,238.948
```

The window has a scrollbar on the right and a status bar at the bottom showing 100% zoom.

## 处理 Chromatogram（色谱图）视图

若要在 Chromatogram（色谱图）视图内修改，可执行这些程序。

- 若要截取色谱图
- 若要修改 Chromatogram（色谱图）视图
- 若要恢复色谱图的完整范围
- 若要标记峰

### ❖ 若要截取色谱图

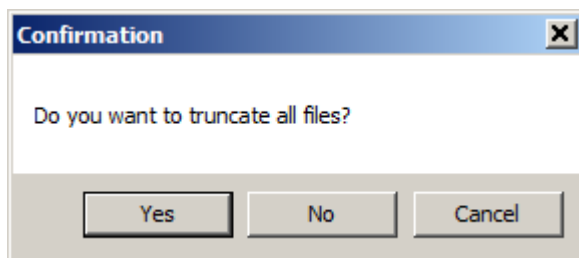
1. 选择离子保留时间。

若要截取色谱图，将显示范围缩减成一个合适的区域。截取色谱图后，该应用程序不处理任何已识别有效区域以外的任何信息。

2. 将显示窗口缩小为要处理的宽度。

3. 选择 **Edit（编辑） > Truncate Chromatogram（截取色谱图）**。

该应用程序显示一个警告：



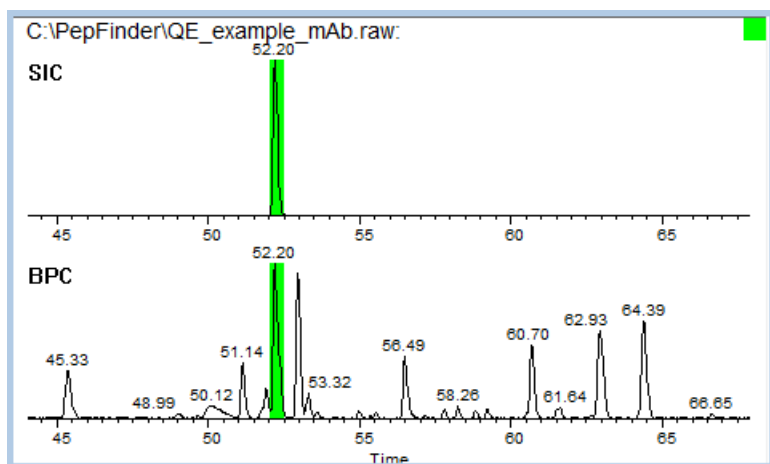
4. 点击 **Yes（是）**，截取所有打开文件中的色谱图。

若要重置色谱图，参阅“若要恢复色谱图的完整范围”。

### ❖ 若要修改 Chromatogram (色谱图) 视图

点击右上角的方框激活该区域, 选择下列选项之一修改该区域。

- 若要缩放色谱图, 可拖曳激活的区域。双击使色谱图返回原始尺寸。
- 若要显示所选时间范围的平均质谱图, 点击 Spectrum (质谱图) 视图的绿色方框, 并在激活的 Spectrum (质谱图) 视图上方拖动光标。当在单离子色谱图 (SIC) 中拖动光标时, 该应用程序为最佳离子信噪比应用一个匹配的过滤器, 并自动调整模拟信号和 MS 信号之间的时间延迟。
- 右击打开一个快捷菜单, 在此可以选择要显示的色谱图类型, 从 Clipboard (剪贴板) 粘贴一个外部色谱图等。



### ❖ 若要恢复色谱图的完整范围

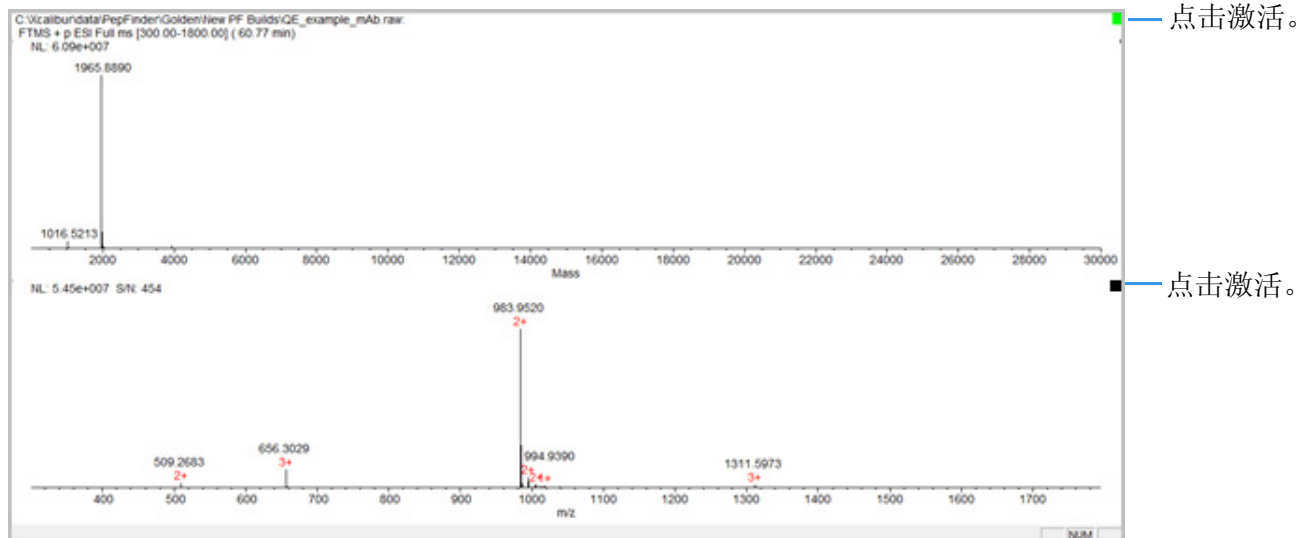
1. 选择离子保留时间。
2. 选择 **Edit (编辑) > Reset Chromatogram to Full Range (将色谱图重置为完整范围)**。

## 2 在 Main（主要）窗口中处理结果

编辑 Main（主要）窗口内容

### ❖ 若要标记峰

1. 若要在 Main（主要）窗口中选择峰标签的方法，点击上方质谱图视图的绿色方框将其激活，或点击下方质谱图视图的黑色方框将该视图激活。



2. 选择 **Options（选项） > Display Options（显示选项） > Peak Label（峰标签）**。
3. 从 **Peak Top（峰顶）** 或 **Centroid（棒状图）** 选择，并点击 **OK（确定）** 修改标签。

该应用程序将正确的峰标签放在峰上。

## 修改色谱图选项

使用该部分的程序修改色谱图显示或值。

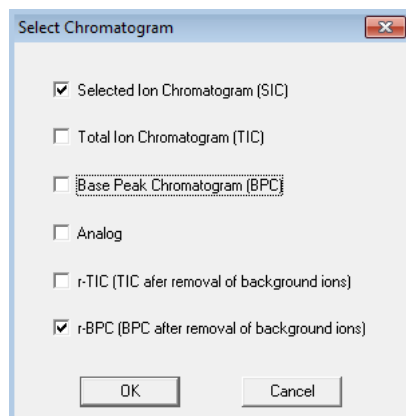
- 若要选择要显示的色谱图类型
- 若要定义时间范围
- 若要修改标签上的字体大小或样式
- 若要在色谱图上添加标签

### ❖ 若要选择要显示的色谱图类型

1. 选择离子保留时间并右击 Chromatogram（色谱图）窗口。

可以在结果窗口中选择查看一个或多个色谱图类型。

2. 选择 **Select Chromatogram (选择色谱图)** 显示色谱图选项。



3. 选择一个或多个色谱图选项。

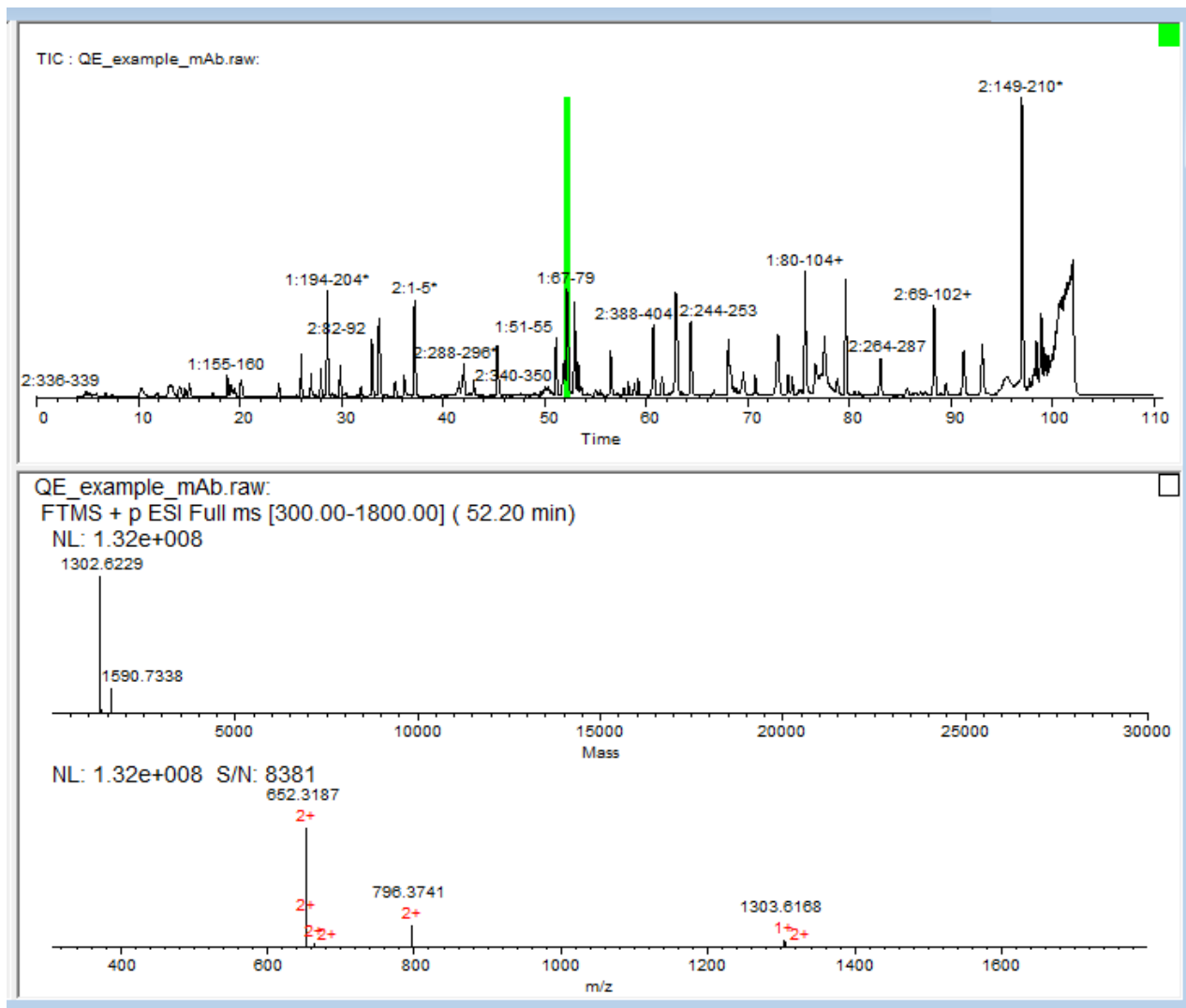
该色谱图窗口一次最多显示 6 个选项。可以查看指定组分的 SIC，并查看检测到的所有组分。处理得到最可靠信息之后，立刻执行下列步骤。

选中下列选项的对应复选框：

- 单离子色谱图 (SIC)
- 总离子色谱图 (TIC)
- 基峰色谱图 (BPC)
- 质谱仪接收的模拟信号
- 移除了背景离子和弱信号离子 (低于阈值) 的 TIC
- 移除了背景离子和弱信号离子 (低于阈值) 的 BPC

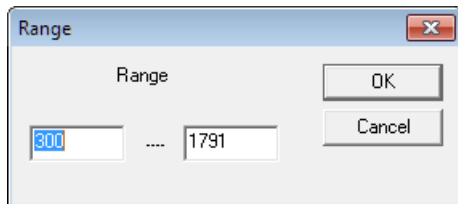
**2 在 Main（主要）窗口中处理结果**  
编辑 Main（主要）窗口内容

4. 点击 **OK（确定）** 显示做出的选择。



❖ 若要定义时间范围

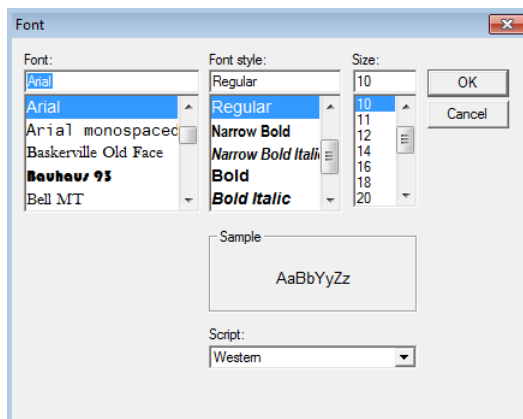
1. 选择离子并右击色谱图窗口。
2. 选择 **Time Range (时间范围)** 显示 Range (范围) 对话框。



3. 输入一个新的时间范围 (开始或结束, 或两者) 并点击 **OK (确定)**。

❖ 若要修改标签上的字体大小或样式

1. 选择离子保留时间并右击色谱图窗口。
2. 选择 **Font (字体)** 显示字体选项。
3. 从显示的字体、字体样式和大小中选择。
4. 点击 **OK (确定)**。

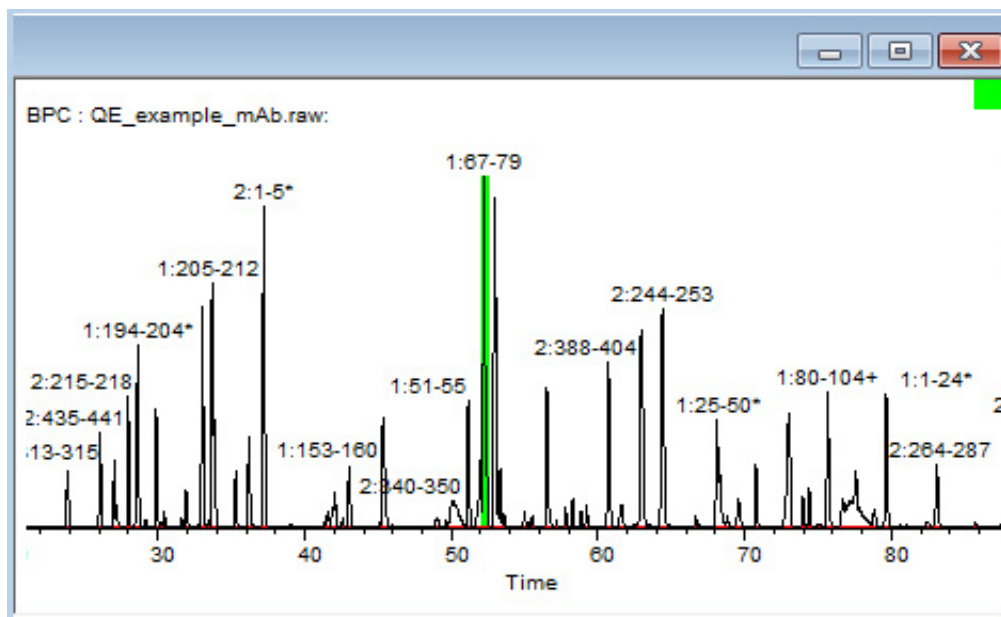




❖ 若要在色谱图上添加标签

1. 选择离子保留时间并右击色谱图窗口。
2. 选择 **Label（标签）** 显示标签选项列表。
3. 选择 **Retention Time（保留时间）**、**Mass（质量数）** 或 **Peptide（肽段）**，以在色谱图上显示其标签。

当选择 Peptide（肽段）时，该应用程序将星号（\*）放在所有已修饰组分的标签旁边，将加号（+）放在非特定肽段的旁边。



## 复制色谱数据

❖ 若要复制色谱数据进行比较或替换另一个色谱图

1. 右击色谱图窗口，然后选择 **Copy Chromatogram Data（复制色谱数据）**。
2. 选择要修改的离子保留时间，并选择 **Paste External Chromatogram（粘贴外部色谱图）**。

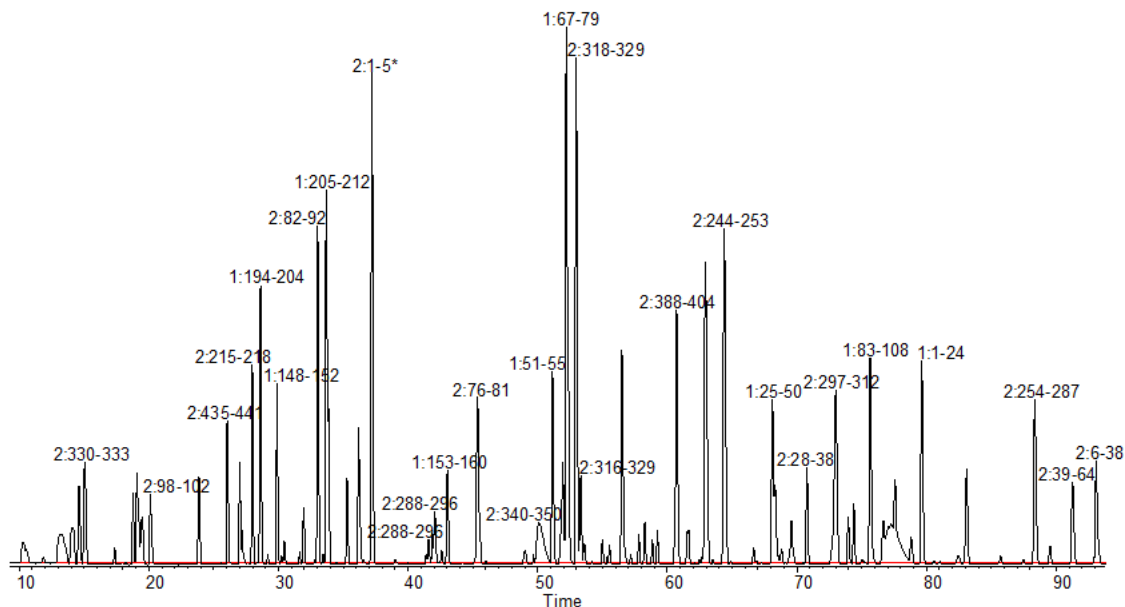
如果粘贴的色谱图和所选离子是一个类型，则粘贴的色谱图替换离子色谱图。如果是不同类型的色谱图，则应用程序在色谱图窗口中显示两者。

## 复制色谱图

### ❖ 若要复制色谱图用于外部显示

1. 右击显示单个色谱图的窗口，并选择 **Copy Chromatogram Image (复制色谱图)**。
2. 打开第三方软件并将色谱图粘贴进去。


BPC : C:\Xcalibur\data\PepFinder\Golden\New PF Builds\QE\_example\_mAb.raw:



使用该功能将色谱图复制粘贴到第三方软件，用于报告或记录。可以标记含识别肽段的色谱图（参阅第 44 页上的“[若要在色谱图上添加标签](#)”）。但是，该功能只处理基峰色谱图，不会复制单离子色谱图。

该功能可用于所有色谱图类型，只要只显示一个色谱图。

## 处理 Spectrum (质谱图) 视图

PepFinder Main (主要) 页面的 Spectrum (质谱图) 视图的底部质谱图显示横坐标为  $m/z$  的质谱图。顶部质谱图显示横坐标为质量数的质谱图。使用工具栏中的移动图标  移动两个区域，并通过移动角上的方框调节尺寸。

当通过 Main (主要) 窗口中的 MS/MS Data (MS/MS 数据) 菜单载入一些质谱图时，按下 UP 和 DOWN 箭头键查看这些质谱图。

当每次点击 Main (主要) 窗口的离子列表中某个条目的保留时间时，该应用程序自动更新 MS/MS 窗口。窗口中自动显示的二硫键只是该应用程序的一个示例，不一定是正确的键。还可以从任意 MS 数据系统中将强度列表手动复制到 Clipboard (剪贴板)，并将质谱图粘贴到 MS/MS 窗口中进行分析。

- [修改 Spectrum \(质谱图\) 视图](#)
- [修改质谱图信息](#)

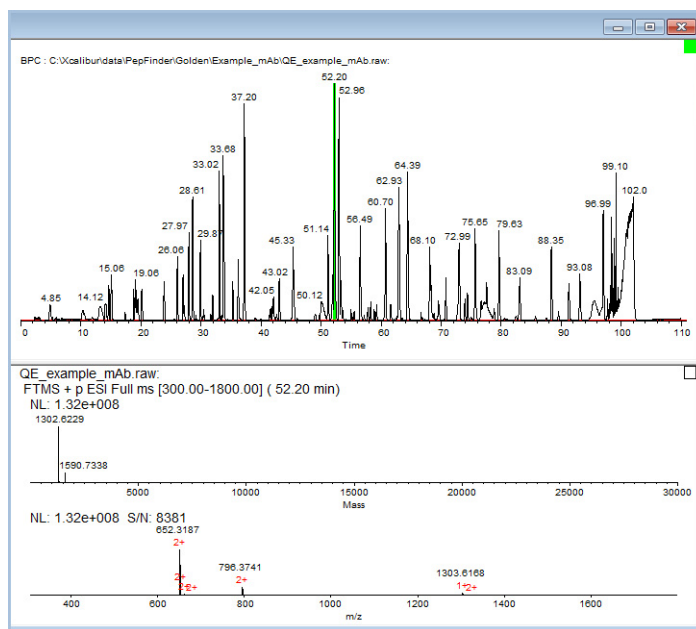
## 修改 Spectrum（质谱图）视图

使用该部分的程序修改 Spectrum（质谱图）视图。

- 若要查看质谱图组分值
- 若要放大质谱图
- 若要显示全扫描质谱图
- 若要显示所有文本对象
- 若要在已显示质谱图中显示离子峰列表
- 若要查看质谱图的特定质量数范围
- 若要更改质谱图线宽
- 若要复制质谱图进行比较
- 若要打印 Spectrum（质谱图）视图

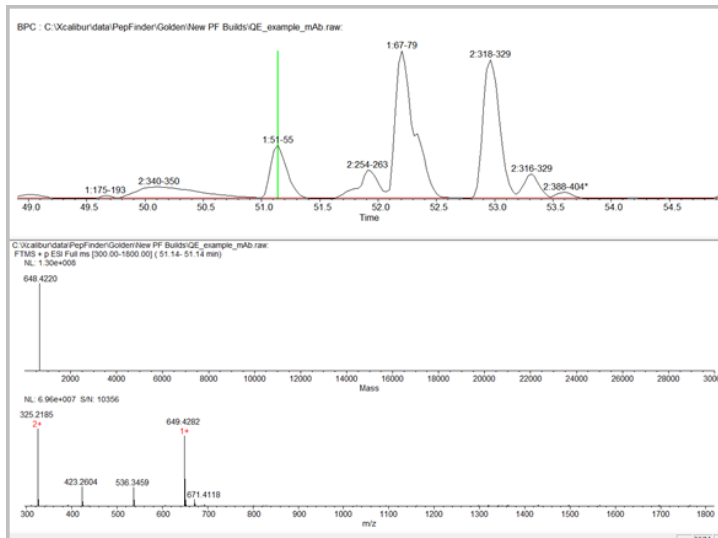
### ❖ 若要查看质谱图组分值

选择一个保留时间条目，以便查看质谱图。



❖ 若要放大质谱图

1. 点击 Spectrum (质谱图) 视图使其成为当前视图。
2. 沿着目标区域拖曳光标，放大质谱图。



❖ 若要显示全扫描质谱图

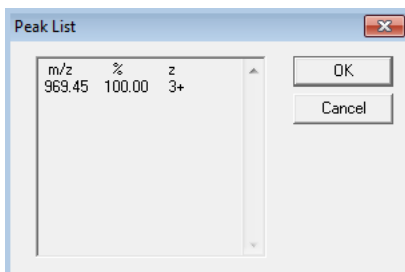
1. 若要缩小 Spectrum (质谱图) 视图，先使 Spectrum (质谱图) 视图成为当前视图。
2. 选择 **View (视图) > Full Scan (全扫描)**。

❖ 若要显示所有文本对象

1. 若要显示所有文本对象，包括隐藏的文本，先激活 Spectrum (质谱图) 视图。
2. 选择 **View (视图) > Show All Texts (显示所有文本)**。

❖ 若要在已显示质谱图中显示离子峰列表

1. 激活 Spectrum (质谱图) 视图。
2. 选择 **View (视图) > Peak List in the Spectrum (质谱图中的峰列表)**。

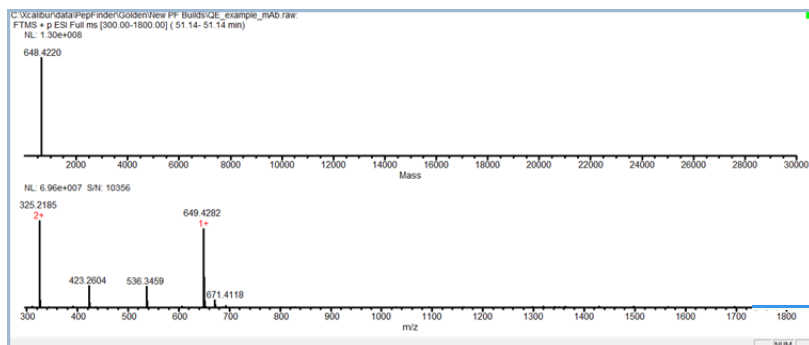


❖ 若要查看质谱图的特定质量数范围

1. 选择离子保留时间。
2. 在 MS/MS 窗口中右击质谱图并选择 **Mass Range（质量数范围）**。  
Range（范围）对话框打开。
3. 输入质量数范围。
4. 点击 **OK（确定）** 修改质量数范围。

❖ 若要更改质谱图线宽

1. 若要修改质谱图上的线宽以方便查看，右击并选择 **Line Width（线宽）**。
2. 在该对话框中输入一个值，然后单击 **OK（确定）**。  
该应用程序将质谱图显示修改为新的线宽。



更粗的线宽

❖ 若要复制质谱图进行比较

1. 在质谱图视图中，选择一个离子保留时间。
2. 选择一个扫描图，右击并选择 **Copy Spectrum（复制质谱图）**。

❖ 若要打印 Spectrum（质谱图）视图

1. 右击该质谱图。
2. 选择 **Print（打印）**。

## 修改质谱图信息

根据需要使用以下程序。

- 若要修改 **Spectrum（质谱图）** 视图
- 若要在 **Spectrum（质谱图）** 视图中添加文本
- 若要截取质谱图
- 若要显示剩余的质谱图

- 若要平滑原始质谱图
- 若要识别该质谱图对应的肽段
- 若要修改质谱图标题
- 若要从质谱图创建质量数列表
- 若要导出主要或辅助质谱图的强度列表

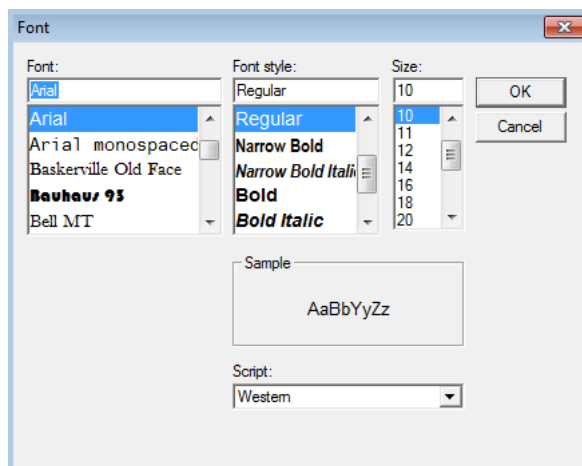
❖ 若要修改 Spectrum (质谱图) 视图

点击右上角的方框激活该区域，使用下列选项之一：

- 若要放大视图，在质谱图上拖动光标。
- 若要返回原始质谱图，双击 Spectrum (质谱图) 视图。
- 若要显示所选范围的 SIC，在当前色谱图区域拖动光标。
- 右击打开一个快捷菜单，在此可以修改转换选项，显示缩放扫描等。参阅第 89 页上的“在 MS/MS 窗口中修改 Spectrum (质谱图) 视图”。

❖ 若要在 Spectrum (质谱图) 视图中添加文本

1. 点击工具栏上的 **Insert Text (插入文本)** 图标 (**T**)。
2. 双击文本进行编辑，或拖动文本进行移动。
3. 若要修改某个区域的字体，右击该区域并从快捷菜单中选择 **Font (字体)**。

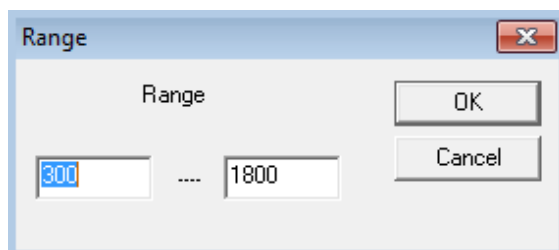


4. 选择字体选项并单击 **OK (确定)**。
5. 若要隐藏插入的字体，右击该文本并选择 **Hide (隐藏)**。

❖ 若要截取质谱图

1. 选择 **Edit（编辑） > Truncate Spectra（截取质谱图）**。

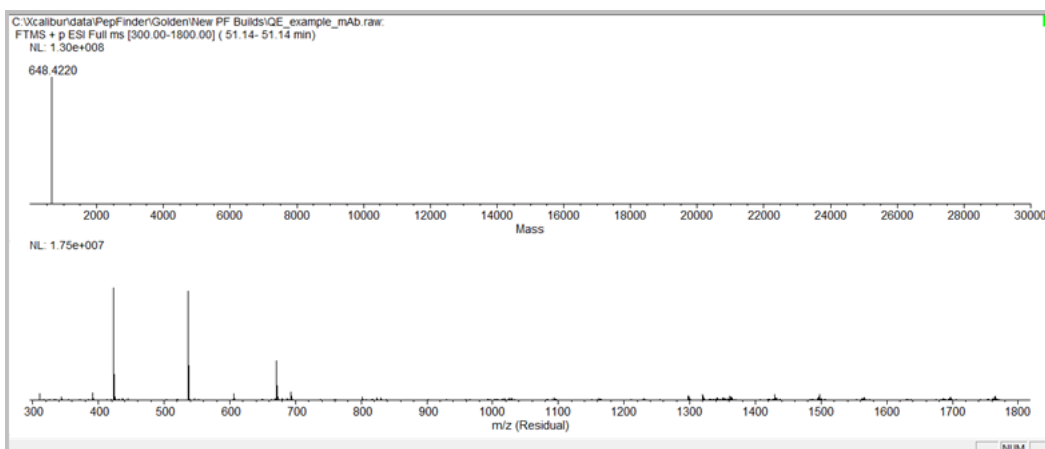
Range（范围）对话框打开。



2. 修改范围值，以显示目标区域。
3. 若要截取所有质谱图，点击确认对话框内的 **OK（确定）**。

❖ 若要显示剩余的质谱图


1. 在 Spectrum（质谱图）视图内的解卷积完成后，激活 Spectrum（质谱图）视图。
2. 选择 **View（视图） > Residual Spectrum（剩余的质谱图）** 在 Spectrum（质谱图）视图底部显示剩余的质谱图。

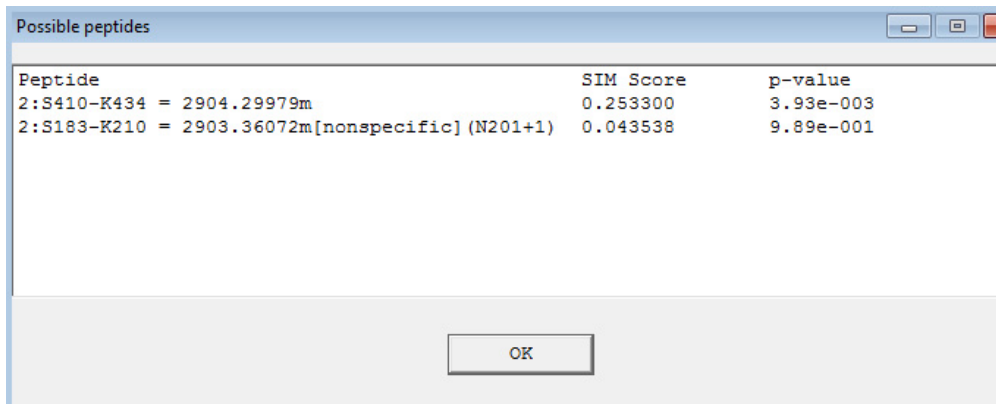


❖ 若要平滑原始质谱图

如果文件中的质谱图是轮廓图模式，要执行全扫描质谱图的三点 boxcar 平滑，选择 **Actions（操作） > Smooth Original Spectrum（平滑原始质谱图）**。

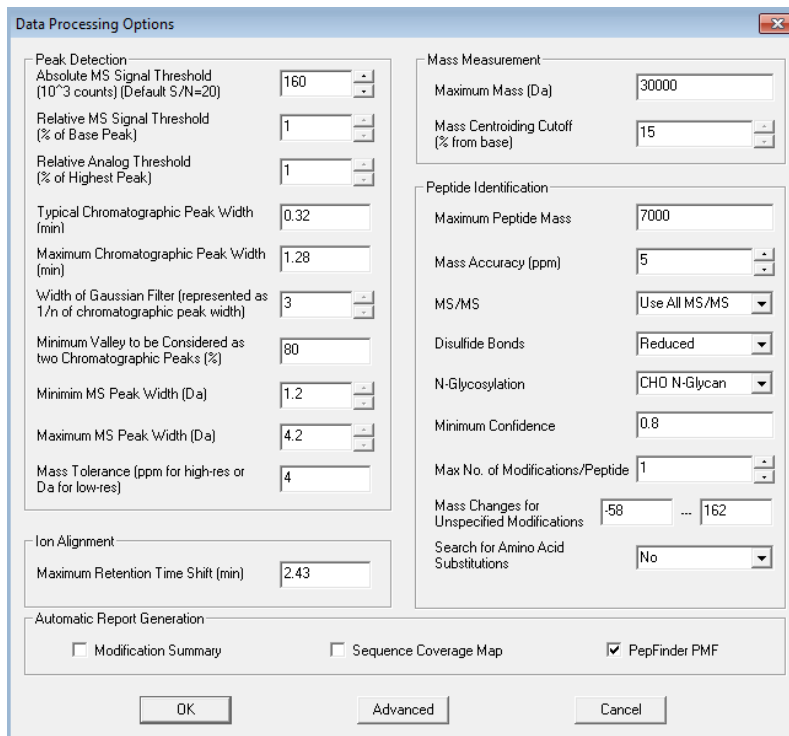
❖ 若要识别该质谱图对应的肽段

1. 若 Sequence (序列) 窗口中提供了蛋白质序列, 点击 **MS/MS** 图标 (  ) 打开 MS/MS 窗口。
2. 选择 **Actions (操作) > Identify the Peptide (识别肽段)** 显示 Possible Peptides (可能的肽段) 对话框。



3. 单击 **OK (确定)** 关闭对话框。
4. 若要将具有二硫键的肽段包括在实验结果中, 在 Data Processing Options (数据处理选项) 对话框中将 Disulfide Bonds (二硫键) 选项设定为 **Non-Reduced (非还原的)**。

