

# Q Exactive 简明教程



## 第一部分 仪器状态检查

在正式做样前，首先对仪器状态进行检查，包括离子源喷雾、背景响应、质量轴等，确保仪器状态正常后，即可开始做样。

### 1、纳流离子源参数设置

将常规 HESI 源更换为纳流 NSI 源后，仪器自动识别，Tune 界面 Ion Source Type 一栏显示 NSI。

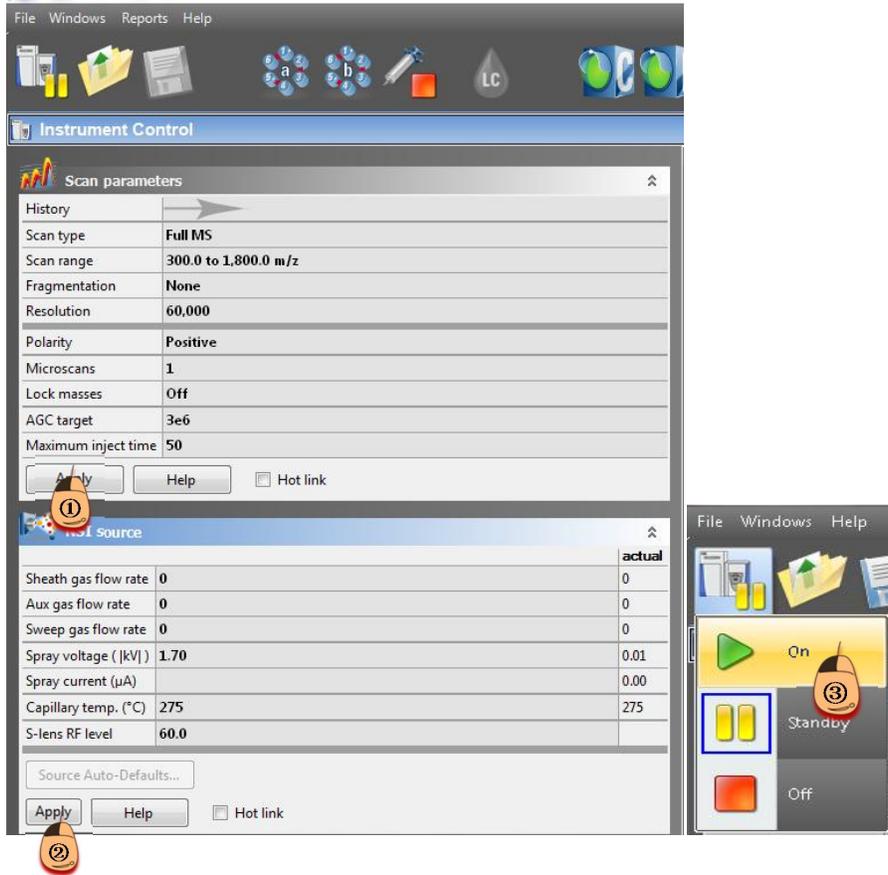
喷雾电压(Ion Spray Voltage): 正离子模式下，NSI 源喷雾电压设置区间在 1500 V ~ 2500 V，具体数值应根据喷雾的状态和喷针的老化程度调整，新喷针从 1500 V 开始。负离子模式通常不涉及。

吹扫气(Sweep Gas)设为 0，离子传输管温度(Ion Transfer Tube Temp.)设为 275 °C，平时无需改动。

设置参数后，新数值显示为粗体，点击 Apply 后，仪器使用新数值。

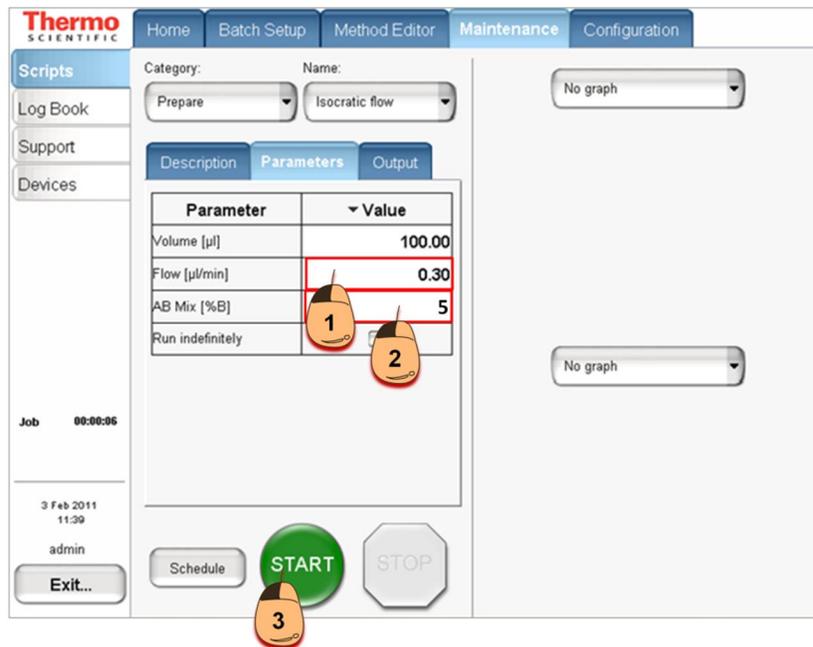
参数设置完成后，点击 ON，仪器开始扫描。

操作步骤如下图所示。



## 2. 纳流离子源喷雾检查

将喷针针尖残留液滴擦除后，先打开质谱扫描，再打开液相流速。液相流速设为 300 nL/min，流动相比例设为 5% B 相（B 相为乙腈相）（以 Easy-nLC 为例，见下图）。

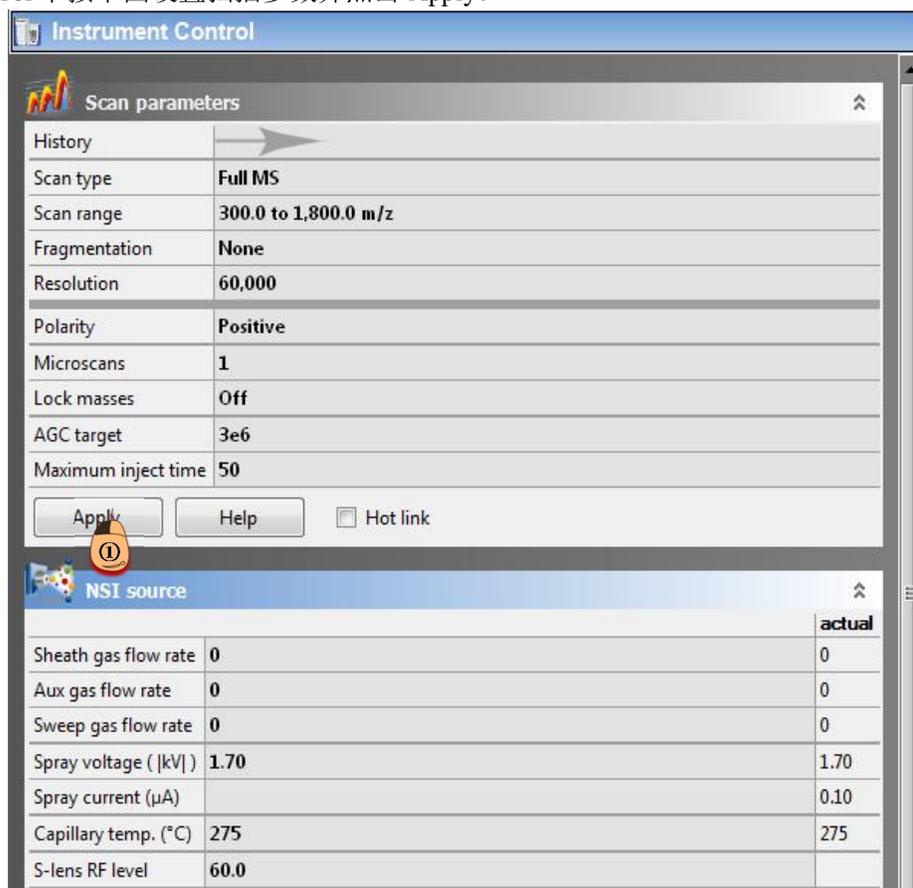


10 分钟后，通过摄像头观察喷针喷雾情况，如下图所示，针尖无明显液滴形成代表喷雾良好，针尖有液滴形成代表喷雾不佳。



如喷雾不佳，则以 100 V 的幅度往上调整电压，直到无明显液滴形成为止。例如，当电压设为 1500 V 时喷雾不佳，则尝试 1600 V，等待 10 分钟后如果仍有液滴形成，则尝试 1700 V，以此类推，直至液滴消失。

确认无明显液滴形成后，再通过背景信号质谱响应检查喷雾稳定性。在 Tune 界面 Instrument Control 中按下图设置扫描参数并点击 Apply。



The screenshot shows the 'Instrument Control' window with two main sections: 'Scan parameters' and 'NSI source'.

**Scan parameters:**

History	→
Scan type	Full MS
Scan range	300.0 to 1,800.0 m/z
Fragmentation	None
Resolution	60,000
Polarity	Positive
Microscans	1
Lock masses	Off
AGC target	3e6
Maximum inject time	50

Buttons: Apply, Help,  Hot link

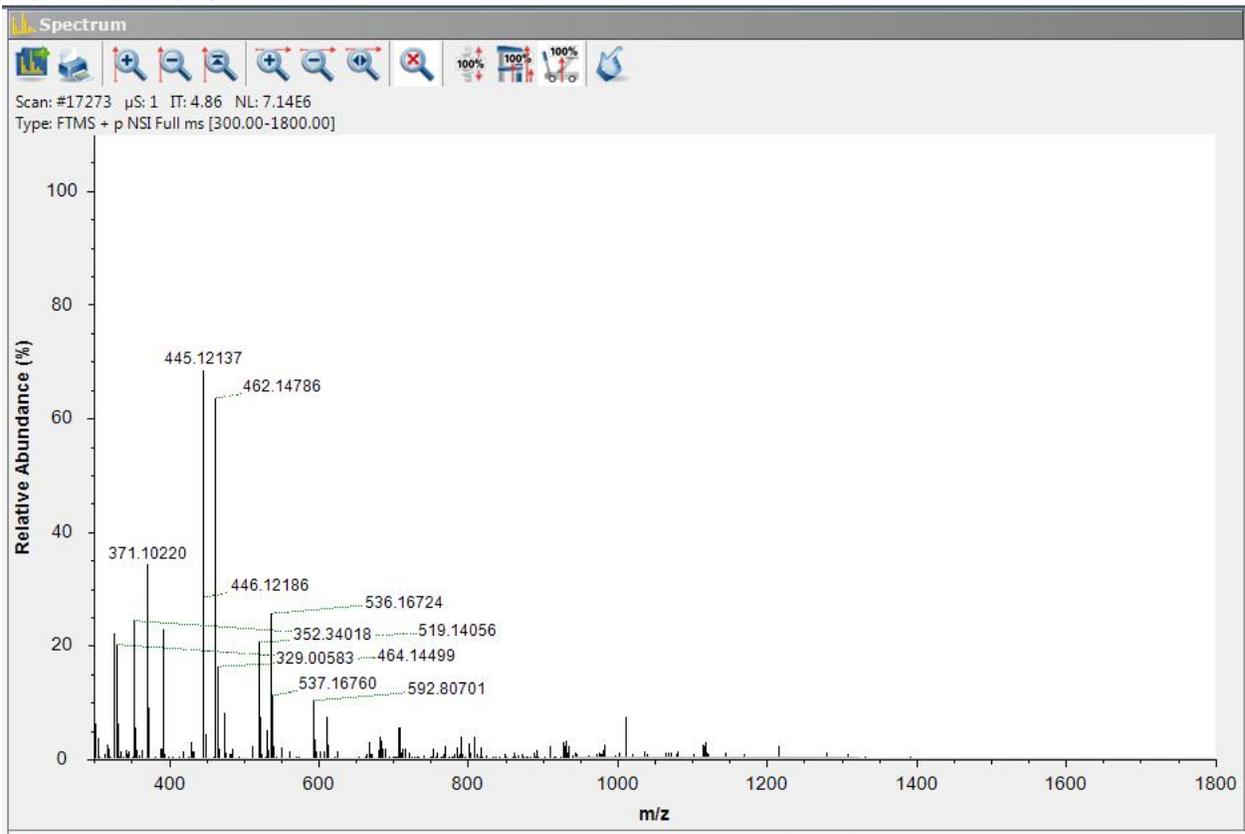
**NSI source:**

		actual
Sheath gas flow rate	0	0
Aux gas flow rate	0	0
Sweep gas flow rate	0	0
Spray voltage ( kV )	1.70	1.70
Spray current (μA)		0.10
Capillary temp. (°C)	275	275
S-lens RF level	60.0	

Instrument Status	
Instrument	
Current Scan	
Total Ion Current	172.69 E6 ions/sec
TIC Variation	2 %
Inject time	5.22 ms
AGC Target reached	100 %
AGC Prescan Mode	1
Scan Rate	5.6 scans/sec
Lock masses	
Lock mass found	0
Lock mass m/z correction	+0.00 ppm

