



完整质量分析

Biologics Explorer 2.0 快速指南

由 Genedata Expressionist® 提供技术支持



完整质量分析：Biologics Explorer 快速指南

本指南包含的内容

A 部分：软件和工作流程：

- 1) 应用概述
- 2) Biologics Explorer 使用方法
- 3) 完整工作流程的一般指南
- 4) 特定的完整工作流程的指南：
 - 自动去卷积（使用 MS 或 MS 和 UV 数据）
 - 时间分辨去卷积 (TRD)（使用 MS 或 MS 和 UV 数据）
 - 完整质量筛选
 - 审核存储的结果

完整质量分析：Biologics Explorer 快速指南

本指南包含的内容

B 部分：特定应用的优化设置

- 变性完整蛋白
- 天然的完整蛋白
- 抗体药物共轭物
- 亚基分析
- 碎片分析
- 可比性测试或稀释系列
- 压力测试

A 部分

软件和工作流程

1. 应用概述



完整质量工作流程的应用概述

- 这些工作流程主要设计用于单个样本分析：
 - 完整质量确认
 - 糖基化模式分析
 - 转译后修饰 (PTM) 表征
 - 药物抗体比 (DAR) 计算
- 如果不同样本的色谱一致，也可以进行批量分析：
 - 筛选多个样本（过程开发、仪器方法开发）
 - 批次间的可比性研究
 - 新药与生物仿制药的可比性研究
 - 压力测试
- 可进行分析的分子类型包括：
 - 全蛋白（天然或变性）
 - 蛋白亚基/碎片
 - 多体蛋白
 - 蛋白混合物
 - 药物共轭物