有关设置数据处理选项的详细信息, 参阅第 10 页上的“修改 Data Processing Options (数据处理选项)”。

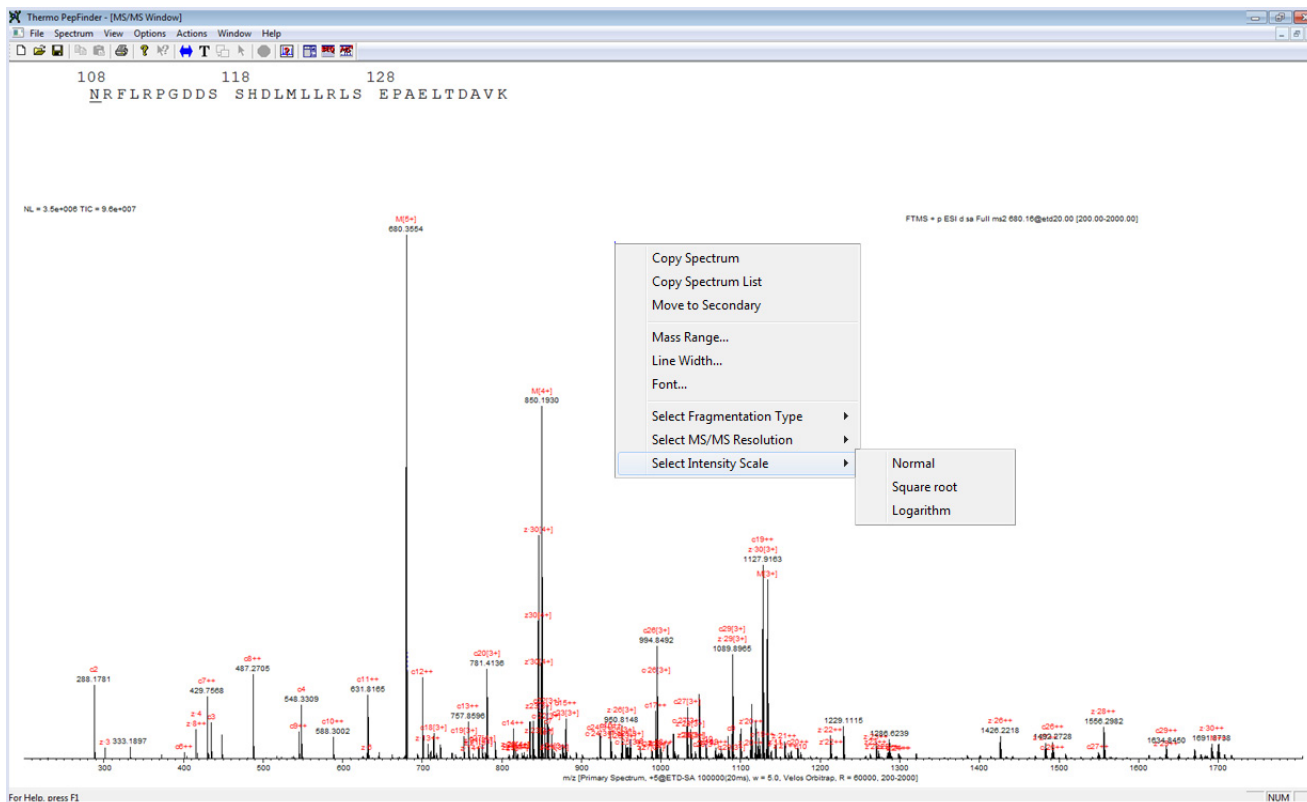




## 2 在 Main（主要）窗口中处理结果

编辑 Main（主要）窗口内容

若要观察低丰度离子并以平方根或对数刻度显示质谱图，右击该质谱图并选择 **Select Intensity Scale**（选择强度刻度）。



有关 Transform（变换）选项的信息，参阅第 20 页上的“选择解卷积方法”。

### ❖ 若要修改质谱图标题

点击 Spectrum（质谱图）视图使其成为当前视图。

- 若要修改标题，点击标题区域。
  - 若要隐藏标题，右击并选择 **Hide**（隐藏）。
  - 若要删除标题，右击并选择 **Delete**（删除）。
- 若要修改字体，右击并选择 **Font**（字体）。

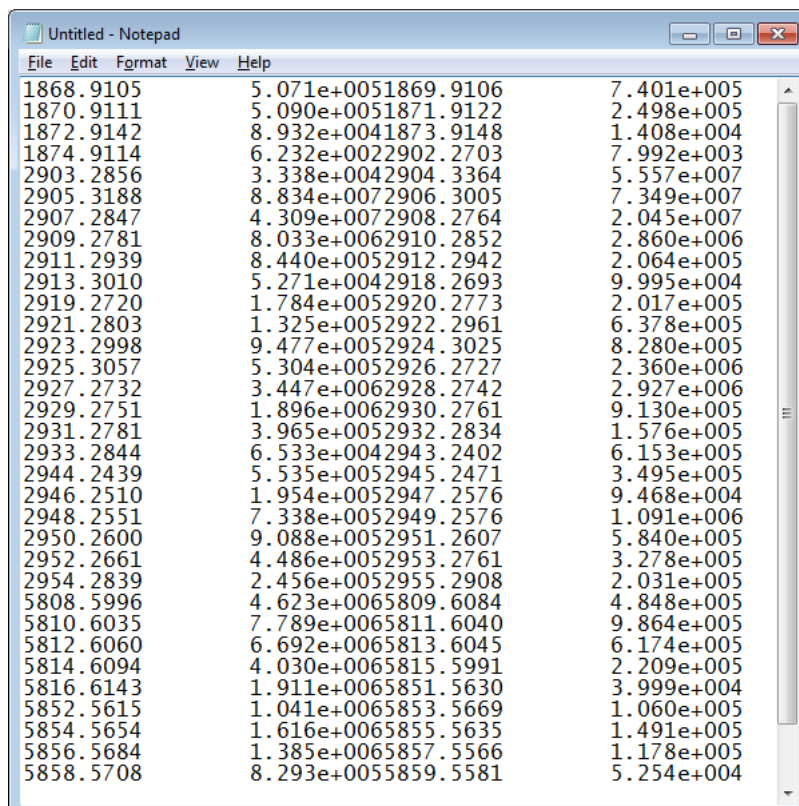
在选择字体信息后，点击 **OK**（确定）。

❖ 若要从质谱图创建质量数列表

1. 右击 Spectrum (质谱图) 视图, 然后选择 **Copy Mass List (复制质量数列表)**。

应用程序将质量数列表信息 (包括  $m/z$  和强度) 复制到 Clipboard (剪贴板)。

2. 打开一个文本文件并将该列表粘贴进去。



m/z	Intensity	m/z
1868.9105	5.071e+005	1869.9106
1870.9111	5.090e+005	1871.9122
1872.9142	8.932e+004	1873.9148
1874.9114	6.232e+002	2902.2703
2903.2856	3.338e+004	2904.3364
2905.3188	8.834e+007	2906.3005
2907.2847	4.309e+007	2908.2764
2909.2781	8.033e+006	2910.2852
2911.2939	8.440e+005	2912.2942
2913.3010	5.271e+004	2918.2693
2919.2720	1.784e+005	2920.2773
2921.2803	1.325e+005	2922.2961
2923.2998	9.477e+005	2924.3025
2925.3057	5.304e+005	2926.2727
2927.2732	3.447e+006	2928.2742
2929.2751	1.896e+006	2930.2761
2931.2781	3.965e+005	2932.2834
2933.2844	6.533e+004	2943.2402
2944.2439	5.535e+005	2945.2471
2946.2510	1.954e+005	2947.2576
2948.2551	7.338e+005	2949.2576
2950.2600	9.088e+005	2951.2607
2952.2661	4.486e+005	2953.2761
2954.2839	2.456e+005	2955.2908
5808.5996	4.623e+006	5809.6084
5810.6035	7.789e+006	5811.6040
5812.6060	6.692e+006	5813.6045
5814.6094	4.030e+006	5815.5991
5816.6143	1.911e+006	5851.5630
5852.5615	1.041e+006	5853.5669
5854.5654	1.616e+006	5855.5635
5856.5684	1.385e+006	5857.5566
5858.5708	8.293e+005	5859.5581
		7.401e+005
		2.498e+005
		1.408e+004
		7.992e+003
		5.557e+007
		7.349e+007
		2.045e+007
		2.860e+006
		2.064e+005
		9.995e+004
		2.017e+005
		6.378e+005
		8.280e+005
		2.360e+006
		2.927e+006
		9.130e+005
		1.576e+005
		6.153e+005
		3.495e+005
		9.468e+004
		1.091e+006
		5.840e+005
		3.278e+005
		2.031e+005
		4.848e+005
		9.864e+005
		6.174e+005
		2.209e+005
		3.999e+004
		1.060e+005
		1.491e+005
		1.178e+005
		5.254e+004

3. 保存质量数列表文件。

❖ 若要导出主要或辅助质谱图的强度列表

1. 选择 **File (文件) > Export ion List (导出离子列表)** 将离子列表复制到文本文件中, 以便采用其他应用程序绘图。

浏览框打开。

2. 选择一个文件位置并命名文件。
3. 点击 **Save (保存)**。

## 使用 De Novo 测序识别组分

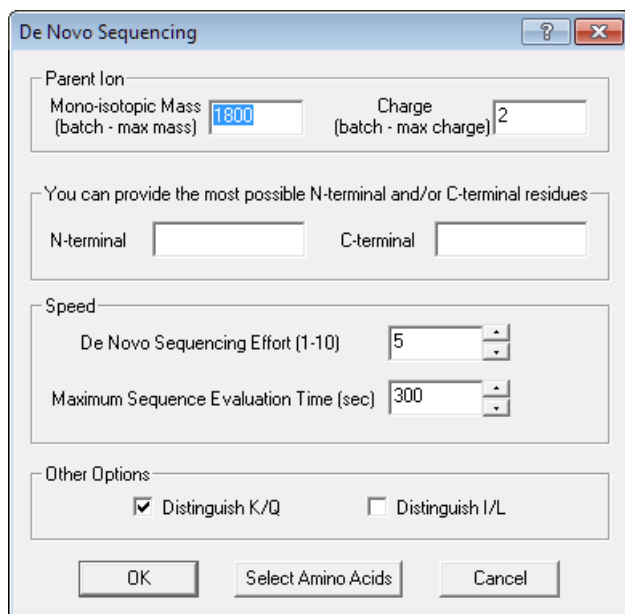
如果在处理时有未识别的组分，或有可能不在 FASTA 文件中的组分，可以使用 de novo 测序进行识别。De novo 测序不兼容 ETD 数据。

- 若要定义 de novo 测序的处理参数
- 若要对 Main（主要）窗口上的单个组分执行 de novo 测序
- 若要在 MS/MS 窗口中查看单个组分的 de novo 结果
- 若要对离子列表中的所有离子执行 de novo 测序

## 设置 De Novo 测序

### ❖ 若要定义 de novo 测序的处理参数

1. 选择 **Actions（操作） > De Novo Sequencing（De Novo 测序）** 显示 De Novo Sequencing（De Novo 测序）对话框。



The image shows a 'De Novo Sequencing' dialog box with the following fields and options:

- Parent Ion**
  - Mono-isotopic Mass (batch - max mass): 1800
  - Charge (batch - max charge): 2
- You can provide the most possible N-terminal and/or C-terminal residues**
  - N-terminal: [ ]
  - C-terminal: [ ]
- Speed**
  - De Novo Sequencing Effort (1-10): 5
  - Maximum Sequence Evaluation Time (sec): 300
- Other Options**
  - Distinguish K/Q
  - Distinguish I/L
- Buttons: OK, Select Amino Acids, Cancel

2. 若要指定母离子单同位素质量数，在 Mono-isotopic Mass（单同位素质量数）框内输入一个值。

若要使测序更可靠，设定该值和真实质量数相差不超过 0.5 Da。应用程序通常提供了该值。当执行 de novo 测序识别多个肽段时，应用程序使用该值定义最重的肽段进行测序。

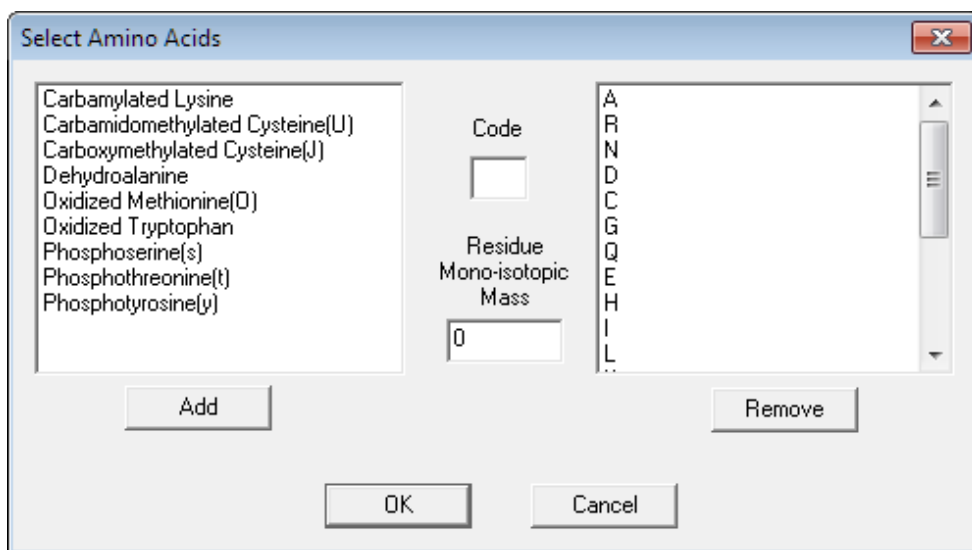
3. 若要指定肽段的价态，在 Charge（价态）框内输入一个值。

De novo 测序只适用于 1 和 4 之间的价态。

- 若要指定可能的 N 端和 C 端残基，在合适框内指定它们。  
例如，如果肽段来源于蛋白质的胰蛋白酶解，将 C 端设定为 KR；否则，将其留为空白。
- 若要指定花费多大力气进行 de novo 测序，可在 De Novo Sequencing Effort (1–10) (De Novo 测序工作量，1–10) 框内输入一个值。选择 5 作为一个好的起点。
- 若要指定每个测序任务上花费的最多时间，在 Maximum Sequence Evaluation Time (序列评估最多时间) 框内输入一个值。大部分任务可选择 60 秒。  
对于分子量大的肽段 (超过 1500 Da)，可以设定更长时间。
- 在 Other Options (其他选项) 下面指定是否希望算法区分 K/Q 或 I/L。  
该算法在某种程度上可以区分 I/L，但是可靠性不佳。K/Q 的区分更加可靠。

❖ 若要定义包括在 de novo 测序内的非常见或修饰氨基酸

- 在 De Novo Sequencing (De Novo 测序) 对话框的底部，点击 **Select Amino Acids (选择氨基酸)** 以定义包括的氨基酸。



- 若要将氨基酸添加至右侧列表中，在左侧框内选择一个名称，然后点击 **Add (添加)**。
- 若要移除某一氨基酸，在右侧列表中选择其名称，然后点击 **Remove (移除)**。
- 点击 **OK (确定)**。

De novo 测序结果通常显示在文本窗口中。最佳序列显示在最上面一行，后面是每个残基的位置置信度 (1–9 代表 10–90%)。

❖ 若要对 Main（主要）窗口上的单个组分执行 de novo 测序

1. 右击离子列表中的某个离子保留时间。

**注释** 可以点击单个离子，或从 Main（主要）窗口的离子列表直接选择该离子进行 de novo 测序，或者从 MS/MS 窗口显示的质谱图中直接选择离子进行测序（参阅第 99 页上的“若要对 MS/MS 窗口的单个组分执行 de novo 测序”）。若要定义 de novo 测序参数，参阅第 54 页上的“设置 De Novo 测序”。

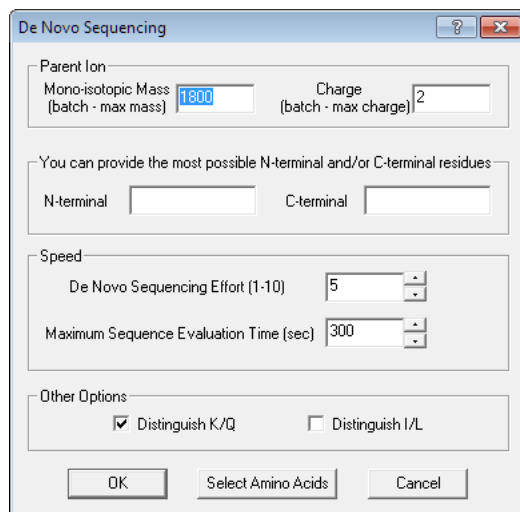
2. 选择 **De Novo Sequencing（De Novo 测序）**。

该应用程序在 Identification（识别）列中显示结果，并提供一个置信度分数。如果没有 MS/MS 数据，应用程序不会创建置信度分数。双击保留时间查看离子详细信息。

❖ 若要在 MS/MS 窗口中查看单个组分的 de novo 结果


1. 在 Main（主要）窗口中选择某组分的保留时间。
2. 右击并选择 **De Novo Sequencing（De Novo 测序）**。

应用程序打开 De Novo Sequencing（De Novo 测序）对话框。

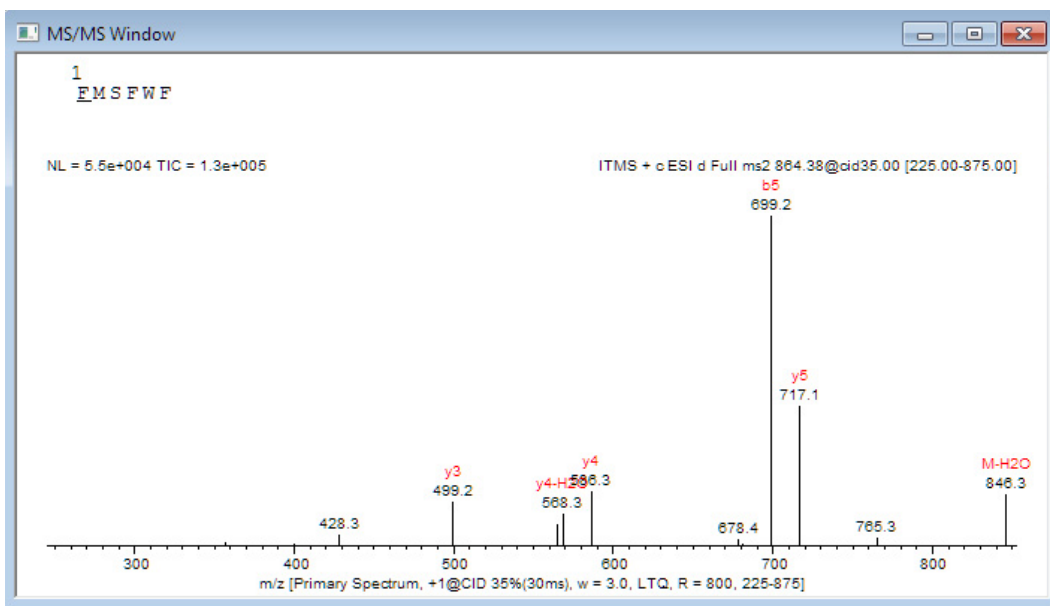


3. 点击 **OK（确定）** 开始检索。

应用程序显示一个进度条。

4. 进度完成后，点击  打开 MS/MS 视图。

应用程序对离子加注释，如下图所示。



## 使用 De Novo 测序识别多个离子

### ❖ 若要对离子列表中的所有离子执行 de novo 测序

1. 在 Main（主要）窗口中，打开一个缺少离子识别信息的文件。
2. 选择 **Actions（操作） > De Novo Sequencing（De Novo 测序）**。

应用程序显示一个进度条，完成后将结果显示在 Peptide（肽段）列内。用户可以导出结果以进行 MSBlast 检索，该检索通过序列相似性识别蛋白质。有关导出结果到 MSBlast 的更多信息，参阅第 61 页上的“生成 MSBlast 文件”。

## 处理实验结果

使用本部分中的程序显示和导出实验结果。

- [导出离子列表](#)
- [为所有文件导出离子列表](#)
- [生成文件导出实验数据](#)
- [创建序列覆盖图谱](#)
- [创建修饰总结](#)

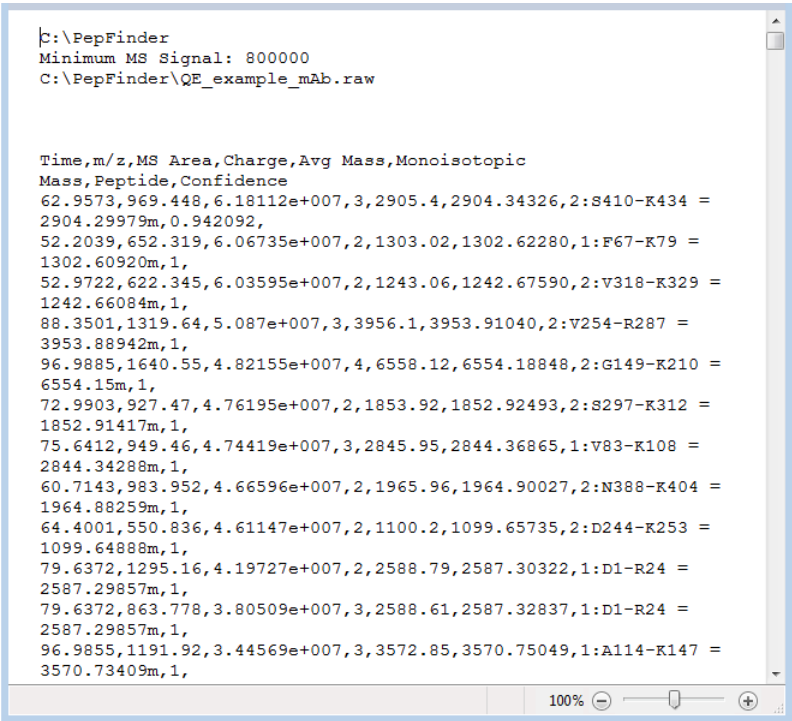
## 导出离子列表

使用下列程序导出离子列表。

### ❖ 若要将离子列表导出到文本文件

1. 选择 **File（文件） > Export Ion List（导出离子列表）** 打开一个浏览框。
2. 浏览到目标位置并为离子列表文件输入一个名称。
3. 若要显示和保存文件，点击 **Save（保存）**。

所创建的列表类似于这个。



```
C:\PepFinder
Minimum MS Signal: 800000
C:\PepFinder\QE_example_mAb.raw

Time,m/z,MS Area,Charge,Avg Mass,Monoisotopic
Mass,Peptide,Confidence
62.9573,969.448,6.18112e+007,3,2905.4,2904.34326,2:S410-K434 =
2904.29979m,0.942092,
52.2039,652.319,6.06735e+007,2,1303.02,1302.62280,1:F67-K79 =
1302.60920m,1,
52.9722,622.345,6.03595e+007,2,1243.06,1242.67590,2:V318-K329 =
1242.66084m,1,
88.3501,1319.64,5.087e+007,3,3956.1,3953.91040,2:V254-R287 =
3953.88942m,1,
96.9885,1640.55,4.82155e+007,4,6558.12,6554.18848,2:G149-K210 =
6554.15m,1,
72.9903,927.47,4.76195e+007,2,1853.92,1852.92493,2:S297-K312 =