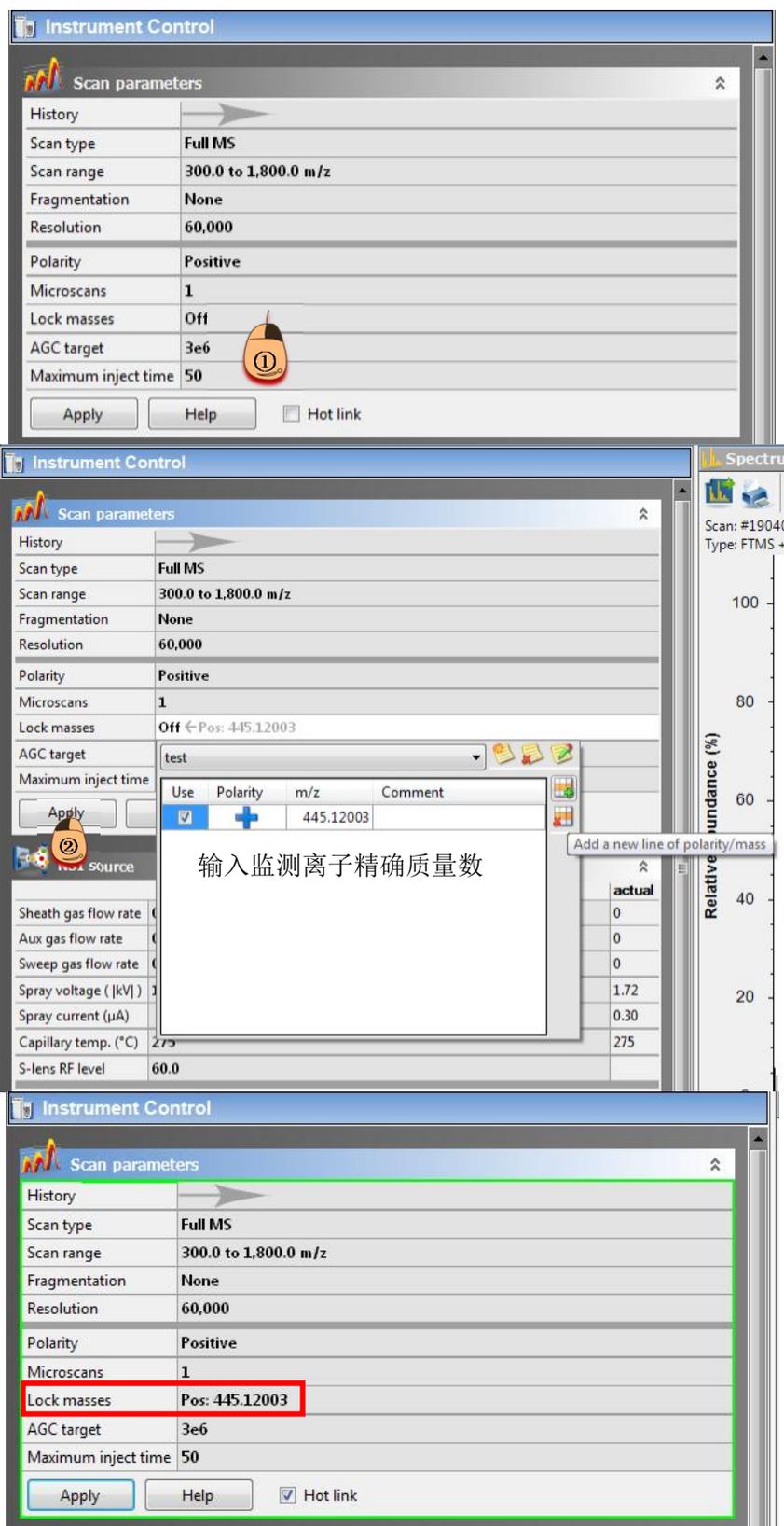
观察此处的 TIC Variation, 小于等于 10% 说明喷雾稳定

观察空气中环聚二甲基硅氧烷(polydimethylcyclsiloxane)形成的一系列背景离子峰, 较强的有  $m/z$  445.12003, 典型的谱图如下图所示, 谱图响应(NL)与实验室所在地气候有关, 通常应达到  $1E6$  以上, 无明显的其他杂峰。



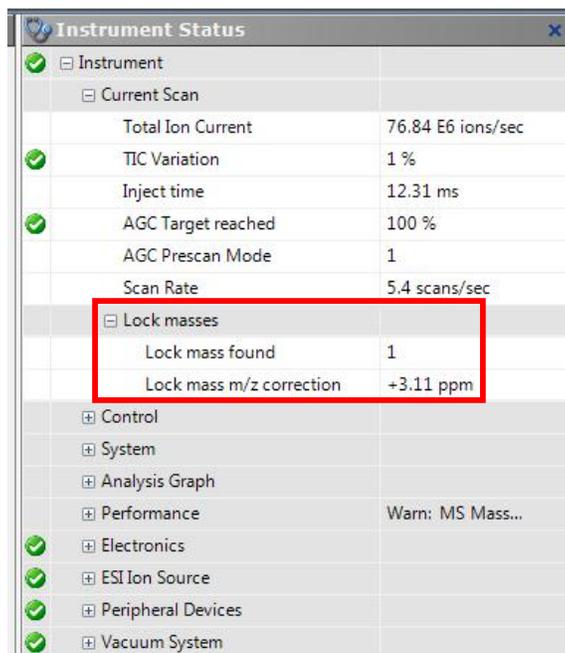
### 3、质量轴检查

根据背景离子精确质量数监测仪器质量轴: 在 Tune 界面 Instrument Control-Scan Parameters-Lock masses 中先右键单击, 打开 Lock Mass 列表, 再按下图所示输入监测离子的精确质量数 (通常选择  $m/z$  445.12003), 然后点击 Apply, 观察质量偏差。



在 tune 界面右侧 Instrument Status 栏中，点击 Instrument-Current Scan-Lock masses，即可观察到检测离

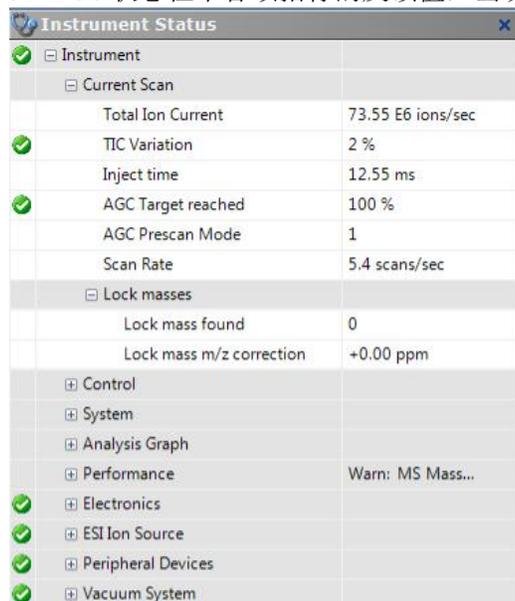
子的质量偏差。



Instrument Status	
Instrument	
Current Scan	
Total Ion Current	76.84 E6 ions/sec
TIC Variation	1 %
Inject time	12.31 ms
AGC Target reached	100 %
AGC Prescan Mode	1
Scan Rate	5.4 scans/sec
Lock masses	
Lock mass found	1
Lock mass m/z correction	+3.11 ppm
Control	
System	
Analysis Graph	
Performance	Warn: MS Mass...
Electronics	
ESI Ion Source	
Peripheral Devices	
Vacuum System	

#### 4、其他状态检查

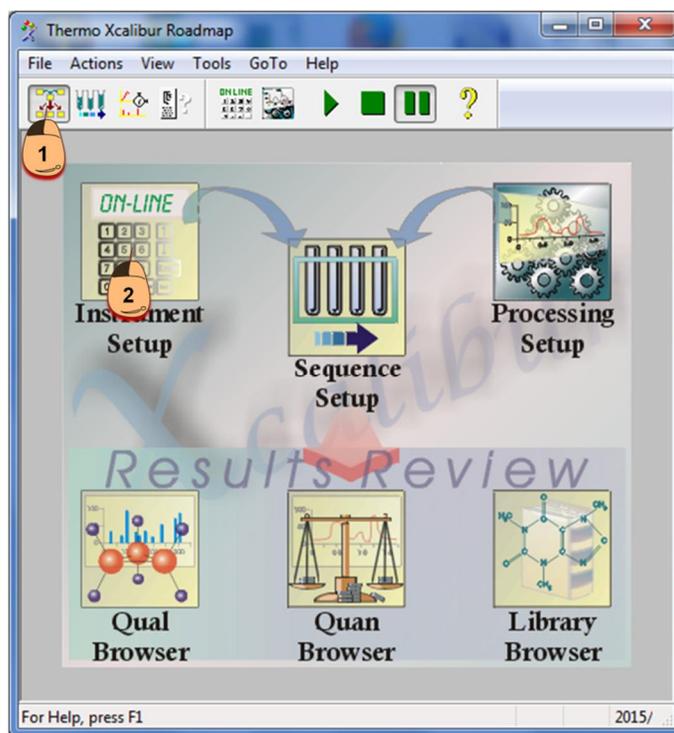
仪器扫描时，注意观察 STATUS 状态栏中各项指标的反馈值，出现异常应及时排查原因。



Instrument Status	
Instrument	
Current Scan	
Total Ion Current	73.55 E6 ions/sec
TIC Variation	2 %
Inject time	12.55 ms
AGC Target reached	100 %
AGC Prescan Mode	1
Scan Rate	5.4 scans/sec
Lock masses	
Lock mass found	0
Lock mass m/z correction	+0.00 ppm
Control	
System	
Analysis Graph	
Performance	Warn: MS Mass...
Electronics	
ESI Ion Source	
Peripheral Devices	
Vacuum System	

## 第二部分 方法编辑

打开 Xcalibur 软件，点击 Roadmap View，再点击 Instrument Setup，即可开始编辑色谱质谱做样方法，色谱方法请参考色谱部分教材，本教材讲述质谱方法编辑。



质谱编辑方法界面如下图所示，点击 Q Exactive Orbitrap MS 图标，打开质谱方法编辑器，即可开始编辑质谱方法。



## 1、Global 界面设置

1.1 Global Lists: 如下图所示，单击 Global Lists，可看到 Lock Masses/Inclusion/Exclusion/Neutral Loss/Tag Masses List，可根据具体实验设定相应清单：

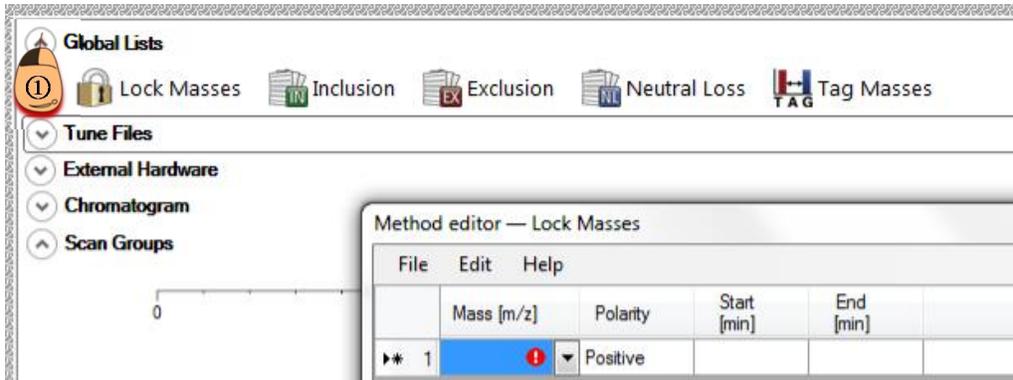
**Lock Masses:** 可输入质量轴监测离子（如 445.120025）或自己加入的内标离子。由于 Orbitrap 质谱的高稳定性，通常不建议使用。

**Inclusion:** 用于 t-SIM、PRM、DIA 等需要输入特定离子列表的场合，细节会在下文中详述。

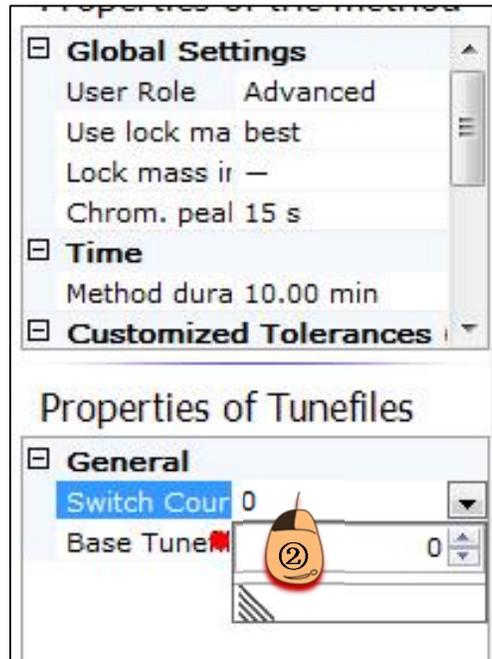
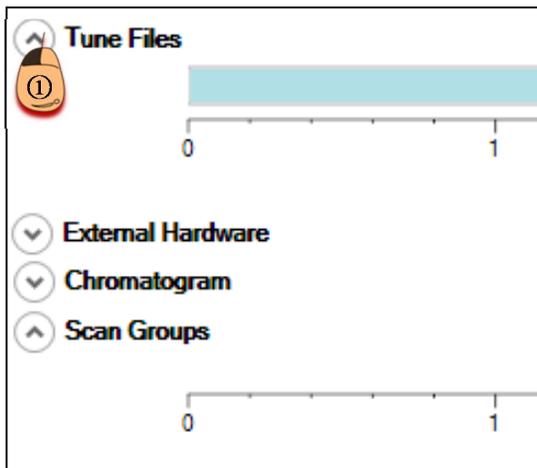
**Exclusion:** 用于永久性排除特定离子，对于常规蛋白质组学实验较少使用。