1852.91417m,1,
75.6412,949.46,4.74419e+007,3,2845.95,2844.36865,1:V83-K108 =
2844.34288m,1,
60.7143,983.952,4.66596e+007,2,1965.96,1964.90027,2:N388-K404 =
1964.88259m,1,
64.4001,550.836,4.61147e+007,2,1100.2,1099.65735,2:D244-K253 =
1099.64888m,1,
79.6372,1295.16,4.19727e+007,2,2588.79,2587.30322,1:D1-R24 =
2587.29857m,1,
79.6372,863.778,3.80509e+007,3,2588.61,2587.32837,1:D1-R24 =
2587.29857m,1,
96.9855,1191.92,3.44569e+007,3,3572.85,3570.75049,1:A114-K147 =
3570.73409m,1,
```

4. 若要打开保存的文件，右击该文件并选择 **Open With（打开方式）**。
5. 选择文本编辑器，然后点击 **Open（打开）**。

## 为所有文件导出离子列表

若要比较打开项目中所有文件的离子列表，将它们导出到文本文件中。

### ❖ 若要导出打开项目中所有文件的离子列表

1. 选择 **File（文件） > Export Ion List（导出离子列表）** 打开一个浏览框。
2. 命名离子列表并点击 **Save（保存）** 关闭此框。

## 生成文件导出实验数据

一般，使用 PepFinder 软件作为检索工具，使用该应用程序的预测性 MS/MS 检索功能处理和识别具有未知修饰的样品。在很多情况下，只有 PepFinder 应用程序可以识别序列非常困难以及其他软件会遗漏的肽段。列出唯一或重要肽段后，用户或许想要监测更多样品中的这些肽段，或了解大量样品中这些肽段的绝对量。

若要创建可以导入 Mascot、PinPoint、Chromeleon 或 MSBlast 应用程序的文件，使用以下程序。

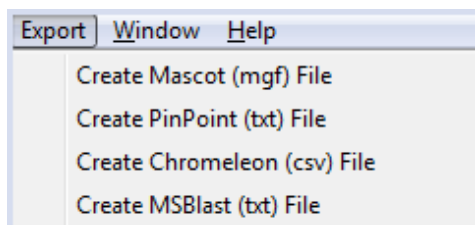
- [生成 Mascot 文件](#)
- [生成 PinPoint 文件](#)
- [生成 MSBlast 文件](#)
- [生成 Chromeleon 文件](#)

## 生成 Mascot 文件

根据原始数据文件生成离子或组分之后，可以生成 Mascot 检索引擎用来查找结果的 Mascot Generic Format (MGF) 文件。

### ❖ 若要导出 Mascot MGF 文件离子列表

1. 在 PepFinder 应用程序中打开一个已处理的实验。
2. 选择 **Export (导出) > Create Mascot (mgf) File (创建 Mascot [mgf] 文件)** 打开一个浏览框。



3. 命名文件并提供一个 .mgf 文件名后缀。
4. 创建文件后，访问 Mascot 服务器并提供所需信息。
5. 浏览选择新创建的 MGF 文件。
6. 在 Mascot 应用程序中点击 **Start Search (开始检索)**。

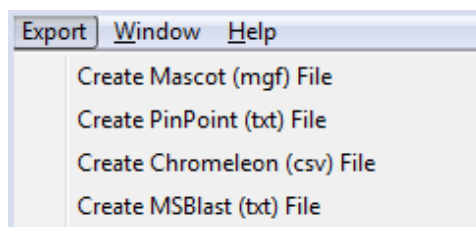


## 生成 PinPoint 文件

采用 PepFinder 应用程序处理数据文件后，可以将识别的肽段导出到文件中。该文件可以直接导入 PinPoint 应用程序进行目标定量分析。由于 PepFinder 应用程序只进行相对定量，必须使用 PinPoint 应用程序或类似工具进行绝对定量。若要对识别肽段进行绝对定量分析，使用 PinPoint 应用程序读取肽段序列，并使用 PepFinder 应用程序为已识别肽段创建一个 SRM（目标 MS/MS）工作流程。然后使用 SRM 实验监测这些肽段，以便测定样品组中任何已识别组分的绝对量。

### ❖ 若要创建实验文件导入 PinPoint

1. 在 PepFinder 应用程序中打开一个已处理的实验。
2. 选择 **Export（导出） > Create PinPoint (txt) File（创建 PinPoint [txt] 文件）** 打开一个浏览框。



3. 命名文件并点击 **OK（确定）**。
4. 将该文件导入 PinPoint 应用程序，如下：
  - a. 打开 PinPoint 应用程序。
  - b. 选择 **File（文件） > Open（打开）**。
  - c. 浏览选择 PinPoint 文件 **Pinpoint for PepFinder\_Import\_Template.vws**，并点击 **Open（打开）**。

从 PepFinder 硬盘或从 OMICS 门户网站（<http://portal.thermo-brims.com>）下载文件 PepFinder\_Import\_Template.vws。将该文件用作导入实验的模板。它包括 PepFinder 应用程序中列出的所有固定修饰，因此可以使用 PepFinder 结果检索固定修饰。当使用该文件时，导入后将实验另存为其他名称。

- d. 在 PinPoint 应用程序中，选择 **Protein/Peptide Management（蛋白质 / 肽段管理） > Add Proteins/peptides（添加蛋白质 / 肽段）**，然后选择 **From Spectral Library（从质谱图库）**。

Spectral Libraries（质谱图库）对话框打开。

- e. 选择 **Add Library（添加库）**。
- f. 浏览至新创建的 **Export to Pinpoint.txt** 文件并选择将其打开。
- g. 点击 **OK（确定）** 继续。
- h. 点击 **Apply Library（应用库）** 和 **Close（关闭）**。

应用程序显示一条消息。

- i. 点击 **OK（确定）**。  
PinPoint 应用程序在主框内显示两个蛋白质。
- j. 选中蛋白质描述左侧的复选框以选中两个蛋白质。
- k. 点击 **Add Proteins/Peptides（添加蛋白质 / 肽段）**。  
可能需要几秒钟。

## 生成 Chromeleon 文件

当使用 Chromeleon 应用程序监测和执行绝对定量实验时，采用 PepFinder 应用程序按照以下程序创建备用文件。

### ❖ 若要生成离子列表的 Chromeleon 文件

1. 在 PepFinder 应用程序的 Main（主要）窗口中打开一个已处理的实验。
2. 选择 **Export（导出） > Create Chromeleon (csv) File（创建 Chromeleon [csv] 文件）** 打开一个浏览框。
3. 浏览到一个位置，命名新文件然后点击 **OK（确定）**。

## 生成 MSBlast 文件

使用以下程序创建一个与 MSBlast 兼容的文本文件，以便检索结果，进行识别和查找唯一结果。

### ❖ 若要导出离子列表的 MSBlast 文件

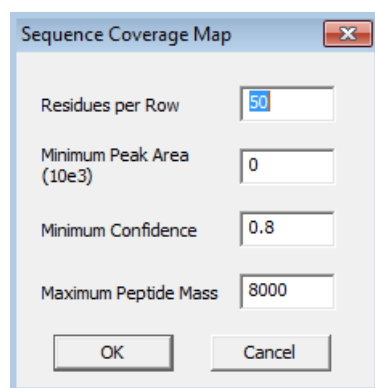
1. 在 PepFinder 应用程序的 Main（主要）窗口中打开一个已处理的实验。
2. 选择 **Export（导出） > Create MSBlast (txt) File（创建 MSBlast [txt] 文件）** 打开一个浏览框。
3. 创建文件后，访问 MSBlast 服务器并提供所需信息。
4. 浏览并选择新文件然后点击 **OK（确定）**。
5. 转至 <http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/index.html>。
6. 打开 **MSBlast.txt** 文件。
7. 右击并选择 **Select all（选择全部）** 和 **Copy（复制）**。
8. 将该信息粘贴到网站的 **Enter below your sequence ...（在下方输入你的序列 .....）** 空间上。
9. 点击 **Submit Query（提交问题）**。

## 创建序列覆盖图谱

使用该程序创建一个 HTML 文件，显示当前 Main（主要）窗口中数据的序列覆盖图谱报告，该主窗口中显示了蛋白质序列覆盖百分比。可以在 Web（网络）浏览器或 Excel™ 电子表格中打开已创建的 HTML 文件。PepFinder 应用程序为每个肽段标记保留时间，以不同颜色标记肽段强度（红色、黄色、绿色和青色），红色和青色分别表示最大和最小强度。若要在处理数据后自动创建一个序列覆盖图谱，参阅第 19 页上的“自动生成报告”。

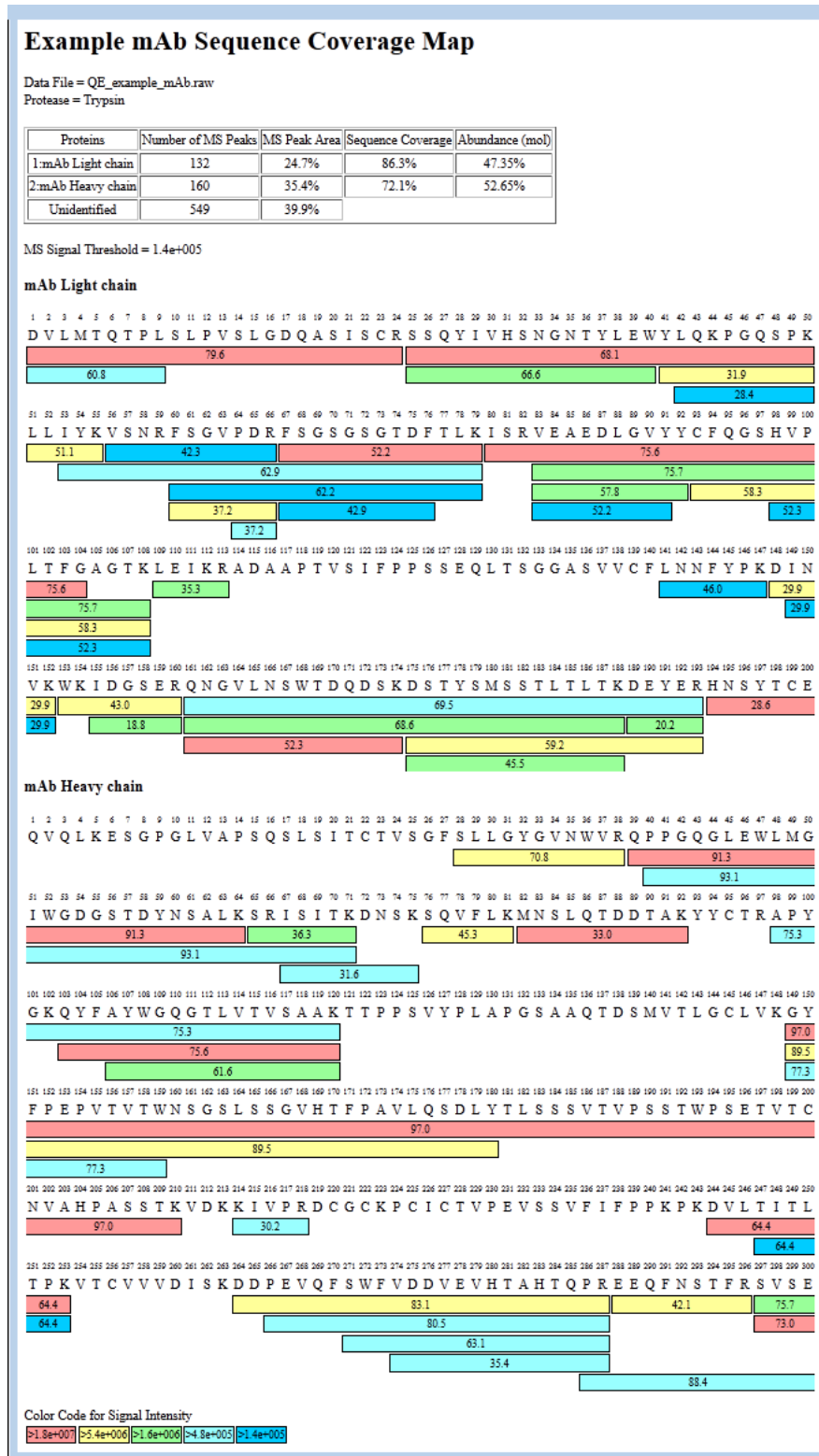
### ❖ 若要创建序列覆盖图谱

1. 选择 **File（文件） > Create Sequence Coverage Map（创建序列覆盖图谱）** 显示此对话框。



2. 指定每行的残基数。  
有效值：2 至 500  
默认：50
3. 定义最小峰面积。  
有效值：0 至 1e+006  
默认：0
4. 指定最小置信度水平。  
有效值：0 至 1  
默认：0.8
5. 定义最大肽段质量数。  
有效值：100 至 100000  
默认：8000

6. 点击 OK (确定) 显示序列覆盖图谱, 正如下面 mAb 实验的例子。



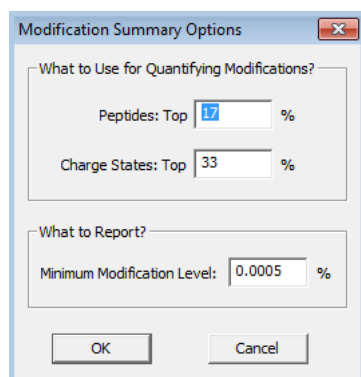
## 创建修饰总结

若要创建当前 Main（主要）窗口中数据的 HTML 修饰总结报告，该窗口显示所有检测到的修饰的丰度，可创建一个修饰总结。若要在处理数据后自动创建修饰总结，参阅第 19 页上的“自动生成报告”。

### ❖ 若要创建修饰总结

1. 选择 **File（文件） > Create Modification Summary（创建修饰总结）**。

Modification Summary Options（修饰总结选项）对话框打开。



2. 若要定义肽段的最高修饰百分比，在 Peptides: Top（肽段：最高）框中输入一个 **1** 到 **100** 之间的值。
3. 若要定义价态的最高修饰百分比，在 Charge States: Top（价态：最高）中输入一个 **1** 到 **100** 之间的值。
4. 若要指定显示的最小修饰水平，在 Minimum Modification Level（最小修饰水平）框内输入一个 **1** 到 **100** 之间的值。

应用程序使用下列方程计算总结中修饰的相对峰面积百分比。

$$\text{相对修饰峰面积 \%} = \frac{\text{修饰肽段的峰面积}}{\text{所有有关肽段的峰面积总和 (原形 + 所有修饰形式)}} \times 100$$

5. 点击 **OK (确定)** 创建一个与下表类似的报告。

**Example mAb Modification Summary**

Data File = QE\_example\_mAb.raw  
Protease = Trypsin

Protein	Modification	Recovery	Abundance
mAb Light chain	~V2+114.0488	Good	0.2882%
mAb Light chain	~V2+317.1008	Good	0.2899%
mAb Light chain	~V2+57.0261	Good	5.3088%
mAb Light chain	~V2+86.9993	Good	0.2101%
mAb Light chain	~L3-15.0308	Good	0.1131%
mAb Light chain	M4+Oxidation	Good	0.6651%
mAb Light chain	~M4-47.9988	Good	0.3185%
mAb Light chain	~Q6+0.9840	Good	1.3990%
mAb Light chain	~T7+52.8752	Good	0.4364%
mAb Light chain	~P8+78.9656	Good	0.6301%
mAb Light chain	~P8+87.8877	Good	0.2840%
mAb Light chain	~H31-0.9688	Fair	4.2123%
mAb Light chain	~N33+Deamidation	Fair	3.2840%
mAb Light chain	~N33+NH3 loss	Fair	14.3247%
mAb Light chain	W40+Double Oxidation	Fair	4.4534%
mAb Light chain	~W40+38.9480	Fair	1.7521%
mAb Light chain	~L51+57.0211	Good	2.4874%
mAb Light chain	~F60+0.9065	Fair	0.2034%
mAb Light chain	~F60+57.0209	Fair	3.2624%
mAb Light chain	S61+H2O loss	Fair	2.0650%
mAb Light chain	~T74+21.9647	Good	3.8194%
mAb Light chain	~T74+78.9919	Good	0.1106%
mAb Light chain	~L78+57.0089	Good	1.9579%
mAb Light chain	~V83+57.0029	Good	1.3736%
mAb Light chain	~Y92+43.9341	Good	1.9549%
mAb Light chain	~F94+57.0071	Good	1.5917%
mAb Light chain	~Q95+0.9840	Good	2.2926%