Neutral Loss: 当 Full Scan 和/或 AIF 全扫描后发现某特定离子出现固定的中性丢失差值, 则进一步触发二级全扫描, 对于常规蛋白质组学实验较少使用。

Tag Mass: 用于成对离子的二级全扫描触发, 对于常规蛋白质组学实验较少使用。



## 1.2 Tune Files



可以使用多个不同的 tune 文件, 在此处设置切换点数目

## Properties of Tunefiles

**General**

Switch Cour 0

Base Tune 

PreselectedTuneFileChooser

单击以调用需要使用的 tune 文件

- Xcalibur
  - methods
  - system\Exactive\Instrument
  - Data
    - han
    - ZX
      - dxjinsulin-ESI-switch.mstune
      - CMC-wine-10-10\METH
      - Trainee2014\proline
      - Lvchen\pesticide-SJ\METH
- TuneFile
  - LT-ESI-switch.mstune
  - LT-APCI-switch.mstune
  - LT-cal.mstune
  - LKZ-ESI-switch.mstune
  - ZL-ESI-switch.mstune
  - ZL-ESI-negative.mstune
  - ZZ-ESI-switch.mstune
  - Asarinin\_ESI heat40C.mstune
  - Asarinin\_ESI heat300C.mstune
  - Asarinin\_APCI.mstune
  - 1126test.mstune
  - 1126 good.mstune
  - WASH.mstune
  - patulin.mstune
  - sophie-141208.mstune
  - ZZ-ESI-Cal.mstune

### 1.3 External Hardware

**Global Lists**

Lock Masses Inclusion Exclusion Neutral Loss TAG Tag Masses

**Tune Files**

**External Hardware**

Divert Valve a

Divert Valve b

Syringe

Contact Closure

**Chromatogram**

**Scan Groups**

此处设置是否使用六通阀、从 1-2/1-6 位置开始、切换点数目

**Properties**

Properties of the method

**Global Settings**

User Role Advanced

Use lock ma best

Lock mass ir —

Chrom. peel 15 s

**Time**

Method dura 10.00 min

**Customized Tolerances**

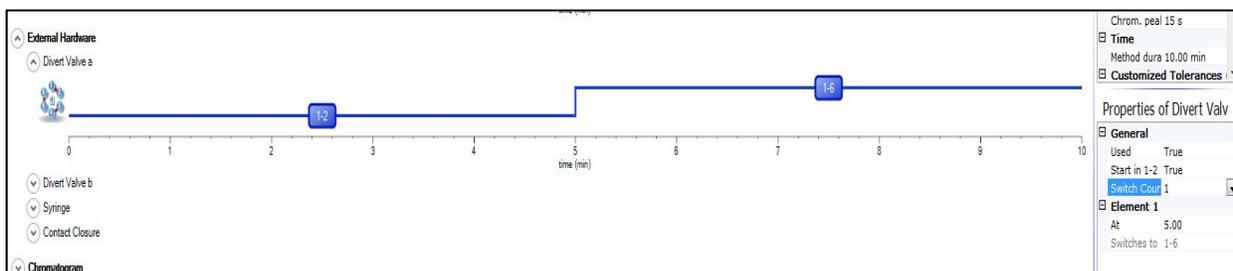
**Properties of Divert Valv**

**General**

Used True

Start in 1-2 True

Switch Cour 0



此处展示了从 1-2 位置开始、5min 时从 1-2 位置切换到 1-6 位置（一个切换点）的参数设置。对于常规蛋白质组学实验，通常无需使用六通阀切换；在使用常规流速液相分析样品时，可通过此处六通阀的设置将不想采集质谱信号的馏分（例如，色谱前几分钟通常会有较多的盐洗出）切换至废液瓶中。

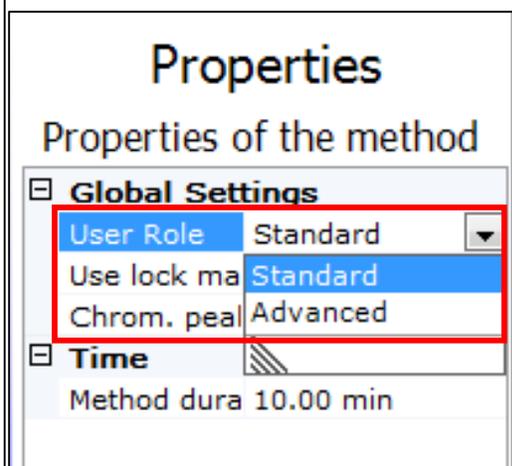
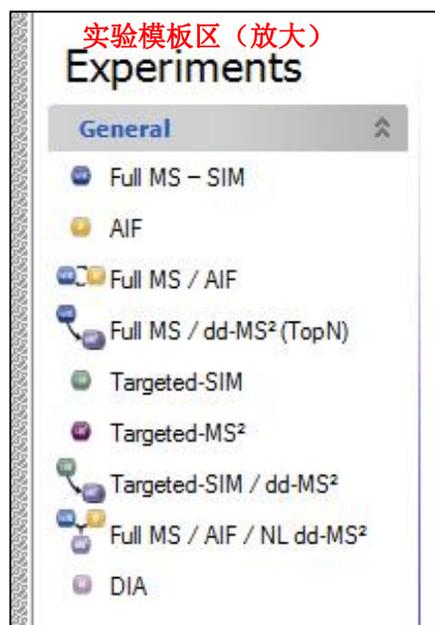
Direct Valve b、Syringe、Contact Closure、一般无需设置。

Chromatogram: 蛋白质组学实验中通常无需设置。

Scan Group: 当实验中同时设置了多个 Scan Event 时，此处会有显示。

### 实验模板区及实验参数区：

建议将 Global Settings 中的 User role 调为 Advanced，可观察到更多参数。



选择“Advanced”

# Experiments

**General**

- Full MS - SIM
- AIF
- Full MS / AIF
- Full MS / dd-MS<sup>2</sup> (TopN)
- Targeted-SIM
- Targeted-MS<sup>2</sup>
- Targeted-SIM / dd-MS<sup>2</sup>
- Full MS / AIF / NL dd-MS<sup>2</sup>
- DIA

在实验模板区选中想用的模板，拖曳至工作区灰色条带指示区后放手即可

## 2、不同上样量蛋白质组鉴定

### 2.1 高浓度样品：

由于样品浓度较高，所以 MS2 的 inject time 可以适当设置短一些，对于 R=17500，TOP20 情况下，MS2 Maximum IT 设为 45ms。

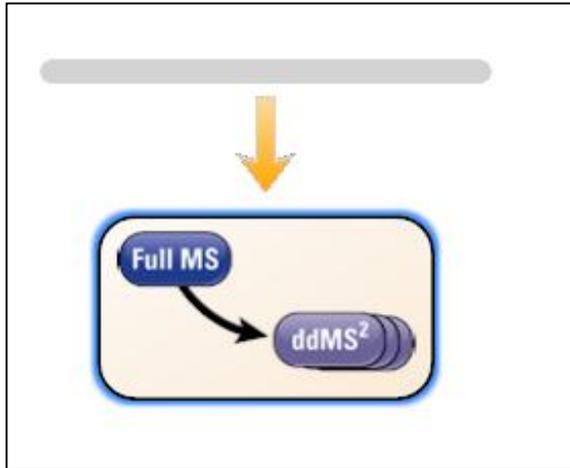
**Properties**

Properties of the method

Global Settings	Advanced
User Role	best
Use lock masses	—
Lock mass injection	—
Chrom. peak width (FWHM)	15 s
Time	10.00 min
Method duration	10.00 min

Properties of Full MS / dd-MS<sup>2</sup> (TopN)

General	
Runtime	0 to 10 min
Polarity	positive
In-source CID	0.0 eV
Default charge state	2
Inclusion	—
Exclusion	—
Tags	—
Full MS	
Microscans	1
Resolution	70,000
AGC target	366
Maximum IT	50 ms
Number of scan ranges	1
Scan range	300 to 2000 m/z
Spectrum data type	Profile
dd-MS <sup>2</sup> / dd-SIM	
Microscans	1
Resolution	17,500
AGC target	145
Maximum IT	45 ms
Loop count	20
MSX count	1
TopN	20
Isolation window	2.0 m/z
Resolution window	0.0 m/z
Fixed first mass	100.0 m/z
NCE / sheppd NICE	30
Spectrum data type	Centroid
dd Settings	
Underfill ratio	1.0 %
Intensity threshold	—
Apex trigger	—
Charge exclusion	unassigned, 7, 8, >9
Peptide match	preferred
Exclude isotopes	on
Dynamic exclusion	30.0 s



选择 Full MS/ddMS<sup>2</sup> (Top N) 模块

# Properties

## Properties of the method

Global Settings	
User Role	Advanced
Use lock masses	best
Lock mass injection	-
Chrom. peak width (FWHM)	15 s

**Time**

Method duration	10.00 min
-----------------	-----------

通常情况下保持默认参数即可，如有疑问请咨询工程师

Method duration 和 Runtime 要保持一致

## Properties of Full MS / dd-MS<sup>2</sup> (TopN)

General	
Runtime	0 to 10 min
Polarity	positive
In-source CID	0.0 eV
Default charge state	2
Inclusion	-
Exclusion	-
Tags	-

**Full MS**

Microscans	1
Resolution	70,000
AGC target	3e6
Maximum IT	50 ms
Number of scan ranges	1
Scan range	300 to 2000 m/z
Spectrum data type	Profile

**dd-MS<sup>2</sup> / dd-SIM**

Microscans	1
Resolution	17,500
AGC target	1e5
Maximum IT	45 ms
Loop count	20
MSX count	1
TopN	20
Isolation window	2.0 m/z
Isolation offset	0.0 m/z
Fixed first mass	100.0 m/z
NCE / stepped NCE	27
Spectrum data type	Centroid

**dd Settings**

Underfill ratio	1.0 %
Intensity threshold	2.2e4
Apex trigger	-
Charge exclusion	unassigned, 1, 7, 8, >8
Peptide match	preferred
Exclude isotopes	on
Dynamic exclusion	30.0 s

肽段分析通常选用正离子模式  
不设置源内裂解能量  
默认电荷态设为 2 (该数值主要与未识别价态的母离子 HCD 碰撞能量和二级扫描范围有关)

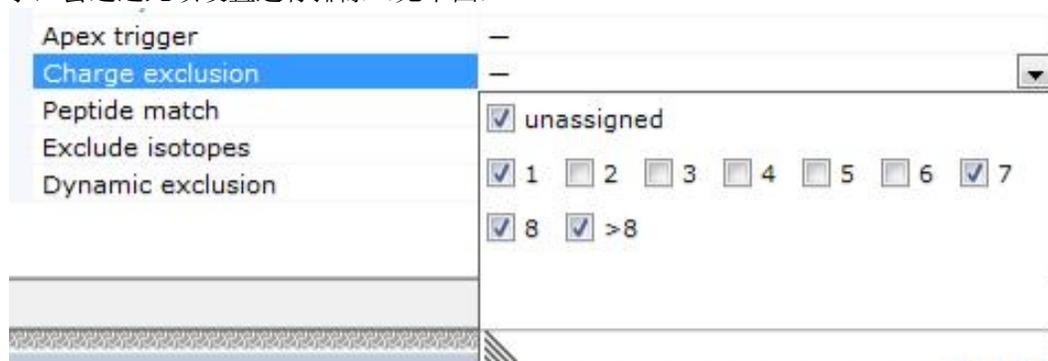
此处为高浓度样品的推荐参数设置

二级谱图开始扫描的范围；通常设为从 100m/z 开始

Underfill ratio 数值和 Dynamic Exclusion 对鉴定结果影响较大，可根据具体实验进行调整，详情可咨询工程师

Loop Count 为每两次 full MS 之间的 MS/MS 的采集次数，MSX count 为每张 MS/MS 谱图中包含几个母离子的碎片信息，故 Loop Count\*MSX Count=Top N 数目。对于蛋白质组学鉴定实验，MSX Count 设为 1 即可，则 Loop Count=Top N 数目。