mAb Light chain	~H98+52.8870	Good	0.8037%
mAb Light chain	~H98+75	Good	0.5408%
mAb Light chain	~K112+57.0200	Fair	2.6791%
mAb Light chain	~A117+57	Good	0.3056%
mAb Light chain	~L130+42.9492	Good	1.0935%
mAb Light chain	~W153+13.9793	Fair	0.9597%
mAb Light chain	~W153+57.0159	Fair	4.3723%
mAb Light chain	I155+57.0221	Fair	1.6067%
mAb Light chain	~Q161+39.9905	Good	0.7542%
mAb Light chain	~Q161-16.0463	Good	0.3599%
mAb Light chain	N162+Deamidation	Good	17.4724%
mAb Light chain	N166+Deamidation	Good	0.5230%
mAb Light chain	W168+Double Oxidation	Good	0.9694%
mAb Light chain	~W168+120.9589	Good	0.1463%
mAb Light chain	~W168+13.9793	Good	0.6653%



## 在 Sequence（序列）窗口中查看结果

使用 Sequence（序列）窗口输入或粘贴蛋白质序列。只使用单个大写字母代码定义序列。还可以使用序列窗口导入 FASTA 文件，或输入和粘贴 FASTA 格式的蛋白质序列。有关修改蛋白质序列的信息，参阅第 4 页上的“添加和修改蛋白质序列”。

Sequence（序列）窗口显示项目中肽段序列的详细信息。

### 目录

- 在 Sequence（序列）窗口中修改数据
- 在 Sequence（序列）窗口中检索
- 处理氨基酸置换

## 在 Sequence（序列）窗口中修改数据

可以采用多种方式在 Sequence（序列）窗口中修改序列视图和数据，并检索特定序列。

- 查看蛋白质序列
- 修改序列
- 修改残基属性
- 执行理论消化

## 查看蛋白质序列

使用 PepFinder 应用程序载入一个或多个目标蛋白质序列。可以查看作为完整单元的序列，以便查看目标蛋白质氨基酸序列的结构。

- 打开 Sequence（序列）窗口
- 显示质量数值
- 选择肽段



### 3 在 Sequence（序列）窗口中查看结果

在 Sequence（序列）窗口中修改数据

- 显示蛋白质质量数
- 查找残基信息
- 查看肽段信息
- 更改字体显示
- 复制 Sequence（序列）窗口内容
- 查看打印设置
- 打印蛋白质序列

### 打开 Sequence（序列）窗口

若要导入或修改序列，打开 Sequence（序列）窗口。

#### ❖ 若要打开 Sequence（序列）窗口

选择 **View（视图） > Sequence Window（序列窗口）**，或点击 。



### 显示质量数值

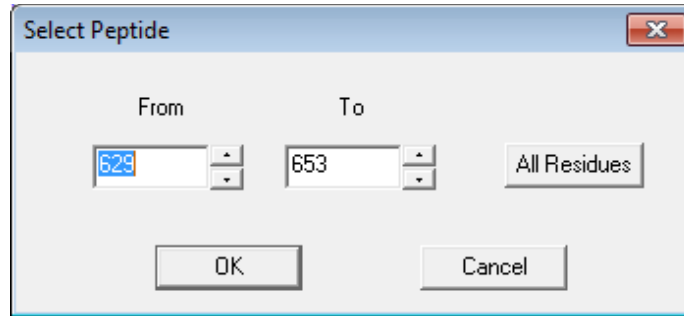
#### ❖ 若要选择显示值的方法

选择 **Option（选项） > Mass（质量数） > Monoisotopic（单同位素）** 或 **Average（平均）**。

## 选择肽段

### ❖ 若要选择肽段

1. 选择 **Sequence (序列) > Select Peptide (选择肽段)**。
2. 在此对话框中，输入肽段范围并点击 **OK (确定)**。

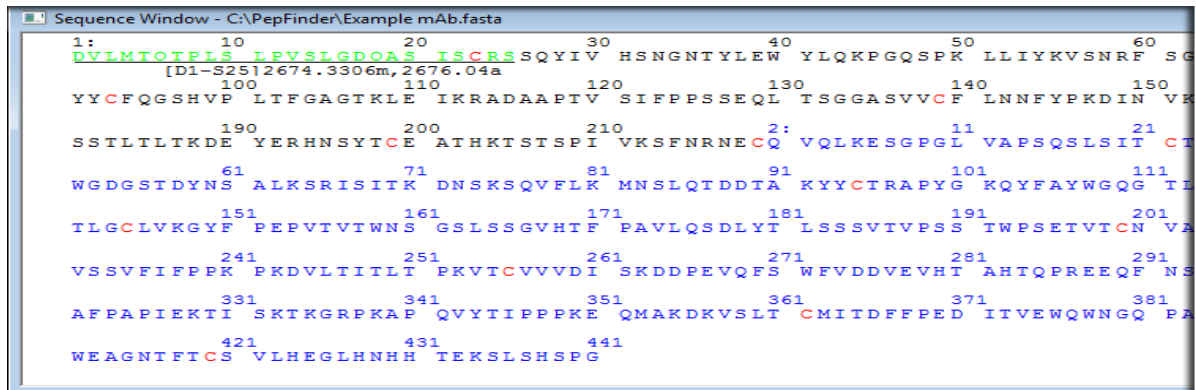


## 显示蛋白质质量数

### ❖ 若要查看所选蛋白质的质量数

1. 选择肽段后，选择 **View (视图) > Sequence (序列)** 打开 Sequence (序列) 窗口。
2. 拖动光标穿过整个蛋白质。

应用程序在蛋白质下方显示质量数。



在这个例子中，[D1-S25] 2674.3306m, 2676.04a，其中 m 值是单同位素质量数，a 值是平均质量数。

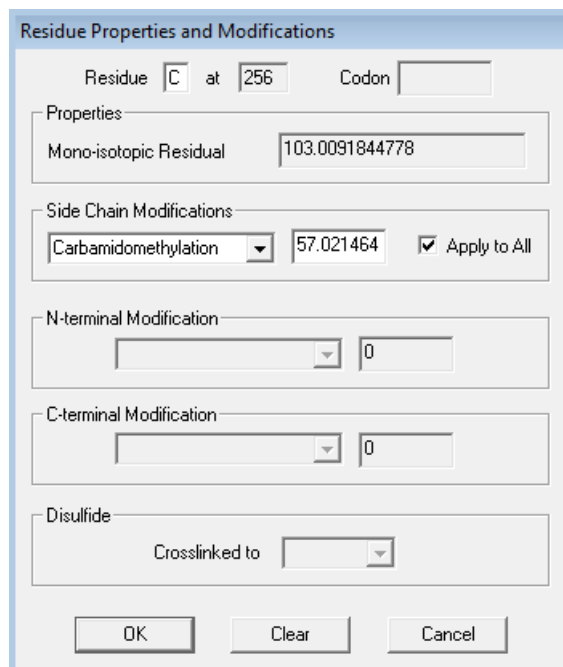
### 3 在 Sequence（序列）窗口中查看结果

在 Sequence（序列）窗口中修改数据

## 查找残基信息

### ❖ 若要查找残基信息

1. 选择 **View（视图） > Sequence Window（序列窗口）** 打开 Sequence（序列）窗口。
2. 若要查看或修改蛋白质，双击 Sequence（序列）窗口中的任意残基打开 Residue Properties and Modifications（残基属性和修饰）对话框。



The image shows a dialog box titled "Residue Properties and Modifications". At the top, it displays "Residue C at 256" and "Codon". Below this, there are several sections for properties and modifications:

- Properties:** A text box labeled "Mono-isotopic Residual" contains the value "103.0091844778".
- Side Chain Modifications:** A dropdown menu is set to "Carbamidomethylation", with a value of "57.021464" and a checked "Apply to All" checkbox.
- N-terminal Modification:** A dropdown menu and a text box containing "0".
- C-terminal Modification:** A dropdown menu and a text box containing "0".
- Disulfide:** A dropdown menu labeled "Crosslinked to".

At the bottom of the dialog are three buttons: "OK", "Clear", and "Cancel".

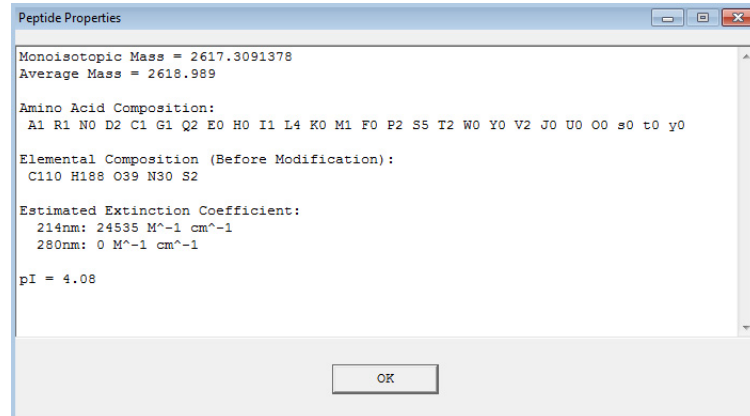
3. 点击 **OK（确定）**。

## 查看肽段信息

若要查看特定肽段的信息，可执行此程序。

### ❖ 若要查看肽段属性

1. 若要查看肽段和显示属性，右击该肽段。
2. 选择 **Select Peptide/Display Properties (选择肽段 / 显示属性)**。



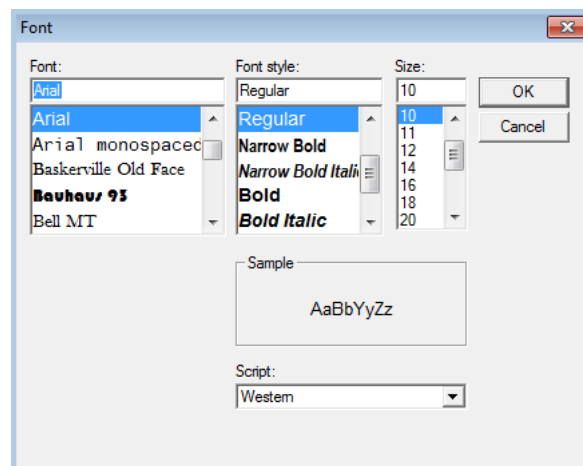
3. 点击 **OK (确定)**。

## 更改字体显示

若要使屏幕结果更容易阅读，可修改字体或字体大小。

### ❖ 若要修改 Sequence (序列) 窗口中的字体类型、样式或大小

1. 右击 Sequence (序列) 窗口的一个区域并选择 **Font (字体)** 显示 Font (字体) 对话框。



2. 选择字体值并单击 **OK (确定)**。

### 3 在 Sequence（序列）窗口中查看结果

在 Sequence（序列）窗口中修改数据

## 复制 Sequence（序列）窗口内容

#### ❖ 若要复制 Sequence（序列）窗口内容

1. 在 Sequence（序列）窗口中右击并选择 **Copy（复制）**。
2. 将 Clipboard（剪贴板）中的内容粘贴到文档中。

## 查看打印设置

#### ❖ 若要查看和修改打印设置

1. 选择 **File（文件） > Print Setup（打印设置）**。
2. 根据需要修改。
3. 点击 **OK（确定）**。

## 打印蛋白质序列

#### ❖ 若要打印蛋白质序列

1. 选择 **File（文件） > Print（打印）**。  
– 或 –  
若要在打印前查看文件，选择 **File（文件） > Print Preview（打印预览）**。
2. 点击 **OK（确定）**。

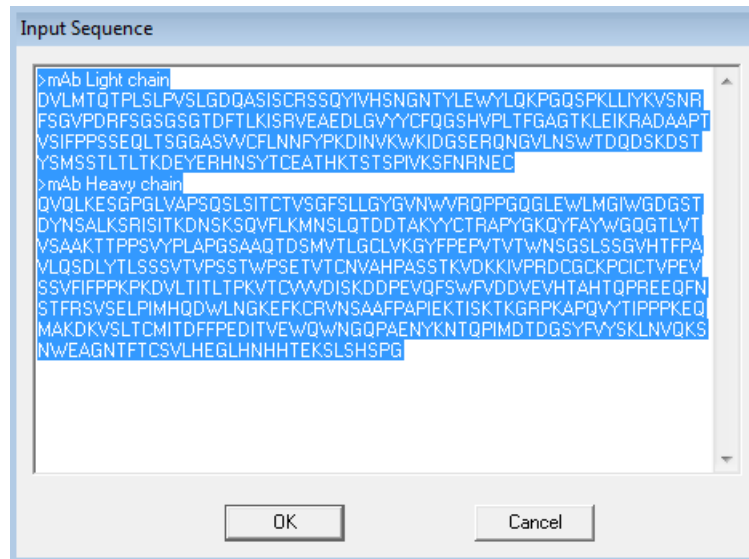
## 修改序列

根据以下程序修改蛋白质序列。在 FASTA 文件中，右箭头（>）表示一个新序列的说明行。

- 若要手动添加或编辑序列
- 若要添加蛋白质序列文件
- 若要导入蛋白质序列
- 若要导入 DNA 序列文件
- 若要保存蛋白质序列
- 若要识别假阳性

❖ 若要手动添加或编辑序列

1. 选择 **Sequence (序列) > Input/Edit Sequence (输入 / 编辑序列)** 打开 Input Sequence (输入序列) 对话框。
2. 将序列粘贴至对话框中，然后单击 **OK (确定)**。



❖ 若要添加蛋白质序列文件

1. 选择 **File (文件) > Add a Protein Sequence (添加蛋白质序列)** 打开一个浏览框。
2. 选中一个 FASTA 文件然后点击 **Open (打开)** 进行添加。

如果要永久修改某些残基，例如所有半胱氨酸的羧甲基化，可以双击残基永久修改该残基，然后在对话框中选择一个合适的修饰。

该蛋白质序列文件可以是 FASTA 格式，也可以是一个只包括单字母代码（大写）的文本文件，链之间有一个“>”。导入的序列加入到现有序列中。

❖ 若要导入蛋白质序列

1. 选择 **File (文件) > Import Protein Sequence (导入蛋白质序列)**。
2. 从浏览框选择蛋白质序列文件 (PMF) 并点击 **Open (打开)**。

该蛋白质序列文件可以是 FASTA 格式，也可以是一个只包括单字母代码（大写）的文本文件，链之间有一个“>”。导入的序列替换现有序列。

❖ 若要导入 DNA 序列文件

1. 选择 **File (文件) > Import DNA Sequence (导入 DNA 序列)**。
2. 浏览至 DNA 文件所在的位置并选中该文件。
3. 点击 **Open (打开)** 将其导入。

### 3 在 Sequence（序列）窗口中查看结果

在 Sequence（序列）窗口中修改数据

#### ❖ 若要保存蛋白质序列

1. 选择 **File（文件） > Save Sequence As...（序列另存为 .....）**。
2. 在浏览框内输入一个名称并点击 **Save（保存）** 保存文件。

#### ❖ 若要识别假阳性

若要识别假阳性，执行下列一个或两个步骤：

- 若要将序列逆向复制到序列底部，可选择 **Sequence（序列） > Append Reverse Sequence（添加逆向序列）**，将序列粘贴到对话框内，然后点击 **OK（确定）**。
- 若要将序列随机添加到序列的末尾，可选择 **Sequence（序列） > Append Randomized Sequence（添加随机序列）**，然后点击 **OK（确定）**。

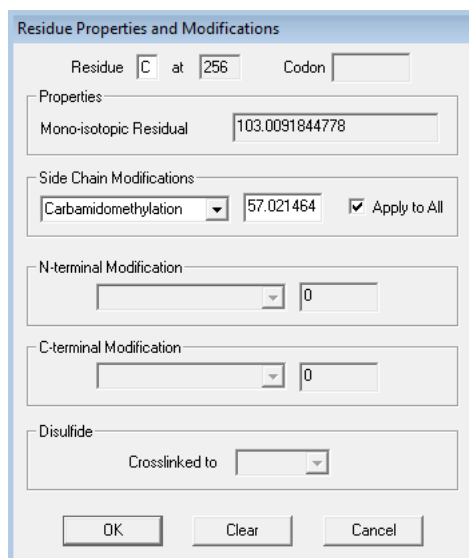
数据处理完成后，检查离子的置信度分数。若置信度分数下降到低于 50%，则很可能是一个假阳性结果。如果没有 MS/MS 数据，应用程序不会创建置信度分数。

## 修改残基属性

使用 Residue Properties and Modifications（残基属性和修饰）对话框为残基添加修饰。当双击残基时，应用程序显示此对话框。可以修改残基或为其添加修饰，然后该应用程序修改残基的颜色。若没有在列表中找到所需的修饰，可直接把质量数变化（单同位素）添加到 Mass Change（质量数变化）框内。

#### ❖ 若要修改残基属性

1. 从 Sequence（序列）窗口双击一个残基打开 Residue Properties and Modifications（残基属性和修饰）对话框。



The screenshot shows the 'Residue Properties and Modifications' dialog box. At the top, it displays 'Residue C at 256' and an empty 'Codon' field. Below this is a 'Properties' section with a 'Mono-isotopic Residual' field containing the value '103.0091844778'. The 'Side Chain Modifications' section includes a dropdown menu set to 'Carbamidomethylation', a numerical field with '57.021464', and a checked 'Apply to All' checkbox. There are also sections for 'N-terminal Modification' and 'C-terminal Modification', both with dropdown menus and numerical fields set to '0'. The 'Disulfide' section has a 'Crosslinked to' dropdown menu. At the bottom, there are three buttons: 'OK', 'Clear', and 'Cancel'.

2. 选择一个侧链修饰。

3. 若要将该修饰应用到该残基的所有实例中，选中 **Apply to All (应用至全部)** 复选框。
4. 点击 **OK (确定)** 接受修改。

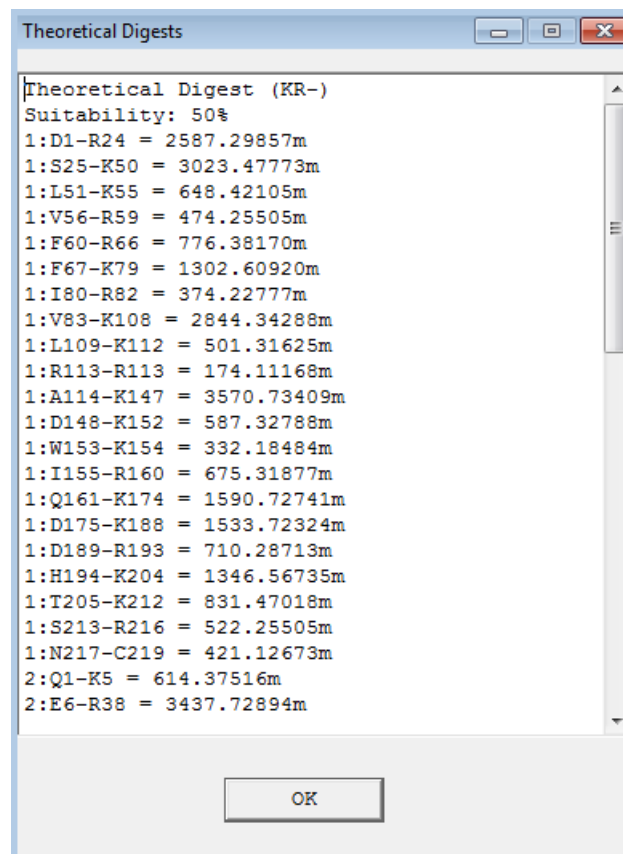
## 执行理论消化

执行理论消化显示蛋白酶作用下剪切发生的位置。最佳结果生成更小碎片。若该碎片太大，则尝试另一种酶。

### ❖ 若要执行理论消化

1. 在 Sequence (序列) 窗口中选择 **Actions (操作) > Theoretical Digest (理论消化)**。

Theoretical Digests (理论消化) 窗口打开。



当执行理论消化时，PepFinder 应用程序生成一个可能的剪切位置列表。

2. 若要在检索前修改质量数，可选择 **Actions (操作) > Search Mass (检索质量数)** 修改质量数或清除 **Average Mass (平均质量数)** 复选框。

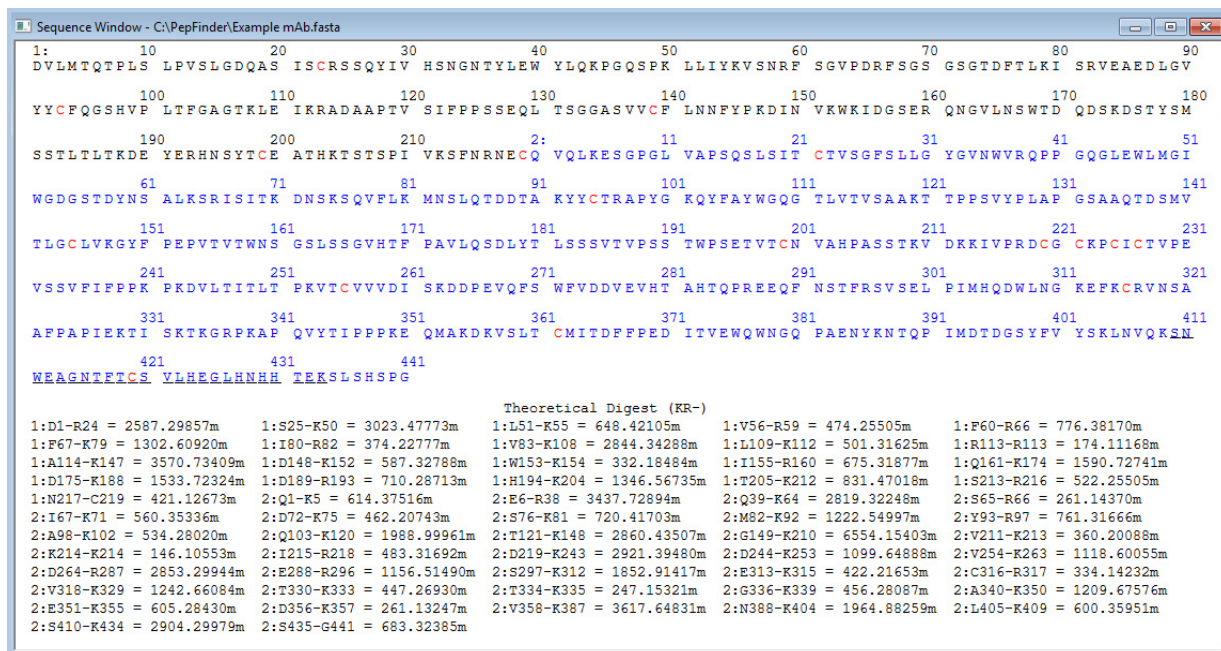


### 3 在 Sequence（序列）窗口中查看结果

在 Sequence（序列）窗口中检索

3. 点击 **OK（确定）**。

该应用程序在 Sequence（序列）窗口中显示结果。



## 在 Sequence（序列）窗口中检索

使用 Sequence（序列）窗口检测质谱图中的质量数。可以查看哪些匹配该序列，寻找可能存在的错误匹配，其中包括两个或更多碎片。

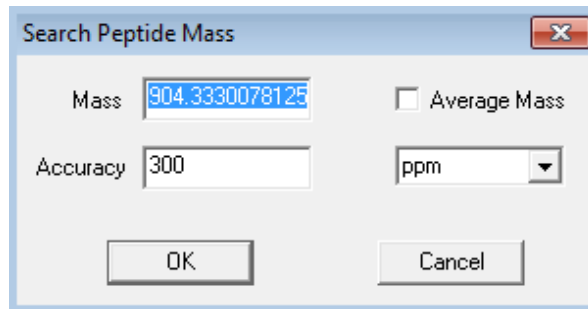
- 检索特定质量数
- 检索二硫键连接的肽段，查找特定质量数
- 检索二硫键的归属
- 显示蛋白质水解的碎片

## 检索特定质量数

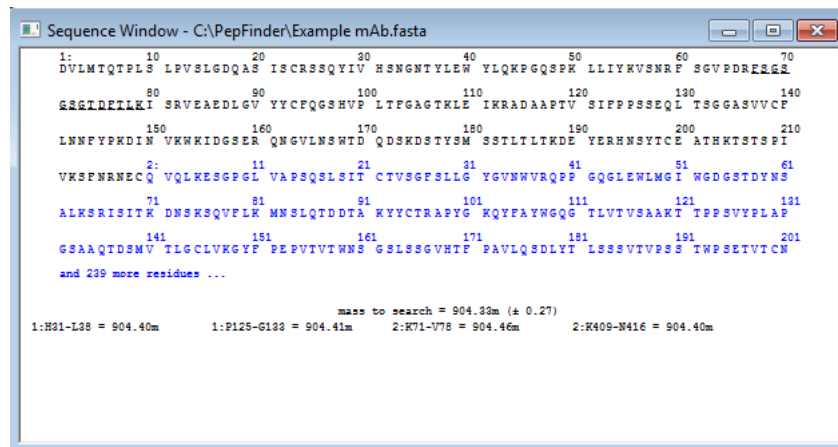
❖ 若要检索序列中匹配特定质量数的肽段碎片

1. 在 Sequence（序列）窗口中选择 **Actions（操作） > Search Mass（检索质量数）**。

该应用程序打开 Search Peptide Mass（检索肽段质量数）对话框。



2. 若要修改质量数，可修改质量数参数值。
3. 若要修改计算肽段质量数的方法，清除 **Average Mass（平均质量数）** 复选框。
4. 点击 **OK（确定）**。



### 3 在 Sequence（序列）窗口中查看结果

在 Sequence（序列）窗口中检索

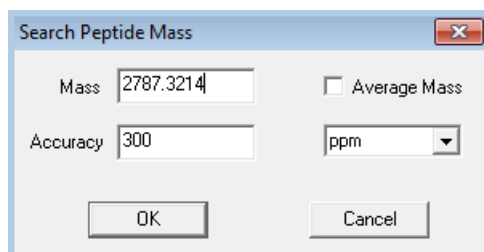
## 检索二硫键连接的肽段，查找特定质量数

#### ❖ 若要检索序列中匹配特定质量数的二硫键连接的肽段碎片

1. 若要查找连接的肽段，在 Sequence（序列）窗口中选择 **Actions（操作） > Search Mass of Disulfide-Linked Fragments（检索二硫键连接碎片的质量数）**。

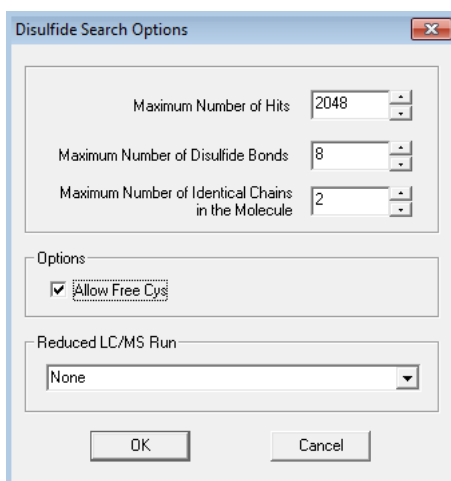
二硫键是许多分子中的弱连接。二硫键的最重要反应是断键，很多还原剂都可以将其还原断裂。

应用程序打开 Search Peptide Mass（检索肽段质量数）对话框。



2. 若要修改质量数，可修改 Mass（质量数）参数值或清除 **Average Mass（平均质量数）** 复选框。
3. 若要定义检索精度，单位是 ppm，可在此框内输入一个值。
4. 点击 **OK（确定）**。

Disulfide Search Options（二硫键检索选项）对话框打开。



5. 在该应用程序停止检索更多二硫键连接的肽段之前，若要设定检索结果的最大数量，在框内输入一个值。

有效值：2 至 4000

默认：2048

6. 若要指定二硫键的最大数量，在框内输入一个值。

有效值：1 至 4

默认：用该应用程序测得的消化后肽段内半胱氨酸的最大数量除以 2。它不测量蛋白质中的半胱氨酸数量。

7. 若要设定分子中相同链的最大数量，在框内输入一个值。

例如，如果该分子是一个二硫键连接的同型二聚体，设定该参数为 2。

有效值：1 至 8

默认：2

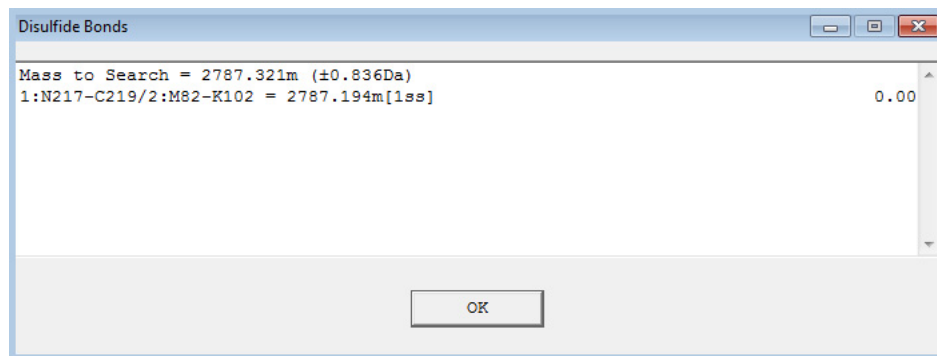
8. 若允许分子中存在自由的半胱氨酸残基，则选中该复选框。

9. 若要选择包含还原性 LC/MS 运行的文件，在列表中选择一文件名。

若同时有还原性和非还原性数据文件，可以在同一实验中处理两个数据文件，以归属更多可靠的二硫键。当载入数据文件时 (.raw)，使用 CTRL 或 SHIFT 键同时选择还原性和非还原性数据文件。然后在 Disulfide Search Options (二硫键检索选项) 框内，从 Reduced LC/MS Run (还原性 LC/MS 运行) 下面的列表中选择还原性原始数据文件名。

10. 点击 **OK (确定)**。

11. 该应用程序打开 Disulfide Bonds (二硫键) 对话框。



12. 单击 **OK (确定)** 关闭对话框。

### 3 在 Sequence (序列) 窗口中查看结果

在 Sequence (序列) 窗口中检索

## 检索二硫键的归属

#### ❖ 若要显示从 CN 诱导断裂生成的碎片质量数

1. 若要检索从 CN 诱导断裂生成的碎片质量数，寻找二硫键的归属（在氰基化半胱氨酸残基的 N 端处由氨水断裂），在 Sequence (序列) 窗口中选择 **Actions (操作) > Masses from CN Induced Cleavages (来自 CN 诱导断裂的质量数)**。

免疫球蛋白 G (IgG) 是人体血液中最丰富的抗体类别，用于控制感染。使用该应用程序计算不同形式 IgG 的元素组成和质量数。

如果样品中没有太多半胱氨酸，该应用程序打开 CN Induced Cleavages (CN 诱导断裂) 信息框。

若采集方法包括多种裂解模式（例如 HCD 和 ETD），设定数据处理参数 MS/MS 为 Use All MS/MS (使用所有 MS/MS)，则该软件检索这两种模式。该应用程序在 MS/MS 窗口中默认显示一种裂解模式。若要查看其他质谱图，右击该质谱图，选择 **Select Fragmentation Type (选择裂解类型)**，并选择当前没有显示的模式。

2. 点击 **OK (确定)**。

#### ❖ 若要自动计算 IgG 分子的不同链条和糖型的元素组成和平均质量数

1. 在 Sequence (序列) 窗口中选择 **Actions (操作) > Masses from CN Induced Cleavages (来自 CN 诱导断裂的质量数)**。

若导入序列是 IgG 分子，则该应用程序打开 Calculate IgG Properties Information? (计算 IgG 属性信息?) 框。

该应用程序使用有机来源的元素原子量，代替 IUPAC 标准原子量。

2. 点击 **OK (确定)**。

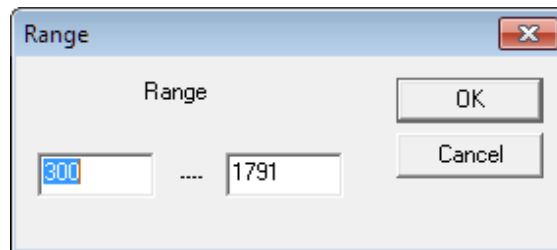
## 显示蛋白质水解的碎片

可以显示特定质量数范围的蛋白质水解碎片，这些碎片的创建与蛋白酶对应，不管消化是否完成。

### ❖ 若要显示指定质量数范围内的所有蛋白质水解碎片

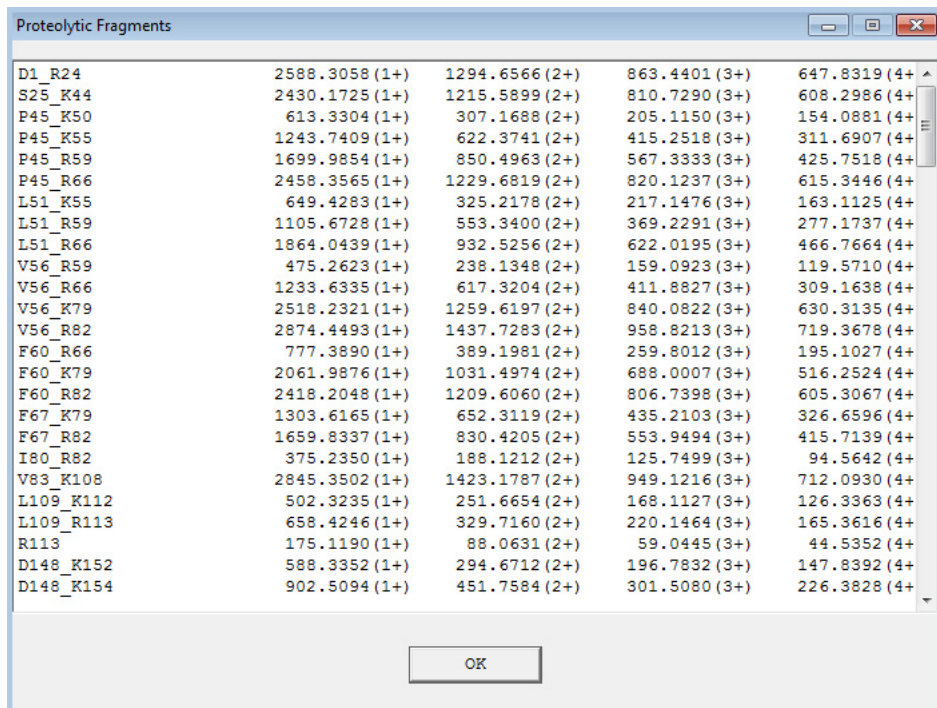
1. 在 Sequence (序列) 窗口中选择 **Actions (操作) > Show all Proteolytic Fragments (显示所有蛋白质水解碎片)**。

该应用程序打开 Range (范围) 对话框。



2. 如有必要，对该范围进行修改。
3. 点击 **OK (确定)**。

该应用程序显示蛋白质水解碎片的列表，包括理论  $m/z$  的序列和可能值。



Sequence	m/z 1	m/z 2	m/z 3	m/z 4
D1_R24	2588.3058 (1+)	1294.6566 (2+)	863.4401 (3+)	647.8319 (4+)
S25_K44	2430.1725 (1+)	1215.5899 (2+)	810.7290 (3+)	608.2986 (4+)
P45_K50	613.3304 (1+)	307.1688 (2+)	205.1150 (3+)	154.0881 (4+)
P45_K55	1243.7409 (1+)	622.3741 (2+)	415.2518 (3+)	311.6907 (4+)
P45_R59	1699.9854 (1+)	850.4963 (2+)	567.3333 (3+)	425.7518 (4+)
P45_R66	2458.3565 (1+)	1229.6819 (2+)	820.1237 (3+)	615.3446 (4+)
L51_K55	649.4283 (1+)	325.2178 (2+)	217.1476 (3+)	163.1125 (4+)
L51_R59	1105.6728 (1+)	553.3400 (2+)	369.2291 (3+)	277.1737 (4+)
L51_R66	1864.0439 (1+)	932.5256 (2+)	622.0195 (3+)	466.7664 (4+)
V56_R59	475.2623 (1+)	238.1348 (2+)	159.0923 (3+)	119.5710 (4+)
V56_R66	1233.6335 (1+)	617.3204 (2+)	411.8827 (3+)	309.1638 (4+)
V56_K79	2518.2321 (1+)	1259.6197 (2+)	840.0822 (3+)	630.3135 (4+)
V56_R82	2874.4493 (1+)	1437.7283 (2+)	958.8213 (3+)	719.3678 (4+)
F60_R66	777.3890 (1+)	389.1981 (2+)	259.8012 (3+)	195.1027 (4+)
F60_K79	2061.9876 (1+)	1031.4974 (2+)	688.0007 (3+)	516.2524 (4+)
F60_R82	2418.2048 (1+)	1209.6060 (2+)	806.7398 (3+)	605.3067 (4+)
F67_K79	1303.6165 (1+)	652.3119 (2+)	435.2103 (3+)	326.6596 (4+)
F67_R82	1659.8337 (1+)	830.4205 (2+)	553.9494 (3+)	415.7139 (4+)
I80_R82	375.2350 (1+)	188.1212 (2+)	125.7499 (3+)	94.5642 (4+)
V83_K108	2845.3502 (1+)	1423.1787 (2+)	949.1216 (3+)	712.0930 (4+)
L109_K112	502.3235 (1+)	251.6654 (2+)	168.1127 (3+)	126.3363 (4+)
L109_R113	658.4246 (1+)	329.7160 (2+)	220.1464 (3+)	165.3616 (4+)
R113	175.1190 (1+)	88.0631 (2+)	59.0445 (3+)	44.5352 (4+)
D148_K152	588.3352 (1+)	294.6712 (2+)	196.7832 (3+)	147.8392 (4+)
D148_K154	902.5094 (1+)	451.7584 (2+)	301.5080 (3+)	226.3828 (4+)


## 处理氨基酸置换

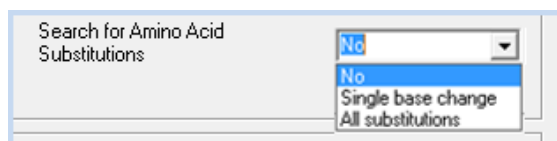
由于 MS/MS 数据的限制，PepFinder 应用程序可能将消化和电离时产生的假象解析为氨基酸置换。若要尽量减少这种现象，在检索氨基酸置换之前，该应用程序还自动检索常见的消化 / 电离假象。

但是，若没有消除潜在的氨基酸置换，则无法消除所有假象。考虑到测量的不准确性（例如，若该应用程序测定一个氧化肽段的质量数改变了 15 Da，而不是 16 Da），该列表可能会更大。

在这些假象中，应用程序给出最多的是氧化。邻近残基的氧化导致大量错误归属的氨基酸置换，因为大部分错误归属的氨基酸置换来自邻近残基的氧化。

### ❖ 若要打开氨基酸置换检索

1. 点击  打开 Data Processing Options (数据处理选项) 对话框。
2. 在 Search for Amino Acid Substitutions (检索氨基酸置换) 列表中 Peptide Identification (肽段识别) 下方，选择一个合适的置换。选项有 No (否)、All Substitutions (所有置换)、Single Base Change (单个碱基变化)：
  - 若要避免检索置换，选择 **No (否)**。



- 在两个氨基酸的密码子中，由 DNA 突变导致的氨基酸置换极少具有一个以上的碱基变化，因此，若要检索 DNA 突变，选择 **Single Base Change (单个碱基变化)**。选中该选项后，该应用程序显示氨基酸置换，该置换只包括密码子的一个碱基变化。
- 若要找出所有置换，选择 **All Substitutions (所有置换)**。

在应用程序检测潜在氨基酸置换后，用户必须进行确认。使用下列任意方法确认氨基酸置换。

- 高分辨质谱：若要确定导致变化的精确元素组分，在高分辨仪器上精确测量变化值。
- 电子转移解离 (ETD)：相比 CID，ETD 通常生成更高序列覆盖率，可帮助确定变化的精确位置。
- 不同蛋白酶的消化生成包含置换的不同肽段：该肽段的 MS/MS 分析可以提供补充信息。
- N 端测序：当纯化样品足够多时，执行 N 端测序以得到更多可靠确认。
- 置换肽段的合成：可以将它们的保留时间和 MS/MS 结果与消化中的肽段进行比较和确认。



- 通过对大量的库克隆进行测序，对突变（与氨基酸错参相对）进行 DNA 确认。

更多有关氨基酸置换的信息，可访问 OMICS 门户网站 (<http://portal.thermo-brims.com>)。

若要评估对数据结果的影响，考虑以下限制：

- 原始肽段必须存在，采集过程必须提供高质量 MS/MS 数据。这意味着肽段图谱必须具有足够覆盖率，以覆盖不确定的氨基酸。