Charge exclusion: 由于肽段多为+2, +3 价，故对于无法识别价态的离子和+1 价、高于+7 价的离子，会通过此项设置进行排除（见下图）



Intensity threshold 是由 underfill ratio、二级的 AGC target 和 Maximum IT 共同决定的，其本身无法直接设置。其计算公式为  $\text{intensity threshold} = \text{AGC target} * \text{underfill ratio} / \text{Maximum IT(s)}$ 。该参数的意义为，一级谱图中强度高于此阈值的离子才会被选出进行二级碎裂。

dd Settings		
Underfill ratio	1.0 %	Underfill ratio 数值和
Intensity threshold	2.0e4	Dynamic Exclusion 对
Apex trigger	—	鉴定结果影响较大，
Charge exclusion	unassigned, 1, 7, 8, >8	可根据具体实验进行
Peptide match	preferred	调整，详情可咨询工
Exclude isotopes	on	程师
Dynamic exclusion	30.0 s	

Apex trigger: 峰顶触发，蛋白质组学实验中通常不设置此参数。

Peptide match: 该参数有三个选项，preferred、on 和 off（显示为单横线“-”）。“on”表示一定要检测到三个符合肽段分布的特征同位素峰才认为该离子为肽段离子；“preferred”表示最好能检测到三个特征同位素峰，若只检测到两个特征同位素峰也可认为该离子为肽段离子；“off”表示不进行此项检测。通常在蛋白质组学实验中会选择 preferred 或关闭此项。

Exclude isotopes: 蛋白质组学实验中通常选择“on”。

Dynamic exclusion: 动态排除设置，以 30s 为例，意味着某个离子一旦进行了二级碎裂，在接下来的 30s 时间内不会再对该离子进行二级碎裂。通常该参数与色谱峰的宽度有关，推荐设置为色谱的峰宽到二倍峰宽。

## 2.2 低浓度样品:

由于样品浓度较低，所以 MS2 的 Maximum IT 需要适当设置长一些，对于 R=35000，TOP20 情况下，MS2 Maximum IT 设为 110ms；其余各项参数的解释与高浓度样品相同。

**Global Lists**

Lock Masses Exclusion Exclusion Neutral Loss Tag Masses

**Time Files**

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  
time (min)

**External Hardware**

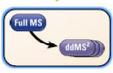
**Chromatogram**

**Scan Groups**

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  
time (min)

**Experiments**

- General
- Full MS - SIM
- AFI
- Full MS / AFI
- Full MS / dd-MS<sup>2</sup> (TopN)
- Targeted SIM
- Targeted-MS<sup>2</sup>
- Targeted SIM / dd-MS<sup>2</sup>
- Full MS / AFI / NL, dd-MS<sup>2</sup>
- DIA



**Properties**

**Properties of the method**

**Global Settings**

User Role	Advanced
Use lock masses	best
Lock mass injection	—
Chrom. peak width (FWHM)	15 s

**Time**

Method duration	10.00 min
-----------------	-----------

**Properties of Full MS / dd-MS<sup>2</sup> (TopN)**

**General**

Runtime	0 to 10 min
Polarity	positive
In-source CID	0.0 eV
Default charge state	2
Inclusion	—
Exclusion	—
Tags	—

**Full MS**

Microscans	1
Resolution	70,000
AGC target	3e6
Maximum IT	50 ms
number of scan ranges	1
Scan range	300 to 2000 m/z
Spectrum data type	Profile

**dd-MS<sup>2</sup> / dd-SIM**

Microscans	1
Resolution	35,000
AGC target	1e5
Maximum IT	110 ms
Loop count	20
MSK count	1
TopN	20
Isolation window	2.0 m/z
Isolation offset	0.0 m/z
Fixed first mass	100.0 m/z
NCE / shopped NCE	27
Spectrum data type	Centroid

**dd Settings**

Underfill ratio	1.0 %
Intensity threshold	3.1e3
Apex trigger	—
Charge exclusion	unassigned, 7, 8, >8
Peptide match	preferred
Exclude isotopes	on
Dynamic exclusion	30.0 s

## Properties

### Properties of the method

<b>Global Settings</b>	
User Role	Advanced
Use lock masses	best
Lock mass injection	—
Chrom. peak width (FWHM)	15 s
<b>Time</b>	
Method duration	10.00 min

### Properties of Full MS / dd-MS<sup>2</sup> (TopN)

<b>General</b>	
Runtime	0 to 10 min
Polarity	positive
In-source CID	0.0 eV
Default charge state	2
Inclusion	—
Exclusion	—
Tags	—
<b>Full MS</b>	
Microscans	1
Resolution	70,000
AGC target	3e6
Maximum IT	50 ms
Number of scan ranges	1
Scan range	300 to 2000 m/z
Spectrum data type	Profile
<b>dd-MS<sup>2</sup> / dd-SIM</b>	
Microscans	1
Resolution	35,000
AGC target	1e5
Maximum IT	110 ms
Loop count	20
MSX count	1
TopN	20
Isolation window	2.0 m/z
Isolation offset	0.0 m/z
Fixed first mass	100.0 m/z
NCE / stepped NCE	27
Spectrum data type	Centroid
<b>dd Settings</b>	
Underfill ratio	1.0 %
Intensity threshold	9.1e3
Apex trigger	—
Charge exclusion	unassigned, 1, 7, 8, >8
Peptide match	preferred
Exclude isotopes	on
Dynamic exclusion	30.0 s

注意此处参数与高浓度样品有较大区别

Underfill ratio 数值和 Dynamic Exclusion 对鉴定结果影响较大，可根据具体实验进行调整，详情可咨询工程师

### 3、TMT 分析方法设置：

对于 TMT 标记的定量蛋白质组学样品，由于需要在二级碎裂时将 TMT 标签从肽段上碎裂下来，故碎裂能量可适当升高，其余参数设置与蛋白质组学鉴定实验相同（见下图）。若使用 TMT-10 Plex 试剂标记，二级分辨率应设为 35000。

## Properties

### Properties of the method

<b>Global Settings</b>	
User Role	Advanced
Use lock masses	best
Lock mass injection	—
Chrom. peak width (FWHM)	15 s
<b>Time</b>	
Method duration	10.00 min

### Properties of Full MS / dd-MS<sup>2</sup> (TopN)

<b>General</b>	
Runtime	0 to 10 min
Polarity	positive
In-source CID	0.0 eV
Default charge state	2
Inclusion	—
Exclusion	—
Tags	—
<b>Full MS</b>	
Microscans	1
Resolution	70,000
AGC target	3e6
Maximum IT	50 ms
Number of scan ranges	1
Scan range	300 to 2000 m/z
Spectrum data type	Profile
<b>dd-MS<sup>2</sup> / dd-SIM</b>	
Microscans	1
Resolution	35,000
AGC target	1e5
Maximum IT	110 ms
Loop count	20
MSX count	1
TopN	20
Isolation window	2.0 m/z
Isolation offset	0.0 m/z
Fixed first mass	100.0 m/z
NCE / stepped NCE	30
Spectrum data type	Centroid
<b>dd Settings</b>	
Underfill ratio	1.0 %
Intensity threshold	9.1e3
Apex trigger	—
Charge exclusion	unassigned, 1, 7, 8, >8
Peptide match	preferred
Exclude isotopes	on
Dynamic exclusion	30.0 s

此处 AGC 与 IT 的设置与样品浓度有关，可参考前面章节

碎裂能量需适当升高

Underfill ratio 数值和 Dynamic Exclusion 对鉴定结果影响较大，可根据具体实验进行调整，详情可咨询工程师

#### 4、target SIM 方法设置：

对于 target SIM (t-SIM) 实验，需要注意待测离子列表是在 Global lists-Inclusion list 中设置。

Global Lists  
 Lock Masses Inclusion Exclusion Neutral Loss Tag Masses

Tune Files

External Hardware

Chromatogram

Scan Groups  
 Targeted-SIM

Experiments

General

- Full MS - SIM
- AIF
- Full MS / AIF
- Full MS / dd-MS² (TopN)
- Targeted-SIM
- Targeted-MS²
- Targeted-SIM
- Full MS / AIF / NL-dd-MS²
- DIA

Global Lists  
 Lock Masses Inclusion Exclusion Neutral Loss Tag Masses

Tune Files

External Hardware

Chromatogram

Scan Groups  
 Targeted-SIM

Experiments

General

- Full MS - SIM
- AIF
- Full MS / AIF
- Full MS / dd-MS² (TopN)
- Targeted-SIM
- Targeted-MS²
- Targeted-SIM / dd-MS²
- Full MS / AIF / NL-dd-MS²
- DIA

Method editor — Inclusion List

File	Edit	Help	Mass [m/z]	Formula [M]	Species	CS [s]	Polarity	Start [min]	End [min]	NCE	Comment
1							Positive				

在 inclusion list 中输入待测离子的 m/z、电荷数、极性、洗脱时间和碎裂能量（此处碎裂能量优先级高于 t-SIM 模块中设置的碎裂能量），设置完毕后单击“Done”完成设置；也可直接导入其他软件（Skyline、Pinpoint 等）生成的 CSV 格式的离子列表。

Properties	
Properties of the method	
<input type="checkbox"/> <b>Global Settings</b>	
User Role	Advanced
Use lock masses	best
Lock mass injection	-
Chrom. peak width (FWHM)	15 s
<input type="checkbox"/> <b>Time</b>	
Method duration	10.00 min
Properties of Targeted-SIM	
<input type="checkbox"/> <b>General</b>	
Runtime	0 to 10 min
Polarity	positive
In-source CID	0.0 eV
Inclusion	on
<input type="checkbox"/> <b>SIM</b>	
Microscans	1
Resolution	70,000
AGC target	5e4
Maximum IT	200 ms
MSX count	1
Isolation window	4.0 m/z
Isolation offset	0.0 m/z
Spectrum data type	Profile

此处参数设置需详细阅读正文中内容后根据实验具体情况优化，不可简单照搬图中参数！

由于 target SIM 实验的参数设置与基质复杂程度、同时定量肽段数目密切相关，具体方法的优化请咨询工程师，以下几条原则供参考：

基质越复杂，在满足色谱点数足够的情况下，尽量选择较高的分辨率；

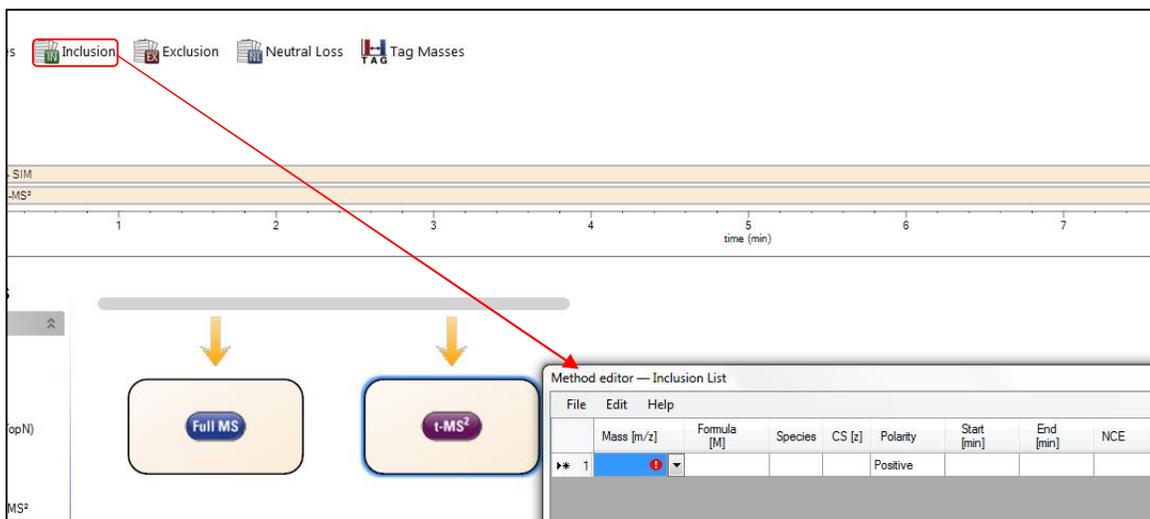
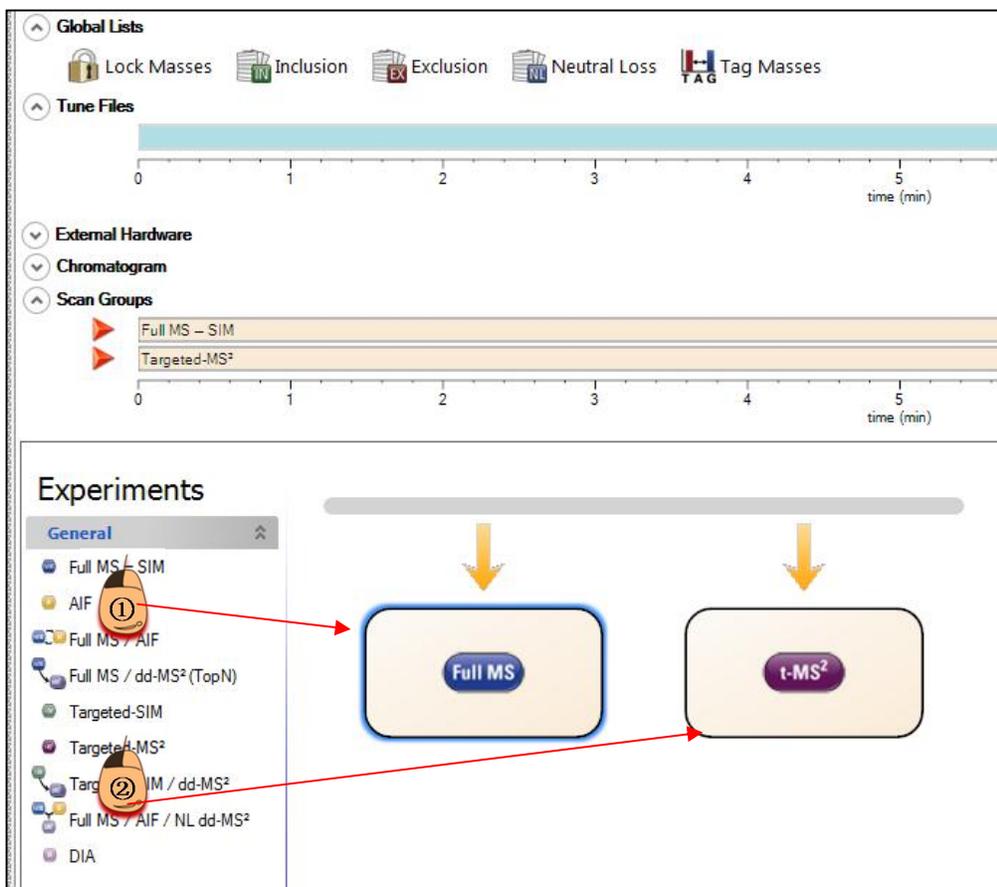
可以根据样品中肽段的洗脱时间，分别对每个肽段设置采集时间；