- 置换肽段离子必须存在，采集过程必须提供高质量 MS/MS 数据。若要提高应用程序采集 MS/MS 数据的可能性，在第 10 页上的“修改 Data Processing Options (数据处理选项)”中调整数据依赖设置。
- 即使该应用程序获得高质量 MS/MS 数据，也无法确保能检测氨基酸置换，因为之前所提及的假象可能影响结果。



### 3 在 Sequence (序列) 窗口中查看结果 处理氨基酸置换

下表列出应用程序可能误认为是氨基酸置换的常见假象。

指定置换	变化	邻近残基的可能修饰
D-G	-58	Cys 的不完全羧甲基化
E-A	-58	Cys 的不完全羧甲基化
F-V	-48	氧化 Met 丢失 64
Y-D	-48	氧化 Met 丢失 64
M-L	-18	脱水
D-N	-1	酰胺化
E-K	-1	酰胺化
E-Q	-1	酰胺化
N-I	-1	酰胺化
I-N	1	N 或 Q 的脱酰胺
K-E	1	N 或 Q 的脱酰胺
P-T	4	三个氧化
A-S	16	氧化
F-Y	16	氧化
P-L	16	氧化
S-C	16	氧化
V-D	16	氧化
D-H	22	Na <sup>+</sup> 加合物
V-M	32	双氧化
G-V	42	乙酰化
I-R	43	N 端或 Lys 的氨基甲酰化
L-R	43	N 端或 Lys 的氨基甲酰化
A-D	44	两个 Na <sup>+</sup> 加合物
C-F	44	两个 Na <sup>+</sup> 加合物
D-Y	48	三个氧化
V-F	48	三个氧化
A-E	58	羧甲基化
G-D	58	羧甲基化

## 在 MS/MS 窗口中查看结果

在 MS/MS 窗口中，可以对肽段和串联质谱图执行任意下列计算。

- 预测所选肽段序列的理论串联质谱图
- 双击残基进行修改，或在所选肽段中创建一个二硫键
- 预测修饰肽段或二硫键连接的肽段的理论串联质谱图

阅读这些部分的信息，了解如何在 MS/MS 窗口中查看和修改结果。

### 目录

- [使用 MS/MS 窗口查看质谱图](#)
- [在 MS/MS 窗口中修改 Spectrum（质谱图）视图](#)
- [使用 MS/MS 窗口修改质谱图](#)
- [处理质谱图文件](#)
- [处理离子](#)
- [处理肽段](#)


## 使用 MS/MS 窗口查看质谱图

MS/MS 窗口提供一个清晰的方式以分析和比较不同肽段的质谱图。

- [打开 MS/MS 窗口](#)
- [在 MS/MS 窗口中查看质谱图](#)

## 打开 MS/MS 窗口

### ❖ 若要打开 MS/MS 窗口

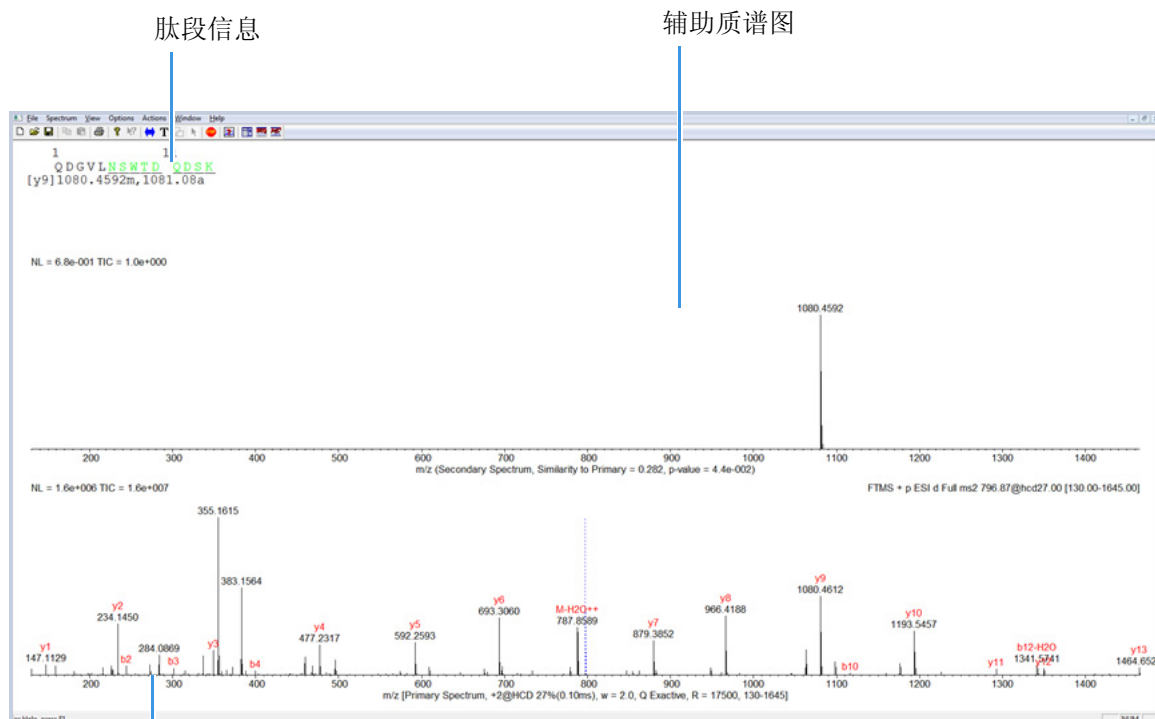
1. 在 Main（主要）窗口中，打开一个保存的项目。
2. 选择 **View（视图） > MS/MS Window（MS/MS 窗口）**，或点击 **MS/MS** 图标 。

MS/MS 窗口可以一次显示两个质谱图进行比较。底部质谱图被称作主要质谱图，顶部质谱图被称作辅助质谱图。应用程序在窗口的顶部显示所选肽段的信息。该应用程序在主要质谱图中显示碎片的归属。

## 在 MS/MS 窗口中查看质谱图

查看这些部分的信息，了解如何在 MS/MS 窗口中查看质谱图。

- [查看主要质谱图](#)
- [显示辅助质谱图](#)




肽段信息

辅助质谱图

主要质谱图显示

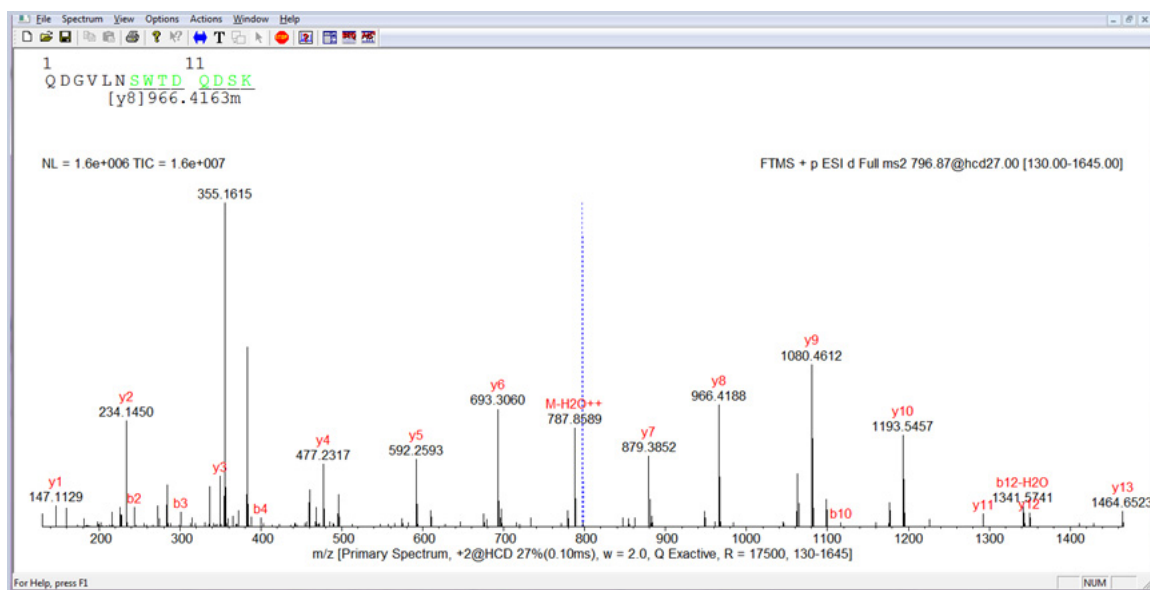
## 查看主要质谱图

### ❖ 若要查看主要质谱图

1. 从离子列表视图点击离子保留时间。
2. 选择 **View (视图) > MS/MS Window (MS/MS 窗口)**，或点击 。

MS/MS 窗口打开。

当点击离子列表中其他条目的保留时间时，应用程序自动更新该窗口。



#### 4 在 MS/MS 窗口中查看结果

使用 MS/MS 窗口查看质谱图

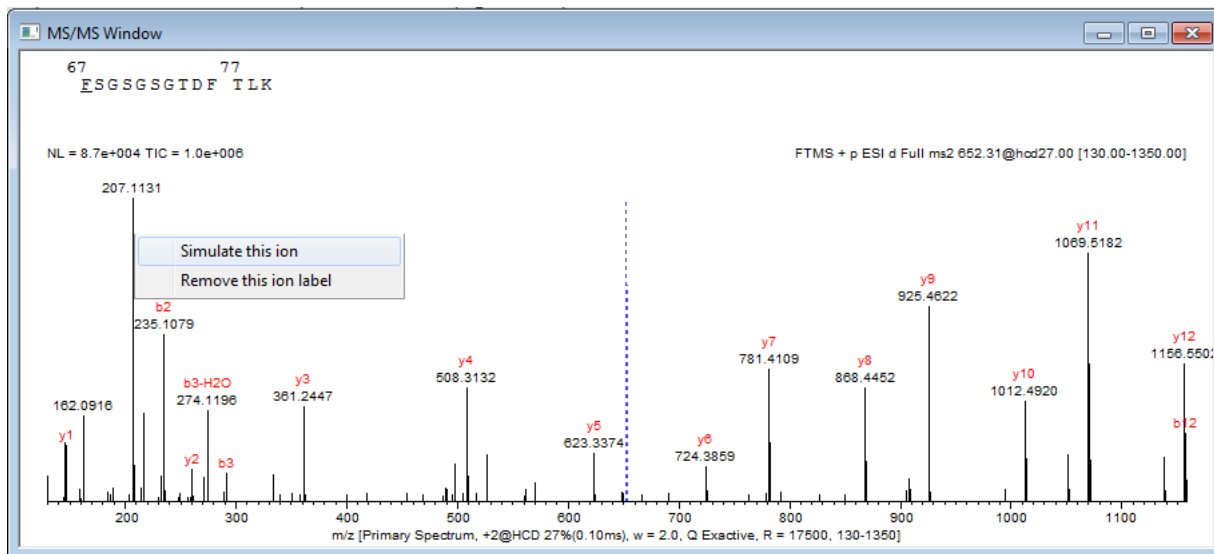
### 显示辅助质谱图

该应用程序可以在 MS/MS 窗口中显示两个质谱图以进行比较。可以将主要质谱图（底部）移动到顶部（辅助）。也可以在该窗口中执行质谱图预测。

#### ❖ 若要在辅助质谱图中显示该离子

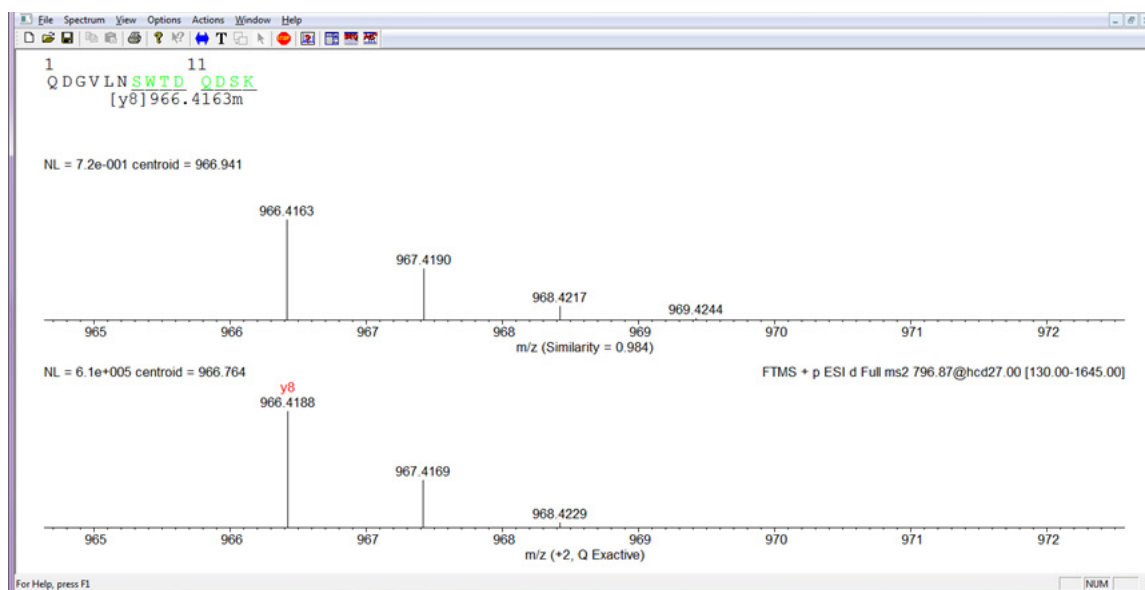
右击主要质谱图中的离子归属并选择 **Simulate This Ion**（模拟该离子）。

在本例中，MS/MS 窗口显示在主要质谱图中选中了红色 y8 离子归属。



在辅助质谱图中，PepFinder 应用程序模拟一个 HCD 高分辨 MS/MS 扫描的肽段离子，允许快速手动验证识别归属。

在下图中，该应用程序模拟在 HCD 高分辨 MS/MS 扫描下，肽段 SWTD QDSK 的 y8 离子，允许快速手动验证识别归属。



下表介绍了碎片离子的符号。

碎片	描述
<b>Ion Series (离子系列)</b>	
c	一个 c 离子。
c·	一个 c 离子, 其 N 端侧链具有一个电荷, 少一个质子 (c-1.0078)。
z	一个 z 离子, 其 C 端侧链具有一个电荷。
z·	一个 z 离子, 其 C 端侧链具有一个电荷, 多一个质子 (z+1.0078)。
z <sup>'</sup>	一个 z 离子, 其 C 端具有一个电荷, 多两个质子 (z+2(1.0078))。
b	一个 b 离子, 其 N 端侧链具有一个电荷。
y	一个 y 离子, 其 C 端侧链具有一个电荷。

裂解技术 (例如 ETD) 生成的肽段串联质谱图, 以选择性更少的方式剪切肽段主链, 可能提供更多肽段序列信息。

自由基诱导主链剪切产生 c 和 z· 离子, 以及 b· 和 y 离子。c 离子不是自由基。

- 从 c 到 z· 的 H· 转移产生 c· (c-1) 和 z<sup>'</sup> (z+1) 碎片。
- 从 y 到 b· 的 H· 转移产生 y· (y-1) 和 b<sup>'</sup> (b+1) 碎片。
- 从 z· 或 b· 丢失一个 H· 分别形成 z (z-1) 或 b (b+1)。
- 从 z· 离子丢失 H<sub>2</sub> 形成 z<sup>'</sup> (z-2) 离子。
- 从 b· 离子丢失 CO 形成 a· 离子。

## 在 MS/MS 窗口中修改 Spectrum (质谱图) 视图

根据这些程序修改 Spectrum (质谱图) 窗口视图或质谱图本身。

- [若要增加 MS/MS 窗口的放大倍数](#)
- [若要在修改放大倍数以后查看全扫描质谱图](#)
- [若要修改主要质谱图位置](#)
- [若要删除辅助质谱图](#)
- [若要显示质谱图的特定质量数范围](#)

若要更改主要质谱图线宽, 参阅第 46 页上的“[修改 Spectrum \(质谱图\) 视图](#)”。

若要修改 Spectrum (质谱图) 窗口上的字体大小或样式, 参阅第 71 页上的“[更改字体显示](#)”。

#### 4 在 MS/MS 窗口中查看结果

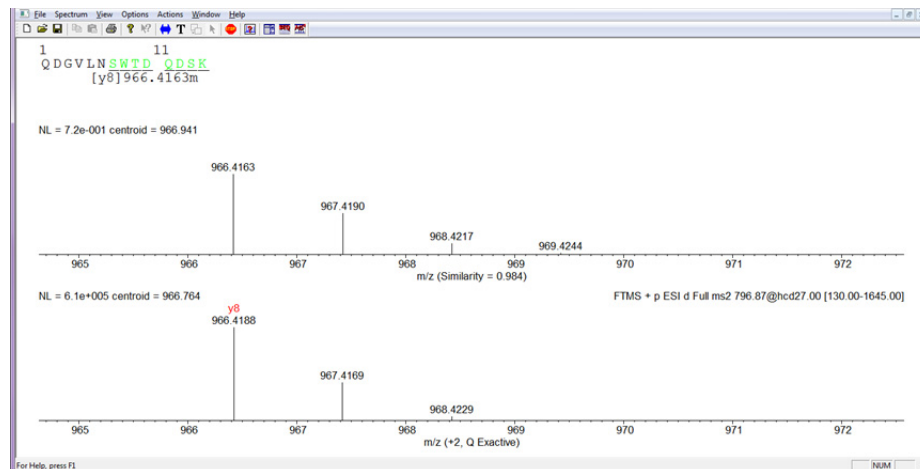
在 MS/MS 窗口中修改 Spectrum (质谱图) 视图

若要在 MS/MS 窗口中添加文本或修改文本, 参阅第 49 页上的“若要在 Spectrum (质谱图) 视图添加文本”。

##### ❖ 若要增加 MS/MS 窗口的放大倍数

1. 选择主要或辅助质谱图。
2. 在目标区域上拖曳光标。

该应用程序修改两个质谱图的放大倍数。



##### ❖ 若要在修改放大倍数以后查看全扫描质谱图

在 Spectrum (质谱图) 视图中双击 Spectrum (质谱图) 窗口恢复原始版本。

该应用程序恢复两个质谱图。

##### ❖ 若要修改主要质谱图位置

1. 选择主要质谱图。
2. 右击并选择 **Move to Secondary (移动到辅助位置)**。

该应用程序将主要质谱图移动到辅助质谱图位置。

##### ❖ 若要删除辅助质谱图

1. 选择辅助质谱图。
2. 右击并选择 **Delete Spectrum (删除质谱图)**。

该应用程序删除辅助质谱图。

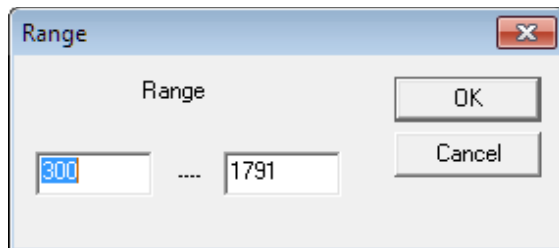
❖ 若要显示质谱图的特定质量数范围

1. 选择离子保留时间。
2. 在 MS/MS 窗口中右击一个离子并选择 **Mass Range (质量数范围)**。

– 或 –

选择一个离子并选择 **Edit (编辑) > Range (范围)**。

Range (范围) 对话框打开，显示当前质量数范围。



3. 输入合适值显示新质量数范围。
4. 点击 **OK (确定)** 修改显示的质量数范围。



## 使用 MS/MS 窗口修改质谱图

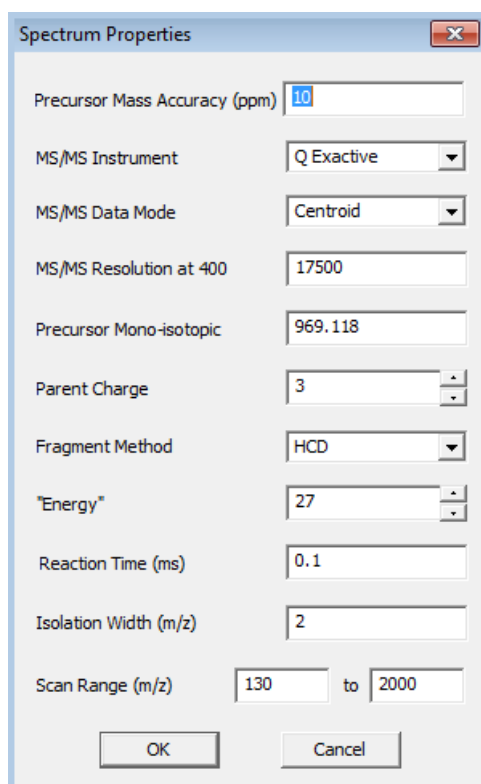
可以使用 MS/MS 窗口定义或修改质谱图。

- 定义质谱图属性
- 重新校正质谱图

### 定义质谱图属性

#### ❖ 若要定义质谱图属性

1. 在 MS/MS 窗口中选择 **Options (选项) > Spectrum Properties (质谱图属性)**。  
Spectrum Properties (质谱图属性) 对话框打开。



2. 若要指定母离子质量数精度 (单位 ppm)，在 Precursor Mass Accuracy (PPM) (母离子质量数精度, PPM) 框中输入一个值。
3. 若要选择仪器类型，从 MS/MS Instrument (MS/MS 仪器) 列表选择一个仪器。

4. 若要选择 MS/MS 数据模式，可从 MS/MS Data Mode（MS/MS 数据模式）列表中以下选项中选择：

- 选择 **Centroid**（**棒状图**）显示一条线。
- 选择 **Profile**（**轮廓图**）显示轮廓图。

对于自动处理，应用程序自动载入质谱图数据的棒状图，但是在显示色谱图中执行手动质谱平均时，将其显示为轮廓图数据组。

5. 若要指定分辨率，在 MS/MS Resolution（MS/MS 分辨率）框内输入 400。

6. 若要指定母离子  $m/z$ ，在 Precursor Mono-isotopic（母离子单同位素）框内输入一个值。

7. 若要识别母离子价态，在 Parent Charge（母离子价态）框中输入一个值。

8. 若要选择裂解方法，从 Fragment Method（裂解方法）列表中选择下列选项之一：

- **ETD**（电子转移解离）
- **ETD with sa**（带补充激活的电子转移解离）
- **HCD**（高能碰撞诱导解离）

9. 若要指定理论能量水平，在 Energy（能量）框内输入一个值。

10. 若要设定保留时间，在 Reaction Time（ms）（反应时间，ms）框内输入一个值。

11. 若要指定分离宽度的  $m/z$ ，在 Isolation Width（ $m/z$ ）（分离宽度， $m/z$ ）框内输入一个值。

12. 若要定义扫描范围，在 Scan Range（ $m/z$ ）（扫描范围， $m/z$ ）框内输入一个起始和结束时间。

13. 单击 **OK**（**确定**）修改质谱图。

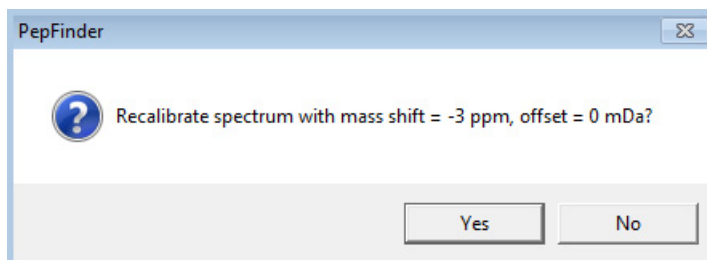
## 重新校正质谱图

若要重新校正质谱图以便与外部库比较，使用该程序。

### ❖ 若要重新校正质谱图

1. 选择 **Spectrum (质谱图) > Recalibrate Spectrum (重新校正质谱图)**。

应用程序显示以下类似的消息：



2. 点击 **Yes (是)**。

## 处理质谱图文件

若要查看或导出质谱图数据，使用以下任意程序。

- 若要导出主要质谱图
- 若要导出辅助质谱图
- 若要创建质谱图的碎片覆盖图谱
- 若要复制质谱图列表
- 若要复制质谱图
- 若要比较具有不同保留时间的两个质谱图
- 若要定义碎片离子检索选项
- 若要 [对 MS/MS 窗口的单个组分执行 de novo 测序](#)

### ❖ 若要导出主要质谱图

1. 在 MS/MS 窗口中选择 **File (文件) > Export Primary Spectrum (导出主要质谱图)**。
2. 在浏览框中命名文件然后点击 **Save (保存)**。

应用程序在 MS/MS 窗口中显示包括主要质谱图的文件。

❖ 若要导出辅助质谱图

1. 在 MS/MS 窗口中选择 **File (文件) > Export Secondary Spectrum (导出辅助质谱图)**。
2. 在浏览框中命名文件然后点击 **Save (保存)**。

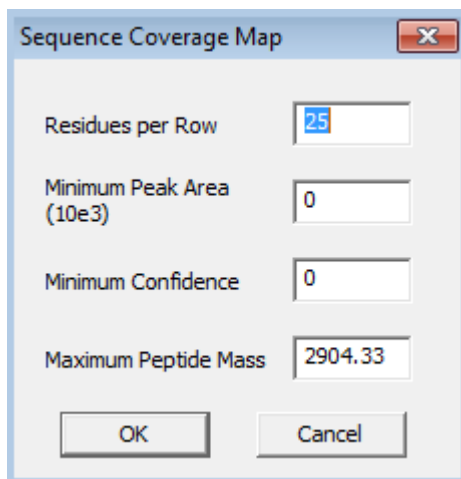
应用程序在 MS/MS 窗口中显示包括辅助质谱图的文件。

❖ 若要创建质谱图的碎片覆盖图谱

1. 在 MS/MS 窗口中选择 **File (文件) > Create Fragment Coverage Map (创建碎片覆盖图谱)**。

Sequence Coverage Map (序列覆盖图谱) 对话框打开。

应用程序计算覆盖百分比。应用程序为每个肽段标记保留时间，以不同颜色标记肽段强度 (红色、黄色、绿色和青色)，红色和青色分别表示最大和最小强度。



2. 指定每行的残基数。  
有效值: 2 至 500  
默认: 50
3. 定义最小峰面积。  
有效值: 0 至  $1e+006$   
默认: 0
4. 指定最小置信度水平。  
有效值: 0 至 1  
默认: 0.8

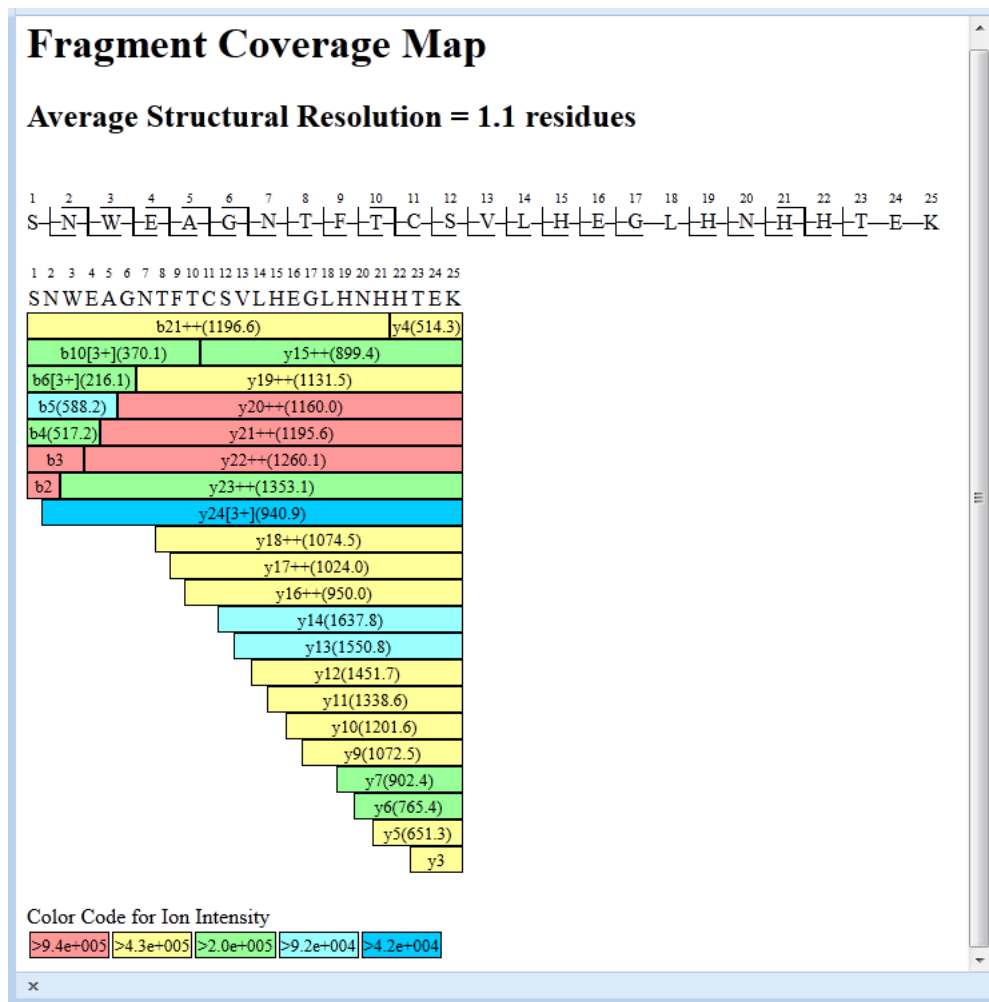
4 在 MS/MS 窗口中查看结果  
处理质谱图文件

5. 定义最大肽段质量数。

有效值：100 至 100000

默认：8000

6. 点击 **OK（确定）** 打开一个浏览框并保存碎片覆盖图谱。



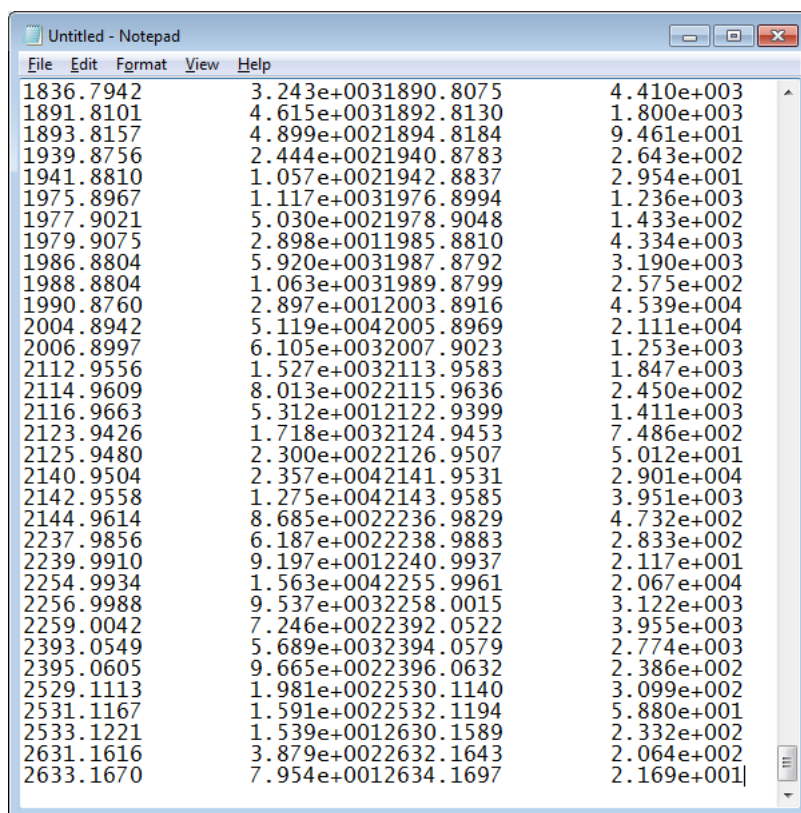
❖ 若要复制质谱图列表

1. 在 MS/MS 窗口中显示质谱图。
2. 选择 **Spectrum (质谱图) > Copy type of spectrum Spectrum List (复制质谱图类型/质谱图列表)**，或右击 Spectrum (质谱图) 视图并选择 **Copy Spectrum List (复制质谱图列表)**。