Isolation window 一般设置为 4.0 m/z 即可。

## 5、PRM 方法设置

对于 PRM 实验，同样需要在 inclusion list 中输入待测离子列表，输入方法与上文 t-SIM 实验相同；需要注意的是，当在 inclusion list 中输入多个离子时，要调用相应数量的 t-MS2 模块。例如，当 inclusion list 中有 5 个离子时，需拖曳一个 full MS 模块和五个 t-MS2 模块，按顺序排列即可。

实验时还需根据色谱峰宽确定最多可设置几个 t-MS2。对于 Q Exactive 和 Q Exactive Plus，当 R=17500 时，其采集一张谱图的 Transient time=64ms，分辨率每增高一倍，相应的 Transient time 也增加一倍；再加上采集每张谱图时的 Inject time，由此可推算出对于一定宽度的色谱峰，最多可采集几个 t-MS2 的数据。对于 Q Exactive HF，当 R=15000 时，Transient time=32ms。



\*注：在 tune2.4 之前，没有专门的 PRM 模块，需要使用“target MS2”模块来实现 PRM 实验。

由于 PRM 方法的参数设置与基质复杂程度、同时定量肽段数目等密切相关，具体方法的优化请咨询工程师。

## 6、Classic DIA 方法设置

在 Q Exactive 上进行 classic DIA 方法设置时，首先要在 Full MS 模块中设定一级的扫描范围，此处以  $m/z=400\sim 900$  为例进行示范。

The screenshot shows the 'Experiments' window with a list of modules on the left. The 'Full MS' module is selected and highlighted with a red circle and a '1' icon. A red arrow points from this icon to the 'Full MS' module in the main workflow area. Another red arrow points from the 'DIA' module in the workflow area to the 'Properties of Full MS' dialog box. The dialog box shows the following settings:

Properties of Full MS —	
<b>General</b>	
Runtime	0 to 10 min
Polarity	positive
<b>Full MS — SIM</b>	
Resolution	17,500
AGC target	1e6
Maximum IT	50 ms
Scan range	400 to 900 m/z

单击 DIA 模块设置其参数

# Properties

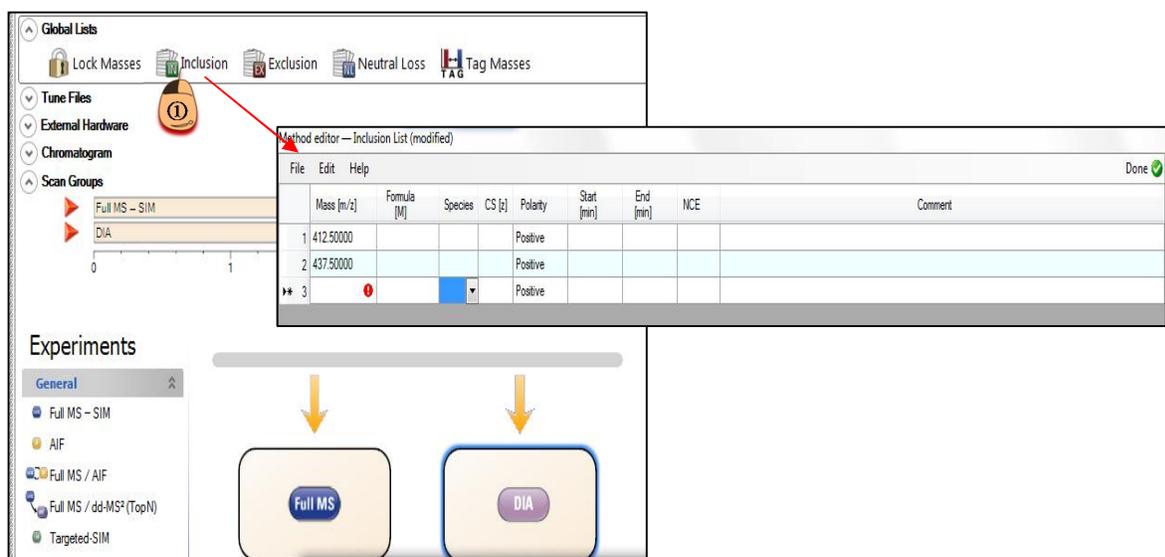
## Properties of the method

<input type="checkbox"/> <b>Global Settings</b>	
User Role	Advanced
Use lock masses	best
Lock mass injection	—
Chrom. peak width (FWHM)	15 s
<input type="checkbox"/> <b>Time</b>	
Method duration	10.00 min
<input type="checkbox"/> <b>Customized Tolerances (+/-)</b>	

## Properties of DIA

<input type="checkbox"/> <b>General</b>	
Runtime	0 to 10 min
Polarity	positive
In-source CID	0.0 eV
Default charge state	2
<input type="checkbox"/> <b>DIA</b>	
Microscans	1
Resolution	35,000 分辨率可设为 17500 或 35000
AGC target	1e6
Maximum IT	auto
Loop count	20
MSX count	1
MSX isochronous ITs	on
Isolation window	26.0 m/z
Isolation offset	0.0 m/z
Fixed first mass	100.0 m/z
NCE / stepped NCE	27
Spectrum data type	Profile

在对 DIA 模块进行设置时，Maximum IT 设置为“auto”，软件会自动计算 inject time；isolation window 设为 DIA 每个窗口的宽度，窗口宽度建议比实际步长多 1 Da，以提高边缘离子的选择效率，例如步长为 25 Da 的 DIA 方法，窗口应设 26 Da。Loop count 数值与 Inclusion list 中 target 数量保持一致。



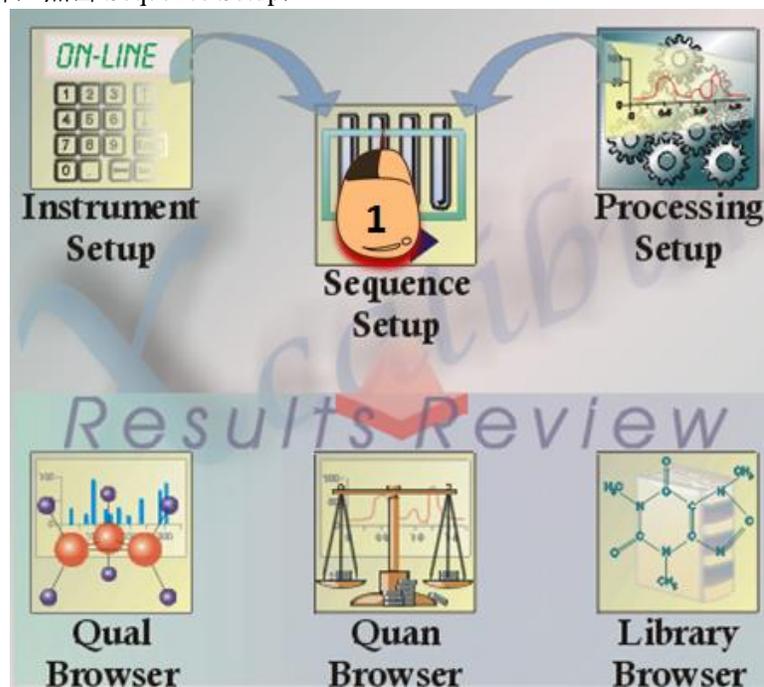
接下来还需要在 inclusion list 中对每个窗口的中值进行进一步设置。以  $m/z=400-900$ ，每个窗口宽度  $25\text{Da}$  为例，第一个窗口的中值为  $400+(25/2)=412.5\text{Da}$ ，第二个窗口为  $437.5\text{Da}$ ，以此类推，最后一个窗口为  $887.5\text{Da}$ ，直至所有窗口的中值均设置完毕，之后单击“Done”保存设置。

## 7、其他

Q Exactive 可以实现的扫描方法还有很多，可以根据每个模块的功能编辑扫描功能，或参考方法模板中预设的采集方法，详细信息请参考 Manual 或咨询工程师。

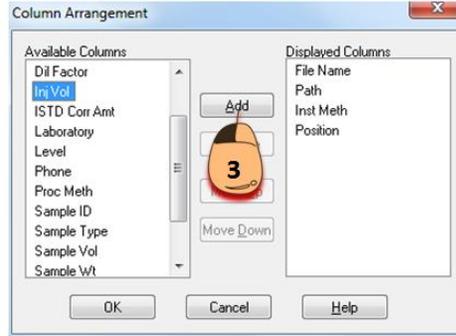
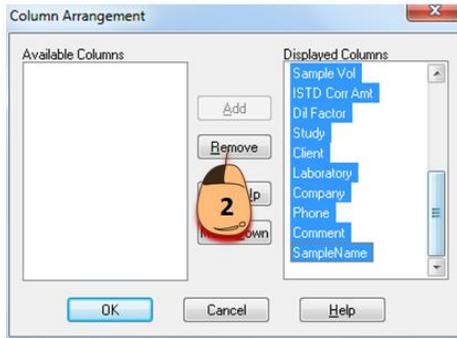
## 第三部分 Sequence 编辑

打开 Xcalibur 软件，点击 Sequence Setup，



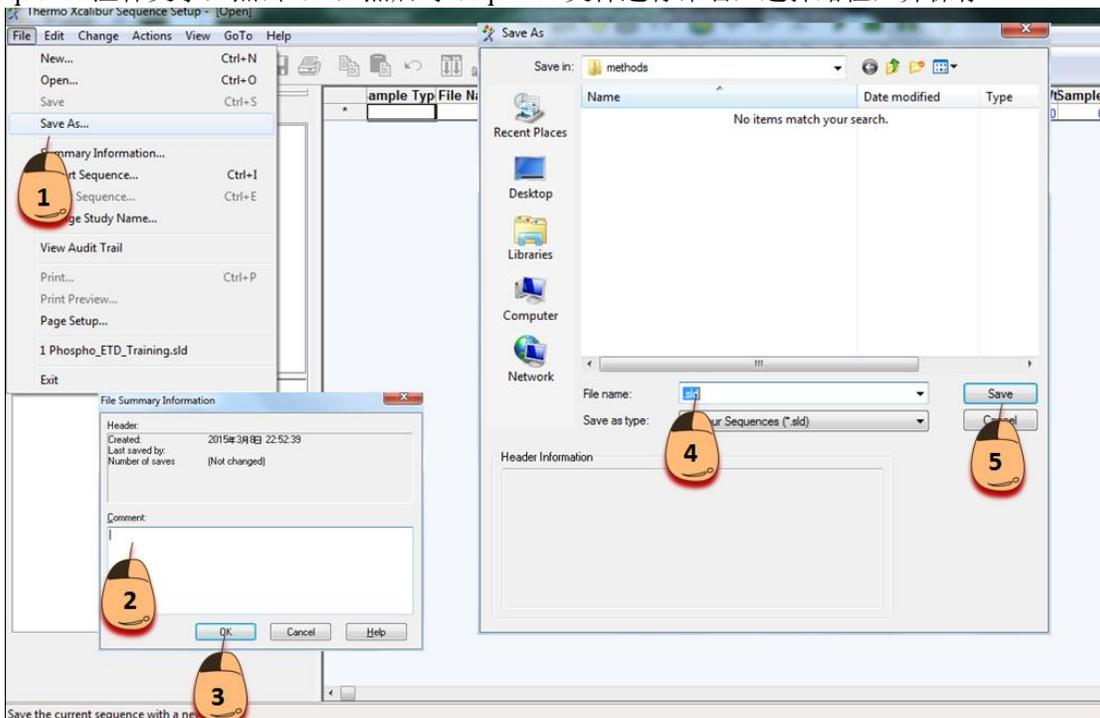
此时 Sequence 编辑界面会自动弹出，点击 Column Arrangement，选中所有 Displayed Columns，点击 Remove，选中 Sample Type，File Name，Path，Inst Meth，Position，点击 Add。其中 Sample Type 是指样本类型，File Name 对数据进行命名，Path 原始数据保存路径，Inst Meth 数据采集方法，