若选择 Primary (主要)，则该应用程序复制主要质谱图列表。若选择 Secondary (辅助)，则该应用程序复制辅助质谱图列表。

该应用程序复制列表到 Clipboard (剪贴板)，包括 *m/z* 和强度。

3. 将该列表粘贴到文本编辑器应用程序中。

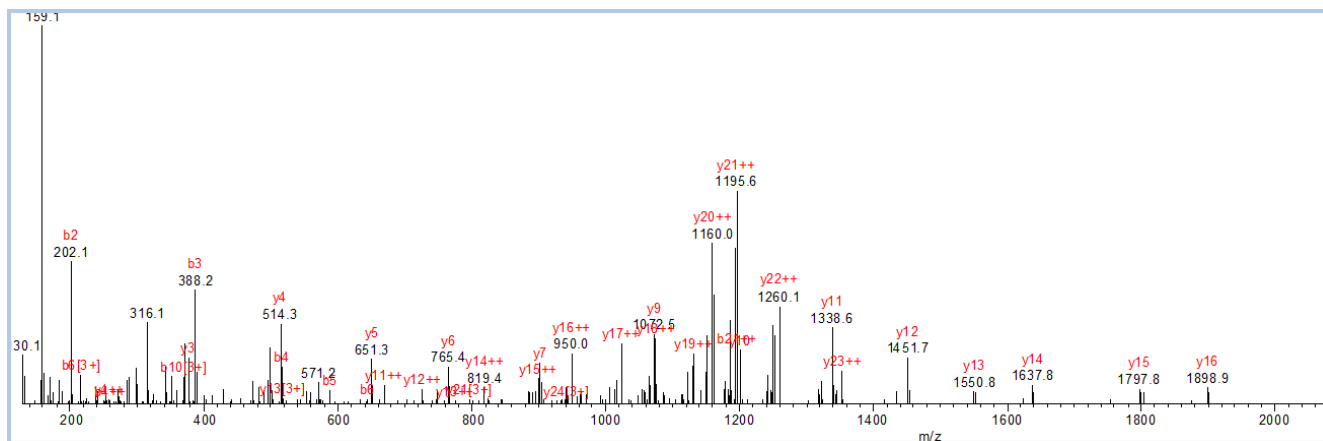


❖ 若要复制质谱图

1. 在 MS/MS 窗口中显示质谱图。
2. 选择 **Spectrum (质谱图) > Copy type of spectrum Spectrum (复制质谱图类型质谱图)**，或右击 Spectrum (质谱图) 视图并选择 **Copy Spectrum (复制质谱图)**。

若选择 Primary (主要)，则该应用程序复制主要质谱图。若选择 Secondary (辅助)，则该应用程序复制辅助质谱图。

该应用程序将质谱图复制至 Clipboard (剪贴板)。



❖ 若要比较具有不同保留时间的两个质谱图

1. 在 Main (主要) 窗口中选择一个保留时间。
2. 点击该区域角落里的方框，激活该组分的 Spectrum (质谱图) 视图。
3. 复制质谱图。
4. 选择用于比较的质谱图保留时间。
5. 选择 **Spectrum (质谱图) > Paste Data as type of spectrum Spectrum (粘贴数据为质谱图类型质谱图)** 将质谱图粘贴到 MS/MS 窗口中，以比较两个质谱图。

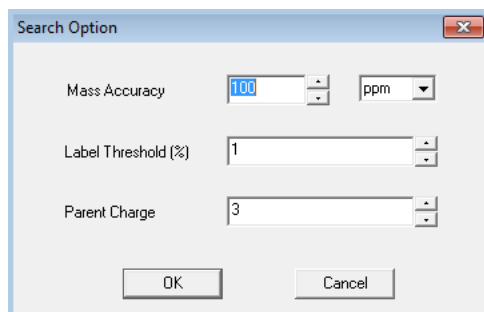
若选择 Primary (主要)，则该应用程序将该质谱图粘贴为主要质谱图。若选择 Secondary (辅助)，则该应用程序将该质谱图粘贴为辅助质谱图。

❖ 若要定义碎片离子检索选项

1. 在 Spectrum（质谱图）窗口中选择 **Options（选项） > Search Criteria（检索标准）**。

当在质谱图中检索碎片离子指定离子类型时，使用 Search Criteria（检索标准）对话框设定标准。

Search Option（检索选项）对话框打开。



2. 若要设定质量数精度水平，在 Mass Accuracy（质量数精度）框内输入一个值，然后选择 **ppm** 或 **daltons** 指定值类型。

有效值：0.0001 至 2000

默认：100

3. 若要指定标记的最小离子（与强度最大的离子相比），在 Label Threshold (%)（标签阈值，%）框内输入一个值。

有效值：0 至 100

默认：1

4. 若要指定母离子的价态，在 Parent Charge（母离子价态）框内输入一个价态值。

有效值：所有整数

默认：2

❖ 若要对 MS/MS 窗口的单个组分执行 de novo 测序

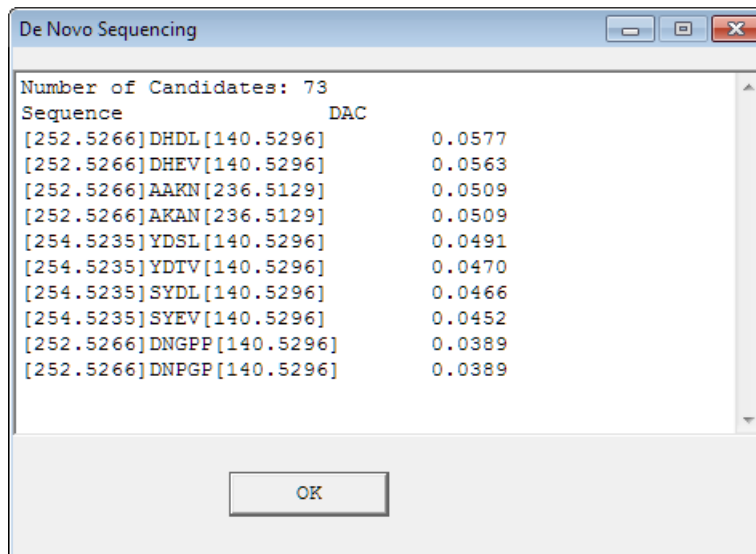
**注释** 可以从 MS/MS 窗口显示的质谱图中点击单个离子将其选中以进行 de novo 测序，或者从 Main（主要）窗口的离子列表中直接选择离子进行测序（参阅第 54 页上的“使用 De Novo 测序识别组分”）。当使用 de novo 测序时，若要定义 de novo 测序参数，参阅第 54 页上的“设置 De Novo 测序”。

1. 若要对单个肽段串联质谱图执行 de novo 测序，利用以下其中一种方法将该质谱图复制到 MS/MS 窗口的下方面板中：
  - 若要自动将串联质谱图载入 MS/MS 窗口，点击 Main（主要）窗口中离子列表的离子保留时间。



- 若要使用 Clipboard（剪贴板）复制粘贴质谱图，选择 **Spectrum（质谱图）** > **Paste Data as Primary Spectrum（将数据粘贴为主要质谱图）**。
2. 选择 **Actions（操作）** > **De Novo Sequencing（De Novo 测序）**。

应用程序在 De Novo Sequencing（De Novo 测序）窗口中显示结果。



## 处理离子

可以分析或模拟离子（执行同位素分布的理论计算）或右击该标签移除离子标签。

- [移除离子标签](#)
- [分析离子](#)
- [处理碎片离子](#)

## 移除离子标签

### ❖ 若要移除离子标签

1. 右击质谱图中的离子。
2. 选择 **Remove This Ion Label（移除该离子标签）**。


应用程序移除该标签。

## 分析离子

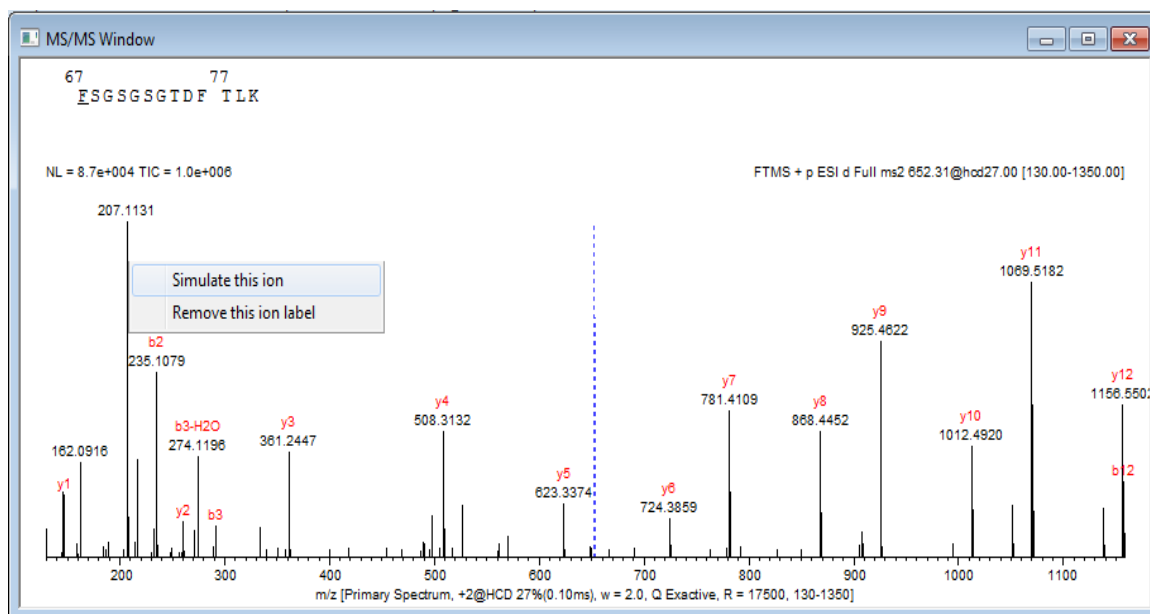
可以通过模拟离子创建同位素分布的理论计算。

### 执行蛋白质分析

#### ❖ 若要模拟离子并在 MS/MS 窗口中执行 top-down 蛋白质分析

1. 选择 **View (视图) > MS/MS Window (MS/MS 窗口)** 或点击  打开 MS/MS 窗口。
1. 选择离子并右击离子标签 (红色)。
2. 选择 **Simulate This Ion (模拟该离子)** 计算离子的理论同位素分布, 将该结果与理论分布进行比较, 确认碎片归属。

该应用程序显示上方 (辅助) 质谱图中同位素分布的理论计算。



应用程序根据下列规则计算理论同位素分布:

- 若离子小于 25 kDa, 则使用二项展开式
  - 若离子大于 25 kDa, 则模拟 200000 分子
3. 若要根据元素组分 (仅 CHNOS) 执行同位素模拟, 选择 **Action (操作) > Simulate Ion Isotope Pattern (模拟离子同位素分布)**。

在完成碎片归属后, 可以创建一个序列覆盖图谱, 这样可以指定离子的断裂位点 (例如, K 后面)。有关详细信息, 参阅第 95 页上的“若要创建质谱图的碎片覆盖图谱”。

## 处理碎片离子

使用以下步骤查找和导出碎片离子。

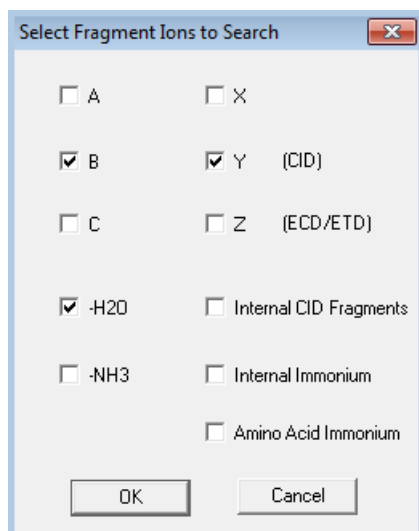
- [检索碎片离子类型](#)
- [导出碎片离子](#)

### 检索碎片离子类型

#### ❖ 若要选择碎片离子类型

1. 在 MS/MS 窗口中选择 **Options (选项) > Select Fragment Ions to Search (选择要检索的碎片离子)**。

Select Fragment Ions to Search (选择要检索的碎片离子) 对话框打开。



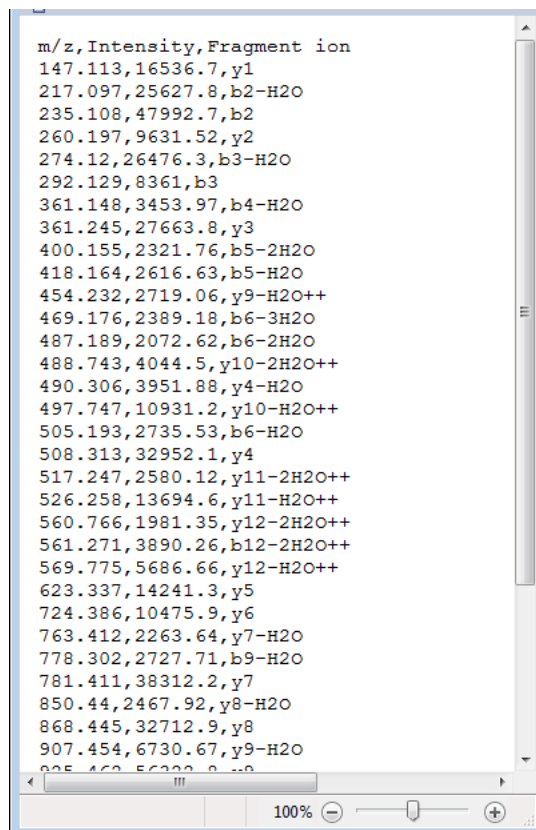
2. 若要设定质谱图中检索碎片离子的标准，归属离子类型，在此对话框中选择待识别碎片类型的选项。
3. 点击 **OK (确定)** 开始检索。

## 导出碎片离子

### ❖ 若要导出碎片离子列表

1. 在 MS/MS 窗口中选择 **File (文件) > Export Fragment Ions (导出碎片离子)** 导出匹配归属肽段序列的碎片离子列表。
2. 在浏览框中命名文件然后点击 **Save (保存)**。

应用程序在 MS/MS 窗口中显示主要质谱图。



```
m/z, Intensity, Fragment ion
147.113, 16536.7, y1
217.097, 25627.8, b2-H2O
235.108, 47992.7, b2
260.197, 9631.52, y2
274.12, 26476.3, b3-H2O
292.129, 8361, b3
361.148, 3453.97, b4-H2O
361.245, 27663.8, y3
400.155, 2321.76, b5-2H2O
418.164, 2616.63, b5-H2O
454.232, 2719.06, y9-H2O++
469.176, 2389.18, b6-3H2O
487.189, 2072.62, b6-2H2O
488.743, 4044.5, y10-2H2O++
490.306, 3951.88, y4-H2O
497.747, 10931.2, y10-H2O++
505.193, 2735.53, b6-H2O
508.313, 32952.1, y4
517.247, 2580.12, y11-2H2O++
526.258, 13694.6, y11-H2O++
560.766, 1981.35, y12-2H2O++
561.271, 3890.26, b12-2H2O++
569.775, 5686.66, y12-H2O++
623.337, 14241.3, y5
724.386, 10475.9, y6
763.412, 2263.64, y7-H2O
778.302, 2727.71, b9-H2O
781.411, 38312.2, y7
850.44, 2467.92, y8-H2O
868.445, 32712.9, y8
907.454, 6730.67, y9-H2O
925.462, 56222.0, y9
```

## 处理肽段

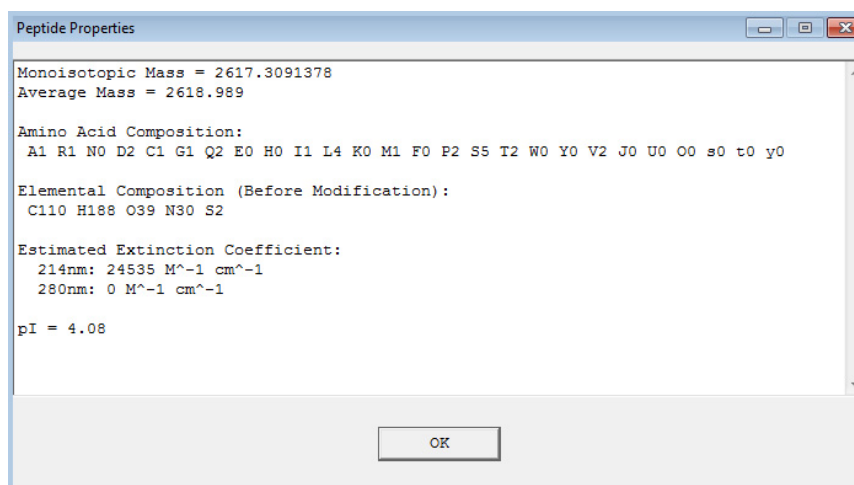
使用以下程序查看肽段属性并标记蛋白质水解肽段。还可以创建蛋白质水解碎片列表。

有关显示肽段属性的更多信息，参阅第 67 页上的“查看蛋白质序列”。

### ❖ 若要显示肽段属性

在 MS/MS 窗口中选择 **Actions (操作) > Show Peptide Properties (显示肽段属性)**。

Peptide Properties (肽段属性) 对话框打开。



## 预测 MS/MS

PepFinder 应用程序使用动力学模型预测肽段 MS/MS。将大写单字母代码用于肽段序列。

代码	定义
J	羧甲基半胱氨酸
U	羧氨基甲基半胱氨酸
O	氧化蛋氨酸
s, t, y	分别为磷酸化丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸

还可以使用下列特殊代码。

- 对于修饰，将修饰放在序列后面的括号内。例如，AADECFGHK(C5+250)(H8-9) 说明位置 5 的 Cys 被 +250 u 修饰，并且位置 8 的 His 被 -9 u 修饰。AANASAA(N3+A2G0F) 说明位置 3 的 Asn 被 A2G0F 糖基化。
- 若要定义二硫键，将其放在括号内。例如，ADCAGHTYCHPEK(C3-C9) 说明位置 3 的 Cys 和位置 9 的 Cys 被二硫键连接。
- 对于碰撞能量，指定 LCQ/LTQ 的归一化碰撞能量 (%)、Q-TOF 的电压和 ETD 的反应离子 AGC 目标值。

## 执行肽段列表的批次预测

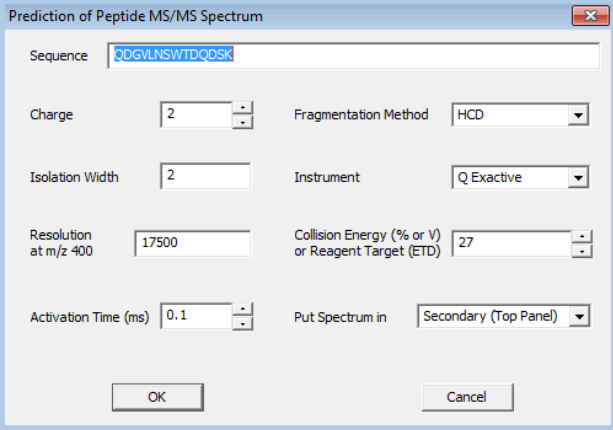
### ❖ 若要执行肽段列表的批次预测

1. 将肽段列表保存到文本文件。

文件中的每行包括肽段序列以及价态。几乎所有分隔符都可用。如果没有给出价态，该应用程序根据氨基酸组分和肽段长度估算价态数。

2. 在 MS/MS 窗口中选择 **Actions (操作) > Predict Peptide MS/MS (Kinetic Model) (预测肽段 MS/MS, 动力学模型)** 执行肽段数据组的批次预测。

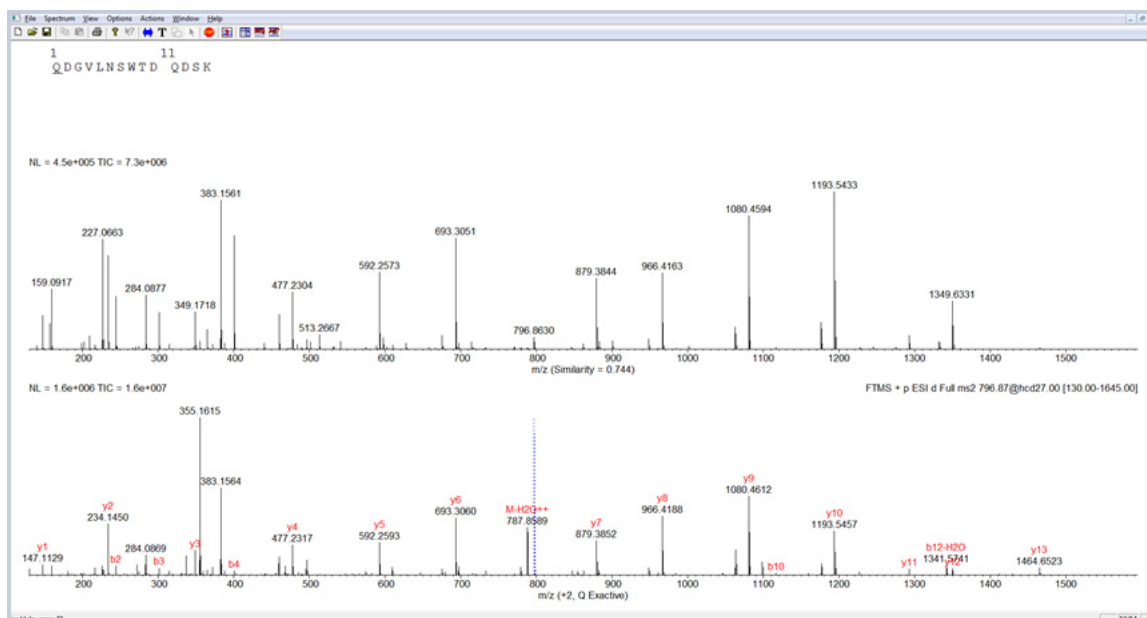
应用程序打开 Prediction of Peptide MS/MS Spectrum (肽段 MS/MS 质谱图预测) 对话框。



3. 设定合适的碰撞能量、分离宽度和仪器型号。
  - a. 若要设定价态，在框内输入一个值。  
有效值：1–100  
默认：0.8
  - b. 若要设定 Isolation Width (分离宽度)，在框内输入一个值。  
有效值：0.1 至 40  
默认：1
  - c. 若要定义  $m/z$  400 的分辨率，在框内输入一个值。  
有效值：100 至 5000000  
默认：17500
  - d. 若要指定激活时间 (ms)，在框内输入一个值。  
有效值：0 至 1000  
默认：1000

- e. 若要定义裂解方法，从下列选项中选择：  
有效值：CID、CID with WB activation（带 WB 激活的 CID）、ETD、ETD with supplemental activation（带补充激活的 ETD）、ECD 和 HCD  
默认：HCD
- f. 若要选择仪器，从列表选择一个仪器名称。
- g. 若要定义碰撞能量（% 或 V）或反应离子目标值（ETD），在框内输入一个值。  
有效值：350 至 1e+007  
默认：从原始数据文件中读取
- h. 若要将质谱图放入指定位置，从 **Primary (Bottom Panel)（主要，底部面板）** 或 **Secondary (Top Panel)（辅助，顶部面板）** 中选择。  
默认：Secondary (Top Panel)（辅助，顶部面板）
4. 若要预测同位素峰（否则，每个离子被一个平均离子代表），点击 **OK（确定）**。

应用程序显示 MS/MS 窗口中的变化。



该应用程序还把结果保存在名为 MSMSPredict.txt 的文件中。将其重命名为一个有意义的名称。



以下是 MSMSPredict.txt 的格式:

第 1 行: 文件中质谱图的总数目

第 2 行: 肽段 1 的序列

第 3 行: 肽段 1 的描述

第 4 行: 肽段 1 的价态

第 5 行: 肽段 1 的裂解方法 (1 代表 CID, 2 代表 ETD, 3 代表 ETD with supplemental activation [带补充激活的 ETD])

第 6 行: 肽段 1 的碰撞能量 (或 ETD 的反应离子目标值)

第 7 行: 肽段 1 的反应时间 (单位是秒)

第 8 行: 肽段 1 的分离宽度

第 9 行: 肽段 1 的仪器型号 (1 代表 LCQ, 2 代表 LTQ, 3 代表 Orbitrap, 4 代表 LTQFT, 5 代表 QTOF)

第 10 行:  $m/z$  400 下的肽段 1 的分辨率

第 11 行: 肽段 1 的扫描范围

第 12 行: 肽段 1 的质量数强度对的总数目

第 13 行到第 n 行: 肽段 1 的质量数强度对

第 n+1 行: 肽段 2 的序列