Position 样本在液相中的位置。

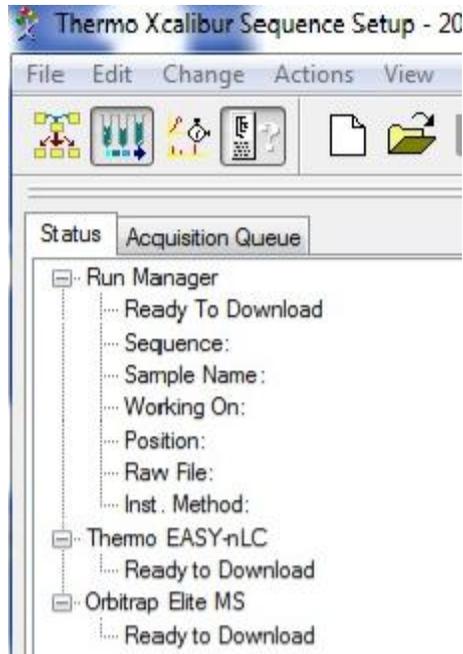


Sample Typ	File Name	Path	Inst Meth	Position	Inj Vol
1	Unknown wash_01	D:\data\HAN\20150303	D:\data\HAN\20150303\CID_Top10_20min	F1	2.0
2	Unknown HeLa_HCD_100ng_60min_02	D:\data\HAN\20150303	D:\data\HAN\20150303\HCD_Top10_60min	F2	2.0
3	Unknown HeLa_CID_100ng_60min_03	D:\data\HAN\20150303	D:\data\HAN\20150303\CID_Top20_60min	F2	2.0
*					0.0

按照实验目的编辑好 Sequence，点击 Save As...，Comment 对话框会自动跳出，可在对话框中输入 Sequence 注释文字，点击 OK，然后对 Sequence 文件进行命名，选择路径，并保存。



当 Xcalibur 软件左侧对话框显示液相与质谱均为 Ready to Download 时，表示可以提交序列，进行数据采集。



将鼠标点至 Sequence 中任意一行或者选中连续的多行，如下图所示，选择第一行，点击 Run Sample，Run Sequence 界面自动弹出，点击 Change Instruments，Change Instruments In Use 界面自动弹出，确保液相与质谱 In Use 均为 Yes，同时液相 Start Instruments 显示为 Yes（一般情况下，该参数不会自动修改，通常只需第一次检测样本时关注一下即可），点击 Change Instruments In Use 界面 OK，After Sequence Set System，如若样本检测完毕后长时间内不再检测样本，可将系统设定为 Standby，则样本检测完毕后，仪器自动跳转到暂停状态，如果设定为 On，则样本检测完毕后，仪器继续检测，点击 Run Sequence 界面 OK，此时序列顺利提交，仪器开始检测。

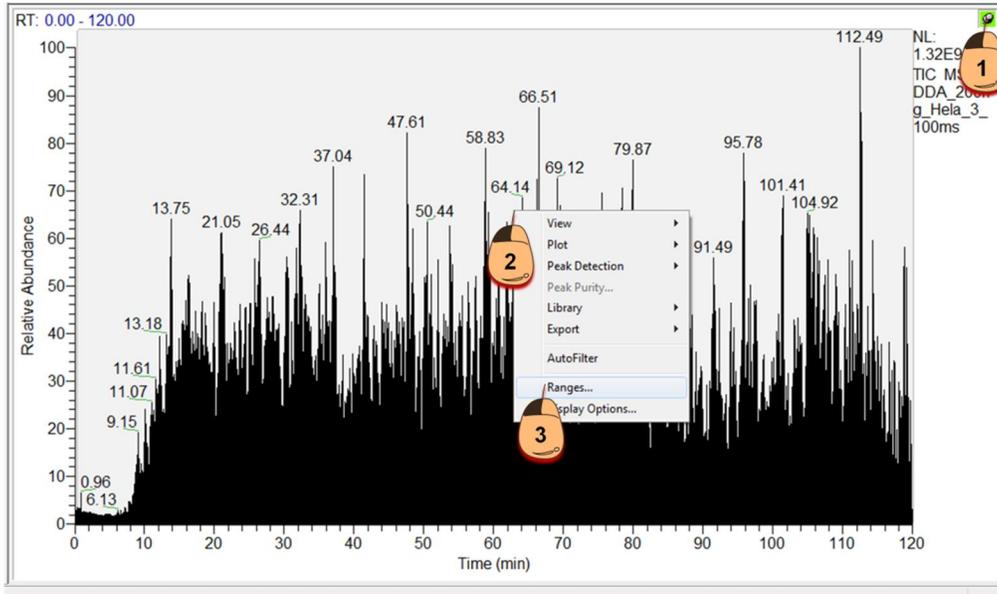


#### 第四部分 数据查看与数据质量判断

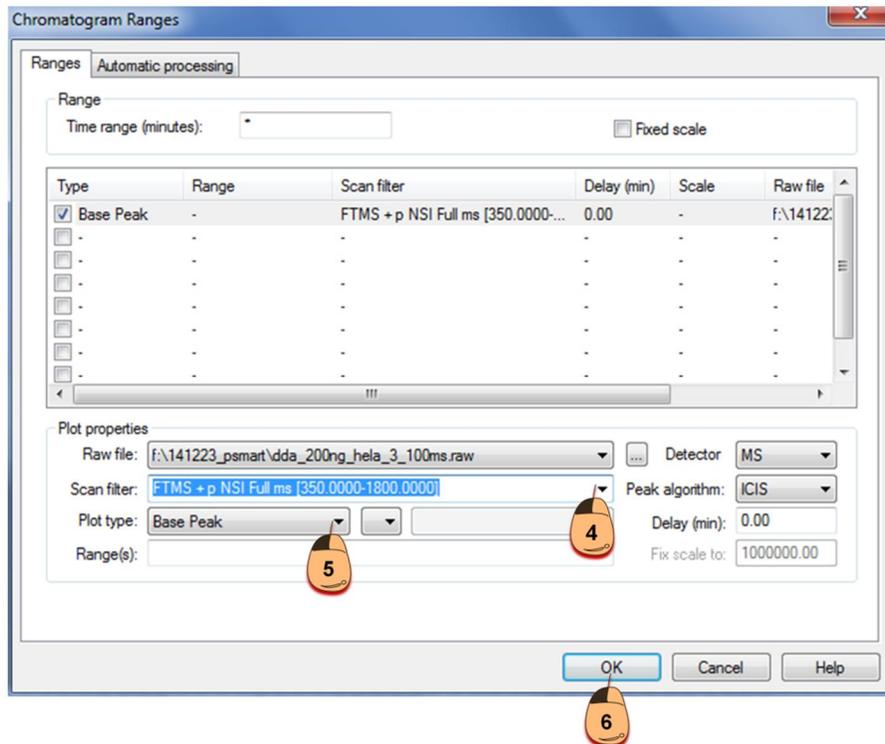
采集数据完成后，可以进一步通过检查原始数据，判断数据的质量、方法的效果和仪器的状态。

## 1、一级色谱图

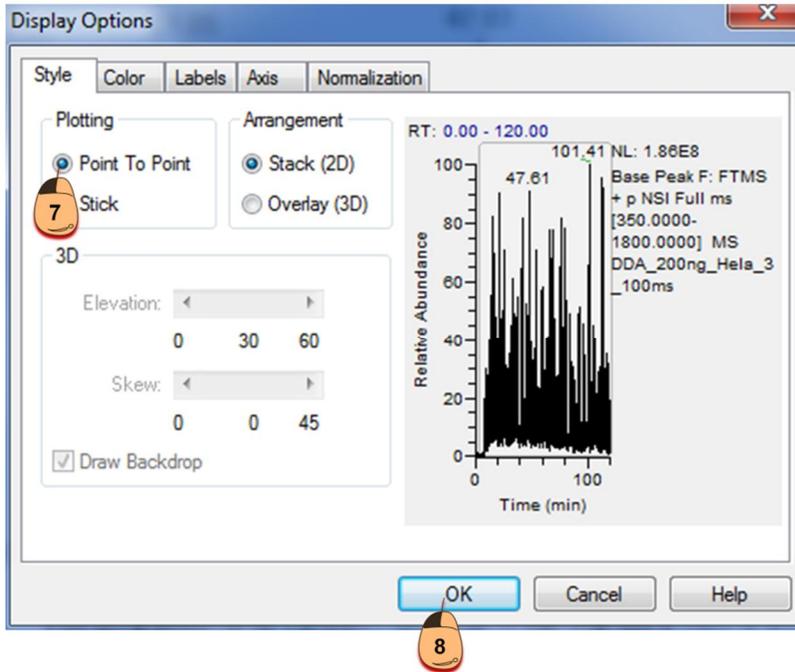
双击打开原始数据 Raw 文件，激活色谱图窗口（下图 1），并在窗口中点右键（下图 2），打开 Ranges（下图 3）。



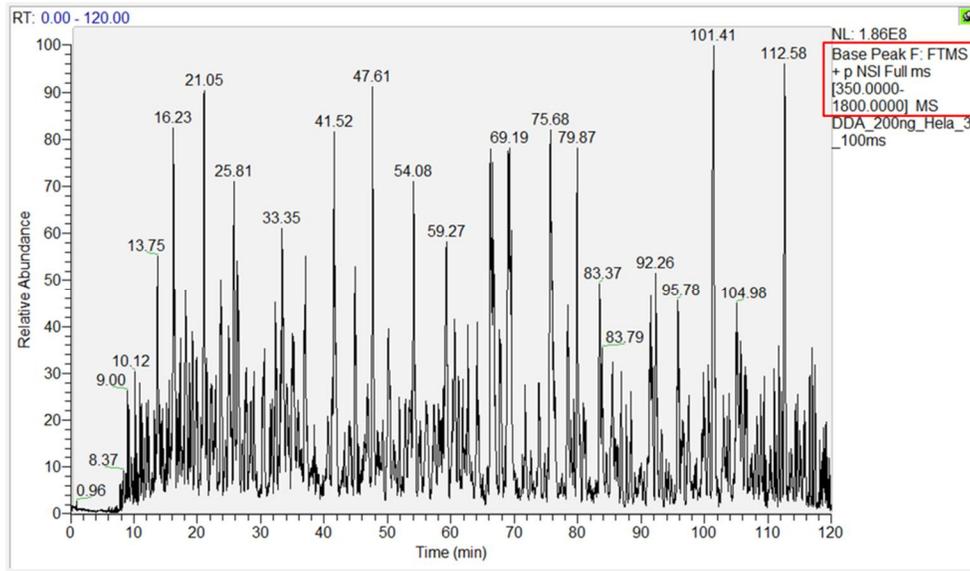
打开 Ranges 对话框后，Scan Filter 下拉菜单中选择一级扫描(Full ms)（下图 4），Plot Type 下拉菜单中选择基峰图(Base Peak)（下图 5）并点击 OK。



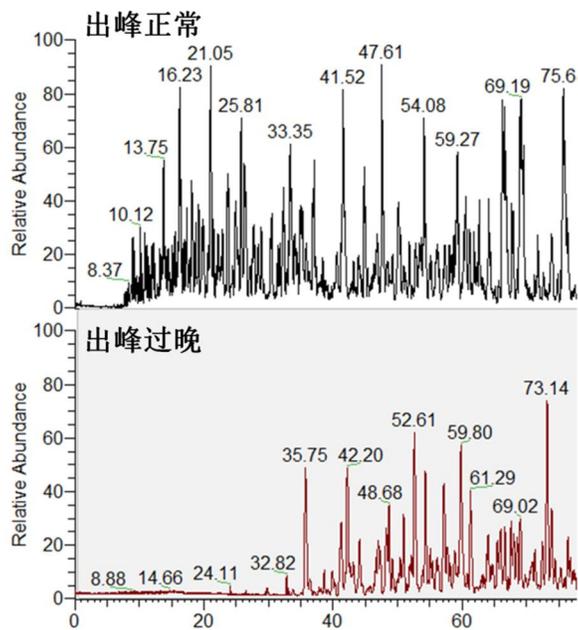
再于色谱图右键打开 Display Options，在 Plotting 中选择 Point To Point 并点击 OK。



设置完成后，色谱图窗口显示一级质谱的 Base Peak 图，下图为典型的蛋白质组数据一级 Base Peak 图，通过该图可以判断喷雾、梯度、色谱、样本等状态。

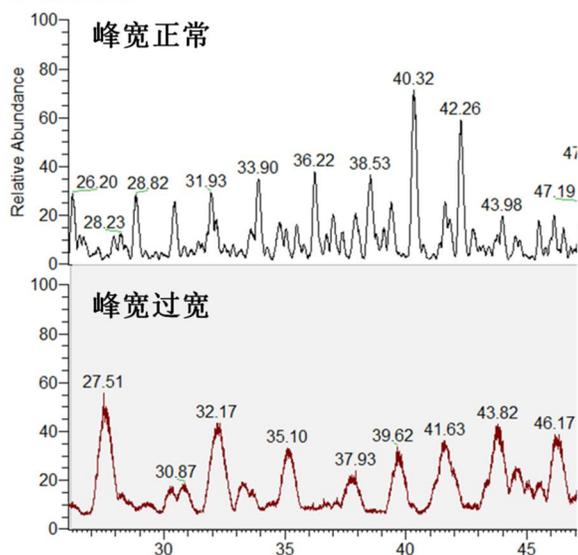


(1) 色谱出峰时间：纳流液相一般应在 10 分钟以内出峰。如出峰过晚，并排除梯度设置、柱长、柱子新旧等正常因素的影响，则提示系统死体积过大，考虑由于管路过长、内径过宽或管路、柱子、喷针的连接出现问题造成的。

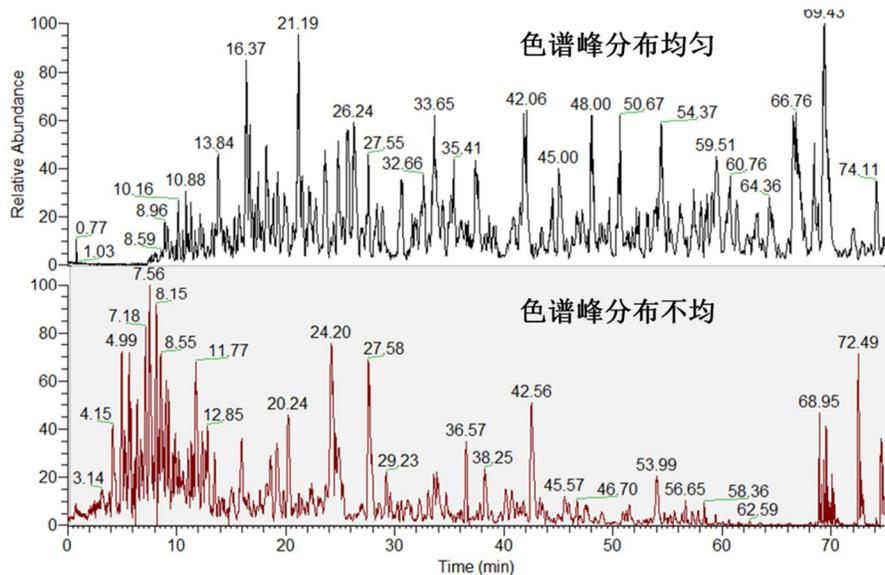


(2) 色谱峰宽：纳流液相色谱峰宽普遍在 30~60 秒，这与梯度、柱子、上样量密切相关。但是在同等条件下，色谱峰出现普遍过宽的现象，则提示预柱/色谱柱柱效存在问题，或柱后死体积过大。

RT: 26.03 - 57.46



(3) 色谱峰分布是否均匀：从色谱出峰开始，一直到数据采集完成，期间色谱峰应当分布均匀，如果色谱峰过度集中于某段时间，则提示有效梯度过短或流动相比例不合适，应当重新优化梯度。

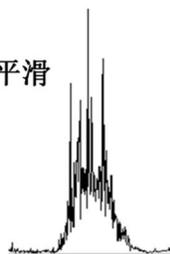


(4) 色谱峰是否平滑：放大色谱峰，观察色谱峰是否平滑，如果不够平滑，有较多毛刺，响应忽高忽低，甚至出现中断，则提示喷雾不稳定、喷雾中断，或样本过脏。

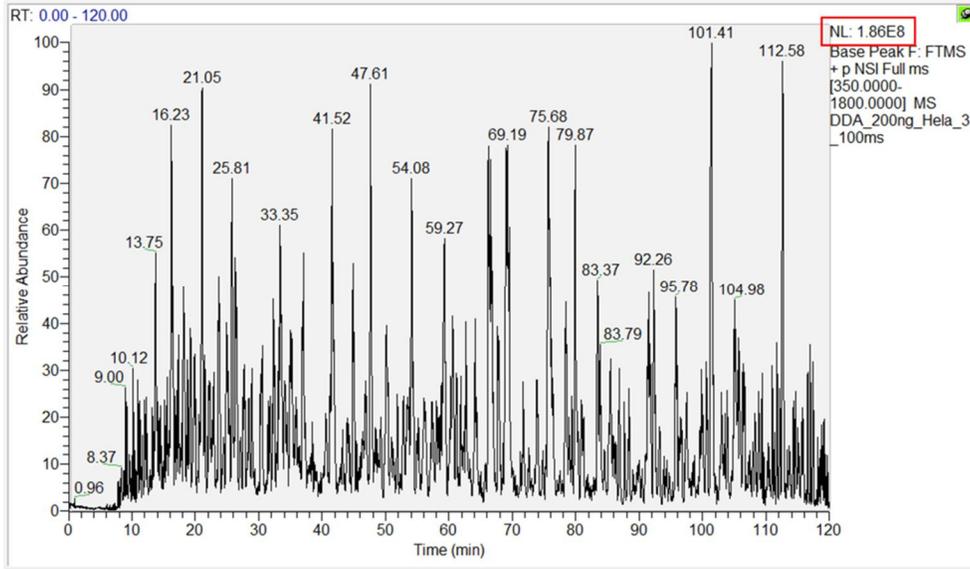
色谱峰平滑



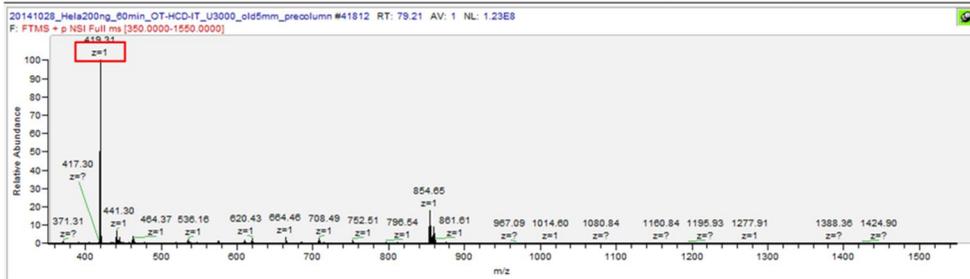
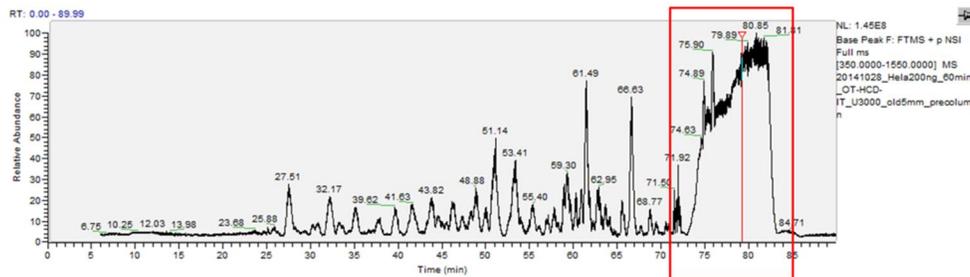
色谱峰不平滑



(5) 色谱图强度(NL 值)：色谱峰强度跟上样量、样本浓度密切相关，通常在 E8~E9，强度过低应检查整个色谱管路、柱子、喷针，同时考虑样本本身问题。

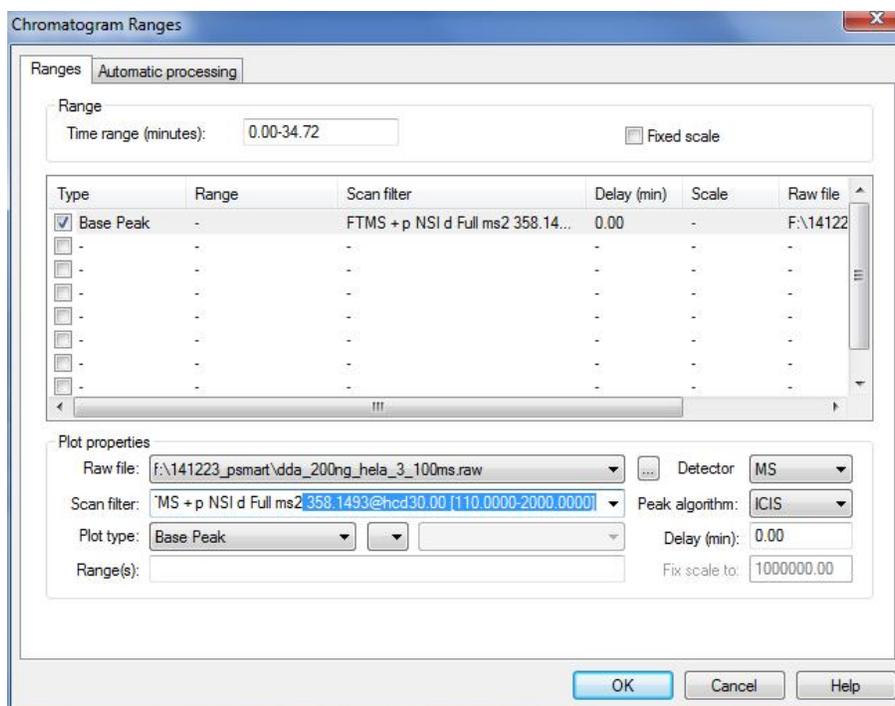


(6) 高有机相杂峰：如果在梯度的尾部，即高有机相的部分出现明显杂峰，特别是 1+ 的小分子峰，且强度较高，则提示色谱柱或样本污染。

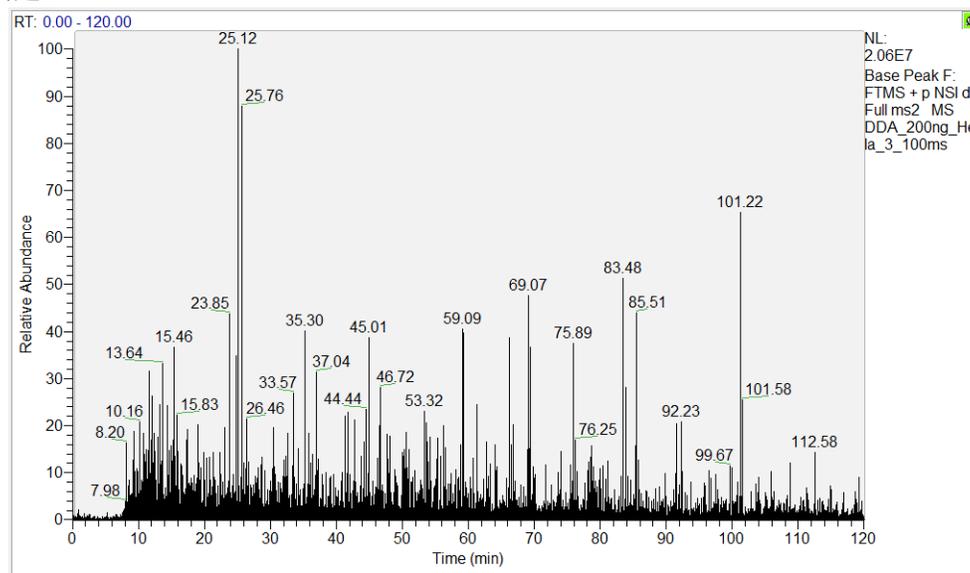


## 2、二级质谱图

在 Ranges-Scan Filter 下拉菜单中选择任意二级扫描，并将 Full ms2 后面的内容删除，Display Options-Plotting 中选择 Stick，其他步骤不变，即可在色谱图窗口显示二级质谱的 Base Peak 图。