## 参考

### 基于自动母离子排除采集数据:

Zhang, Z. Automated Precursor Ion Exclusion During LC/MS/MS Data Acquisition for Optimal Ion Identification. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, 23(8), 1400–1407.

### 大规模的修饰识别 / 定量:

Zhang, Z. Large-scale Identification and Quantification of Covalent Modifications in Therapeutic Proteins. *Anal. Chem.* **2009**, 81(20), 8354–8364.

### 采用 CID MS/MS 预测进行肽段识别:

Zhang, Z. Prediction of low-energy collision-induced dissociation spectra of peptides. *Anal. Chem.* **2004**, 76(14), 3908–3922.

Zhang, Z. Prediction of low-energy collision-induced dissociation spectra of peptides with three or more charges. *Anal. Chem.* **2005**, 77(19), 6364–6373.

Zhang, Z. and Shah, B. Prediction of collision-induced dissociation spectra of common N-glycopeptides for glycoform identification. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 10194–10202.

Zhang, Z. Prediction of collision-induced dissociation spectra of peptides with post-translational or process-induced modifications. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 8642–8651.

### 采用 ETD/ECD MS/MS 预测进行肽段识别:

Zhang, Z. Prediction of Electron-transfer/Capture Dissociation Spectra of Peptides. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 1990–2005.

### 保留时间对齐:

Zhang, Z. Retention time alignment of LC/MS data by a divide-and-conquer algorithm. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, 23(4), 764–772.

### 蛋白质理论质量数计算:

Zhang, Z. H. Pan and X. Chen, Mass Spectrometry for Structural Characterization of Therapeutic Antibodies. *Mass Spectrom. Reviews.* **2009**, 28(1), 147–176.

**质谱处理:**

Zhang, Z. and Mcelvain, J. S. Optimizing spectroscopic signal-to-noise ratio in analysis of data collected by a chromatographic/spectroscopic system. *Anal. Chem.* **1999**, 71(1), 39–45.

**电荷和质量数测定:**

Zhang, Z. and Marshall, A. G. A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, 9, 225–233.

**Top-Down 蛋白质表征:**

Zhang, Z. and Shah, B. Characterization of variable regions of monoclonal antibodies by top-down mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, 79(15), 5723–5729.

**H/D 交换数据处理:**

Zhang, Z, Zhang, A. and Xiao, G. Improved Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Platform with Fully Automated Data Processing. *Anal. Chem.* **2012**, 84(11), 4942–4949.

# 索引

## A

- 氨基酸，为蛋白质识别选择 55
- 氨基酸置换
  - 常见假象 82
  - 识别 82

## B

- BPC 色谱图 41
- 半胱氨酸，和 CN 诱导断裂 80
- 报告，自动生成 19
- 编辑序列 73
- 标签
  - 添加到色谱图 44
  - 用于色谱图 40
  - 用于色谱图的类型 44
- 标题，为质谱图修改 52

## C

- Chromeleon，生成文件 61
- CN 诱导断裂，检索 80
- 查看
  - 蛋白质质量数 69
  - 辅助质谱图 88
  - 肽段属性 71
  - 在 MS/MS 窗口中的肽段属性 104
  - 质谱图组分值 46
  - 主要质谱图 87
- 插入文本 49
- 处理数据
  - 定义任务 23
  - 限制检索 24

## D

- de novo 处理
  - 单个组分 56
  - 多个肽段 57
  - 方法 56, 99

MS/MS 窗口 99

- 设置 54
- 选择氨基酸 55

打开 MS/MS 窗口 86

打印蛋白质序列文件 72

蛋白酶

- 定义特异性 5
- 选择 5

蛋白质水解碎片，检索 81

蛋白质序列

- 添加 4
- 添加到 Sequence（序列）窗口 73

蛋白质序列文件

- 保存 74
- 打印 72
- 简介 67

蛋白质质量数，查看 69

单同位素质量数 68

导出

- 离子列表 58
- 所有文件的离子列表 58

导出数据

- 至 Chromeleon 61
- 至 Mascot 59
- 至 PinPoint 60

低丰度离子 52

定义新实验 3

## E

二硫键归属，检索 80

二硫键连接的肽段，检索质量数 78

## F

FASTA 文件，添加 4

范围

- 选择肽段 69
- 在列表视图中显示 36

## 索引:G

分析蛋白质 101  
复制  
  离子列表 30  
  MS/MS 质谱图 98  
  MS/MS 质谱图列表 97  
  Sequence (序列) 窗口内容 72  
  色谱图 45  
辅助质谱图, 导出 95

## G

Gaussian 解卷积 20  
工具栏, 查看或隐藏 29  
观察低丰度离子 52

## J

激活一个区域 28  
价态解卷积 20  
检索  
  蛋白质水解碎片 81  
  二硫键连接的肽段 78  
  离子列表 31  
  肽段碎片 77  
结果, Main (主要) 窗口视图 25  
解卷积  
  Gaussian 20  
  价态 20  
截取质谱图 50

## L

理论消化 75  
理论质量数, 定义 9  
离子  
  单个离子信息 33  
  模拟 90  
  排序显示 35  
  显示信息 34  
  信息 32  
  选择要显示的属性 36  
  移除离子标签 90  
  移除识别 33  
  识别 33  
  置信度分数 74  
离子标签, 移除 100  
离子分布, 模拟 101  
离子列表  
  查看 34  
  单个离子信息 33  
  导出 58  
  复制 30  
  复制到文件 30

更新 34  
检索 31  
离子信息 32  
为所有文件导出 58  
移除识别 33  
离子置信度分数 74  
联系我们 x

## M

Main (主要) 窗口, 激活一个区域 28  
Mascot, 生成文件 59  
MS/MS 窗口  
  查看 29  
  打开 86  
  定义碎片离子检索选项 99  
  分析蛋白质 101  
  复制质谱图 98  
  复制质谱图列表 97  
  模拟离子同位素分布 101  
  碎片离子  
    导出列表 103  
    检索 102  
  肽段列表, 预测 106  
  肽段属性  
    查看 104  
    查看串联 105  
  移除离子标签 100  
  预测理论串联质谱图 85  
  粘贴质谱图 98  
MS/MS 视图  
  创建质谱图的碎片覆盖图谱 95  
  导出质谱图 94  
  定义质量数范围 91  
  定义质谱图属性 92  
  辅助质谱图  
    查看 88  
    模拟 88  
    删除 90  
  恢复全扫描视图 90  
  提高放大倍数 90  
  重新校正质谱图 94  
  主要质谱图  
    查看 87  
    移动 87  
MSpep.ini, 编辑 8

## P

PepFinder 实验文件, 自动生成 19  
PinPoint, 生成文件导入 60  
排序离子 35  
平均质量数 68

**Q**

强度, 为低丰度离子设定 52

**S**

Sequence (序列) 窗口

- 保存蛋白质序列 74
- 查看 29
- 查看蛋白质质量数 69
- 打开 68
- 复制内容 72
- 简介 67
- 肽段属性 71
- 添加序列 73
- 修改数据 67
- 修改字体 71
- 选择肽段 71

SIC 色谱图 41

色谱图

- 标记 40
- 定义时间范围 43
- 复制 45
- 恢复完整范围 39
- 截取 38
- 类型 41
- 缩减时间范围 38
- 添加标签 44
- 修改该区域 39
- 修改字体 43
- 选择要显示的类型 40

生成文件

- 简介 59
- 用于 Chromeleon 61
- 用于 Mascot 59
- 用于 PinPoint 60

剩余的质谱图, 显示 50

时间范围

- 定义色谱图 43
- 恢复色谱图 39
- 缩减色谱图 38
- 指定 36

示例文件, 下载 2

实验

- 保存 25
- 定义新 3
- 添加文件 22

手动编辑修饰列表 8

数据处理选项

- 保存 19
- 对齐离子, 最大保留时间漂移 15
- 峰检测
  - 被视作两个色谱峰的最小峰谷值 14
  - 典型色谱峰宽度 13

Gaussian 滤波器宽度 14

绝对 MS 信号阈值 12

相对 MS 信号阈值 13

相对模拟阈值 13

质量数容许偏差 15

最大 MS 峰宽 14

最大色谱峰宽度 14

最小 MS 峰宽 14

肽段识别

检索氨基酸置换 18

MS/MS 17

N 糖基化 17

未指定修饰的质量数变化 18

修饰的最大数量 / 肽段 17

质量数精度 16

最大肽段质量数 16

质量数测量, 最大质量数 15

自动生成报告 19

输入序列 73

属性

按离子属性排序 35

选择离子属性 36

碎片离子

在 MS/MS 窗口中导出列表 103

在 MS/MS 窗口中检索 102

碎片离子符号 89

碎片离子检索选项, 定义 99

缩放质谱图 47

**T**

TIC 色谱图 41

肽段

碎片, 检索 77

选择范围 69

肽段列表, 预测 MS/MS 106

肽段属性, 显示 71

肽段属性, 在 MS/MS 窗口中查看 105

添加

蛋白质序列 4

辅助质谱图 88

图谱, 序列覆盖 62

**W**

文本

插入 Spectrum (质谱图) 视图 49

更改字体显示 49

文档

访问 vii

其他 vii

文件

载入 22

## 索引:X

载入顺序 22

## X

下载示例文件 2

线宽, 为质谱图修改 48

显示

全扫描质谱图 47

剩余的质谱图 50

消化, 选择蛋白酶 5

修改

Spectrum (质谱图) 区域 49

质谱图质量数范围 48

修改字体显示 71

修饰, 显示丰度 64

修饰列表

手动编辑 8

添加和移除修饰 6

自定义修饰 6

修饰总结

创建 64

示例 65

自动生成 19

序列

创建序列覆盖图谱 62

输入或编辑序列 73

载入数据文件 22

序列覆盖图谱

创建 62

示例 63

自动生成 19

选择

蛋白酶 5

肽段属性 71

质量数测量, 质量数棒状图阈值 15

质量数范围, 显示 48

质量数列表

从质谱图 53

传递到文档 53

质谱图

查看峰列表 47

查看主要和辅助质谱图 90

查看组分值 46

处理 Spectrum (质谱图) 视图 (前言) 45

创建质量数列表 53

截取质谱图 50

模拟离子 90

区域, 定义 49

碎片覆盖图谱 95

碎片离子符号 89

提高放大倍数 47

显示全扫描质谱图 47

修改标题 52

修改线宽 48

质谱图的碎片覆盖图谱 95

质谱图质量数范围 48

质谱图中的峰列表 47

执行理论消化 75

主要质谱图

导出 94

修改属性 92

重新校正 94

状态栏, 查看或隐藏 29

自定义修饰 6

字体

为色谱图修改 43

修改 71

组分值, 质谱图 46

## Y

仪器方法, 显示 29

## Z

粘贴 MS/MS 质谱图 98

识别

从列表移除识别 33

单个肽段 56

多个肽段 57

提供识别信息 33

移除离子识别信息 33

质量数

平均 9

作为单同位素 68

作为平均 68

质量数, 检索 CN 诱导断裂 80