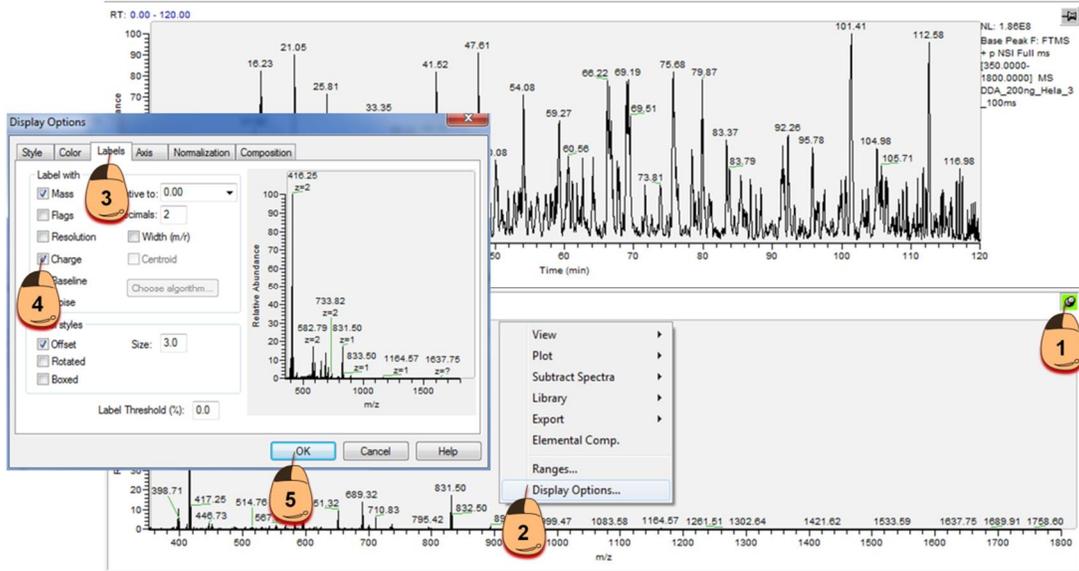


下图为典型的蛋白质组数据二级 Base Peak 图。二级色谱峰强度同样跟上样量、样本浓度密切相关，通常 Orbitrap 检测在 E6~E7，强度过低应考虑 AGC、Maximum Injection Time 设置过低，或样本本身存在问题。

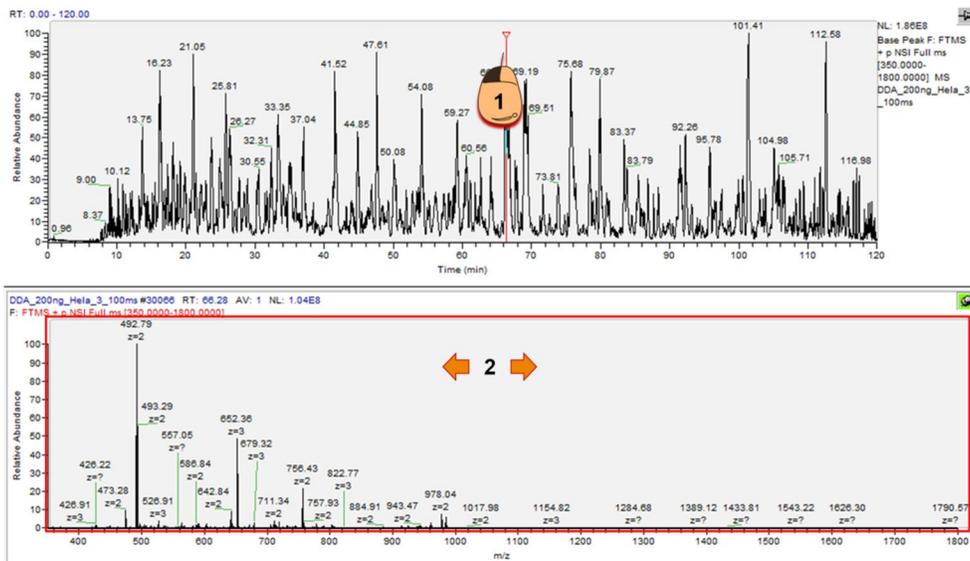


### 3、一级质谱图

在上述一级色谱图模式下激活质谱图窗口，并在 Display Options-Labels 中选择 Charge，在质谱图中将电荷数信息显示出来。

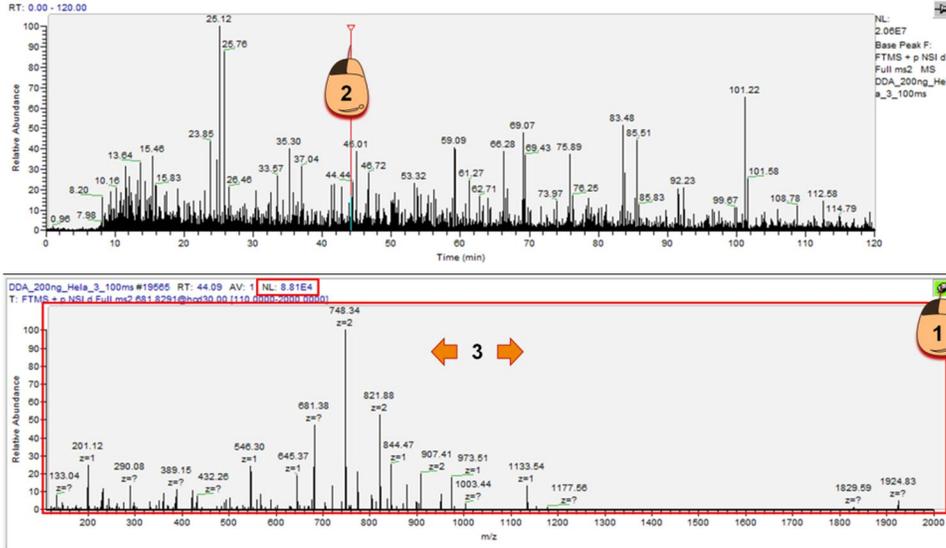


在色谱图中点击中某一位置，并按键盘左右键前后切换质谱图，观察一级质谱峰响应及电荷数(z)。通常蛋白质组数据，质谱峰应 $\geq 2+$ ，若有较多的 $1+$ 或者未知价态的峰，应考虑样本受到污染。



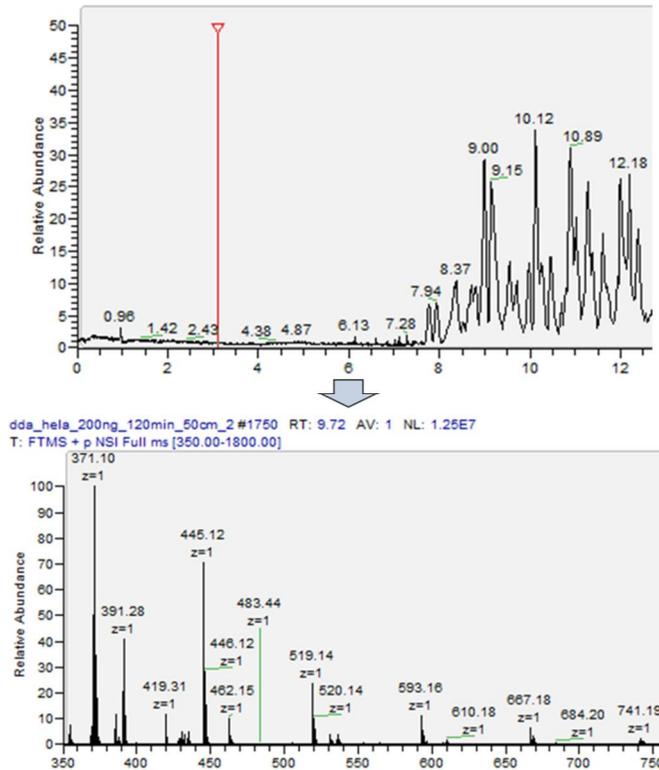
#### 4、二级质谱图

在上述二级色谱图模式下激活质谱图窗口，在色谱图中点击中某一位置，并按键盘左右键前后切换质谱图，观察二级质谱图响应及碎片分布。二级质谱图 NL 值应普遍在 E4~E5 数量级，并且碎片分布均匀。若有大量谱图低于 E4，并且碎片信噪比差，应排查样本、参数设置、色谱系统问题。



## 5、背景响应

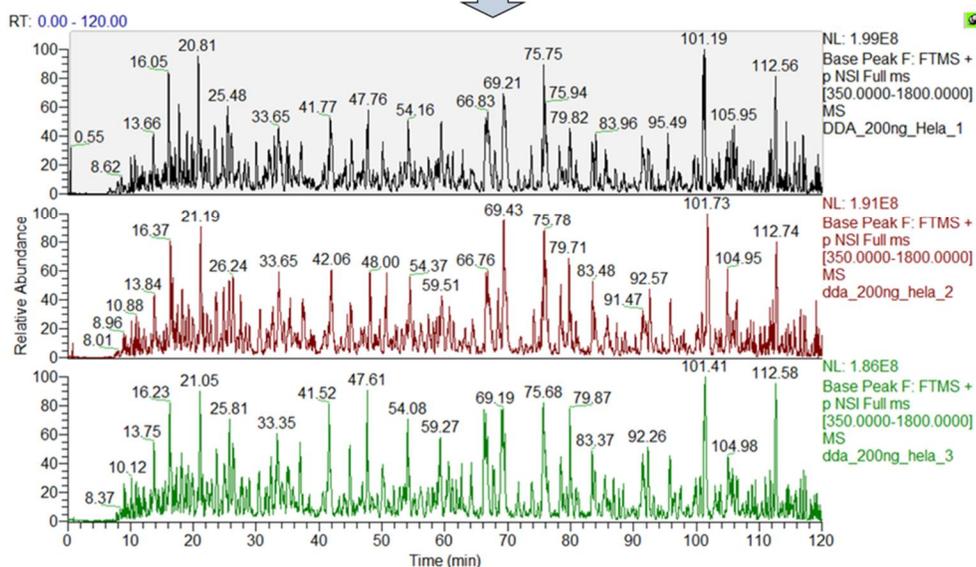
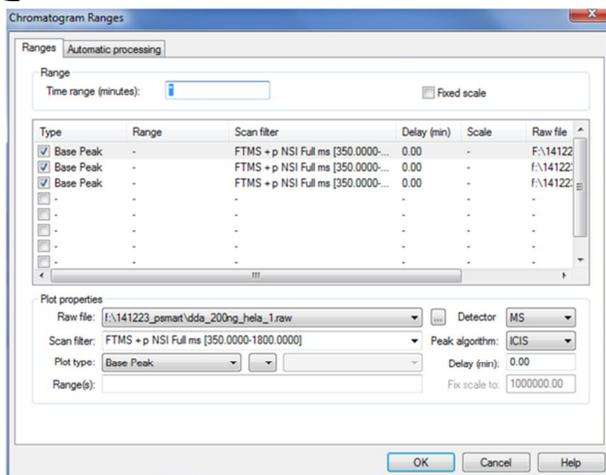
在上述一级色谱图模式下激活质谱图窗口，并点击出峰之前的位置，观察背景离子响应。典型的背景离子谱图如下图所示，正常情况下，NL 值应 $>5E5$ ，出现  $m/z$  445、 $m/z$  391 等一系列背景离子质谱峰，与理论质量偏差 $<3$  ppm，无响应中断的情况出现。如看不到典型的背景离子峰应考虑系统漏液或喷雾存在问题，如其他信号过强考虑色谱柱污染或样本残留。



## 6、其他状态检查

(1) 重现性：在 Ranges 中，将几次重复实验数据的一级色谱图同时打开，观察 Base Peak 响应的差

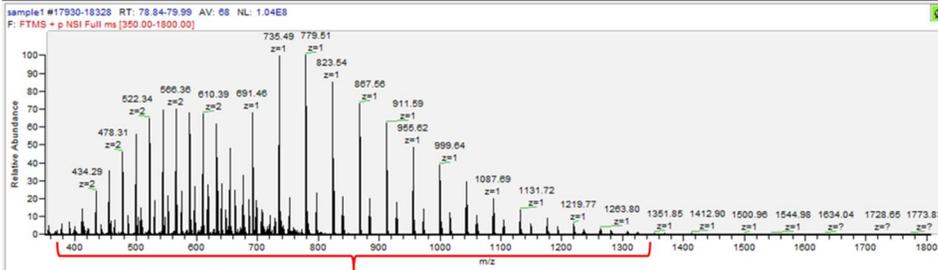
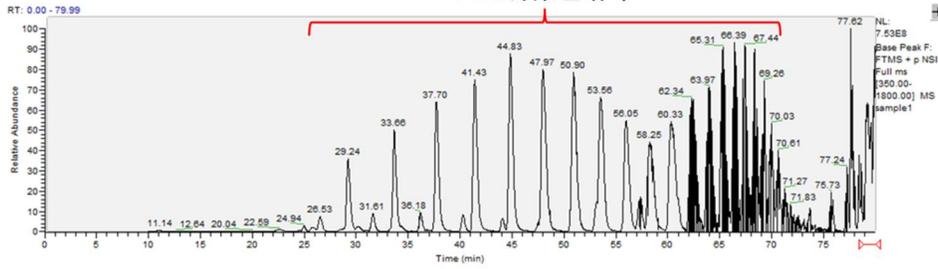
异和保留时间的偏移情况。正常情况下重复之间 Base Peak 和保留时间的偏差较小，如果 Base Peak 响应的 RSD 值>20%，或保留时间偏移 1 分钟以上，可能是上样量出现偏差，色谱柱柱效出现问题，或色谱、质谱稳定性存在问题。



## (2) 常见污染:

聚合物污染：最常见的是聚乙二醇 PEG，质谱图呈间隔 44 Da 的簇峰（见下图），PEG 污染常由前处理引入，来源于不合格的塑料薄膜手套、离心管、枪头等。

### PEG污染色谱峰



典型的PEG污染  $\Delta M=44$  Da

小分子污染：色谱/质谱图中明显的1+峰即为小分子污染，通常由前处理引入。