A 部分

软件和工作流程

2. BIOLOGICS EXPLORER 使用方法



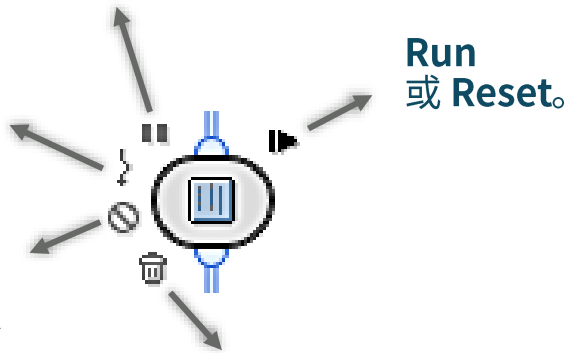
Biologics Explorer 使用方法

活动节点图标

Pause: 暂停此处的工作流程。
所有后续任务会保持活动状态。

Bypass: 运行该工作流程
时跳过此任务。

Block: 停止该工作流程。
该任务和所有后续任务将变得不可用（灰色）。



**Run
或 Reset.**

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

Biologics Explorer 使用方法

工作流程图标

工作流程已完成

所有活动节点都已成功完成。

工作流程已暂停

有些活动节点已成功完成，但有些还尚未开始。

工作流程已就绪

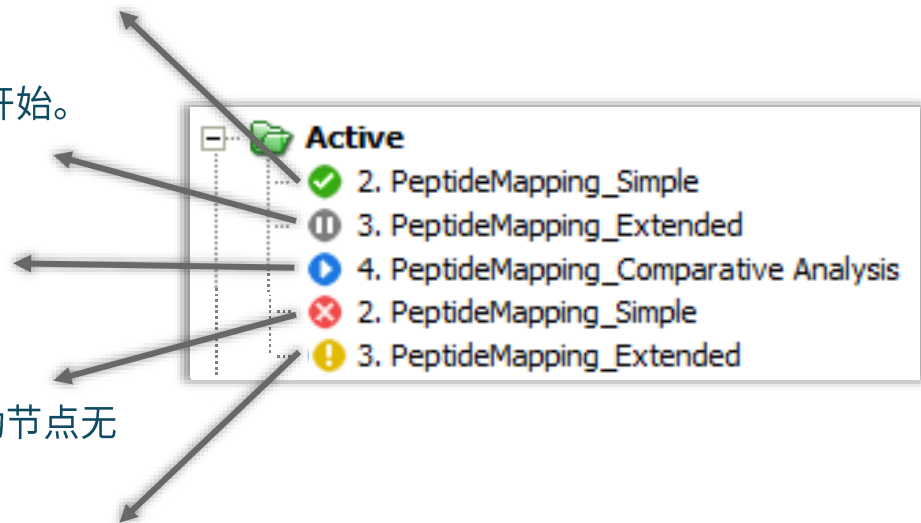
尚未完成任何活动节点。该工作流程已准备就绪。

工作流程错误

某些活动节点已成功完成，但至少还有一个活动节点无法运行。

工作流程警告

某些活动节点未完成。

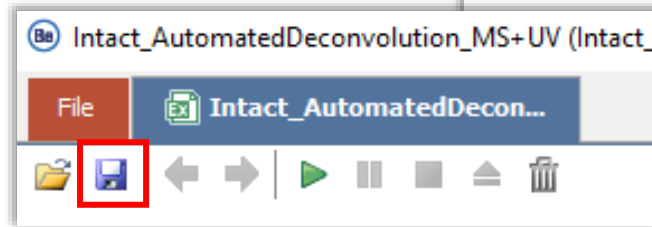
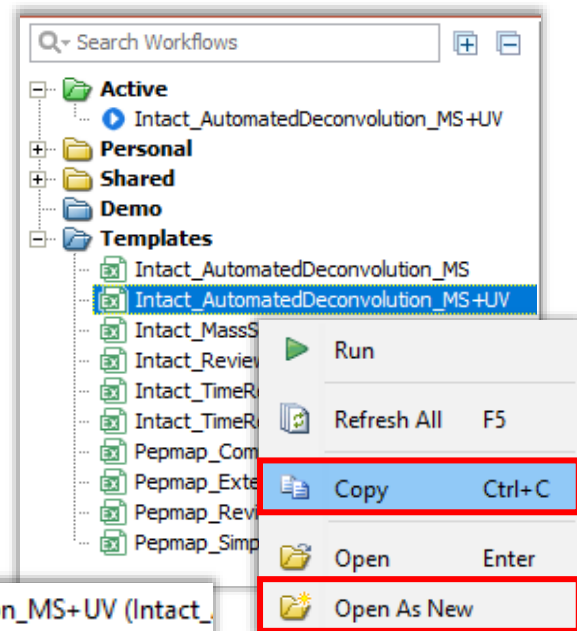


Biologics Explorer 使用方法

启动和保存工作流程

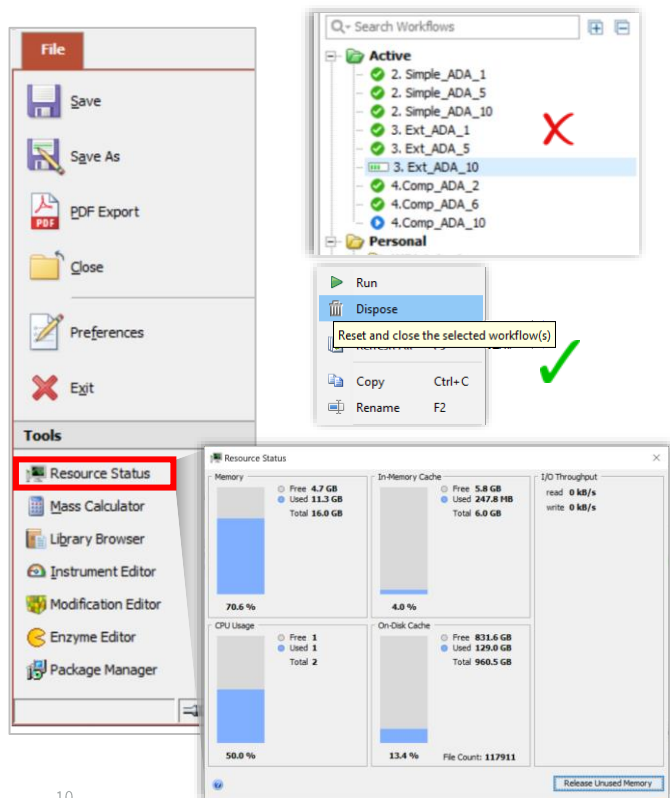
要打开工作流程，请执行以下任意一种操作：

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



Biologics Explorer 使用方法

正确使用相关资源的建议

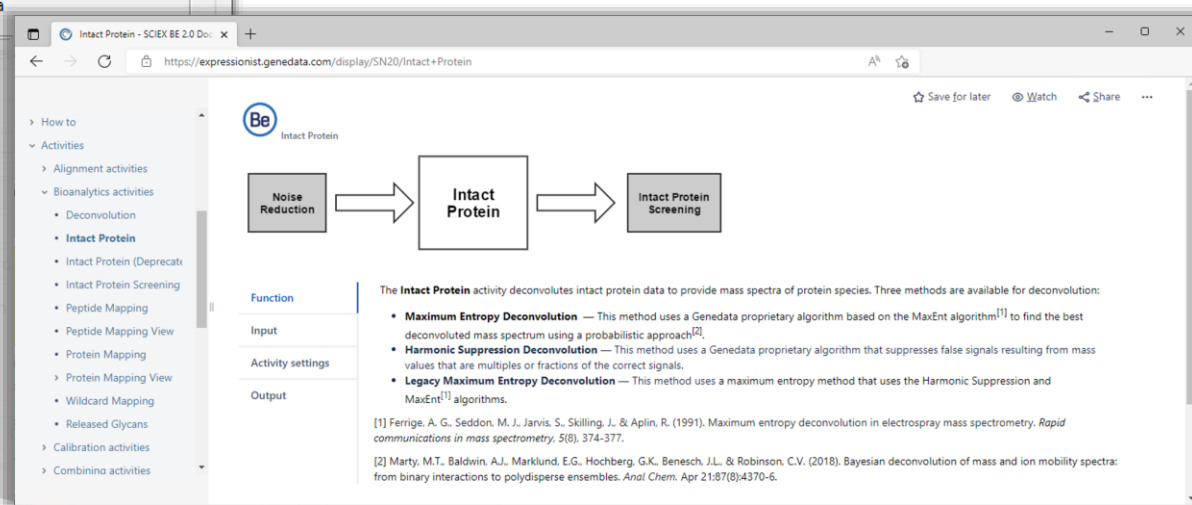
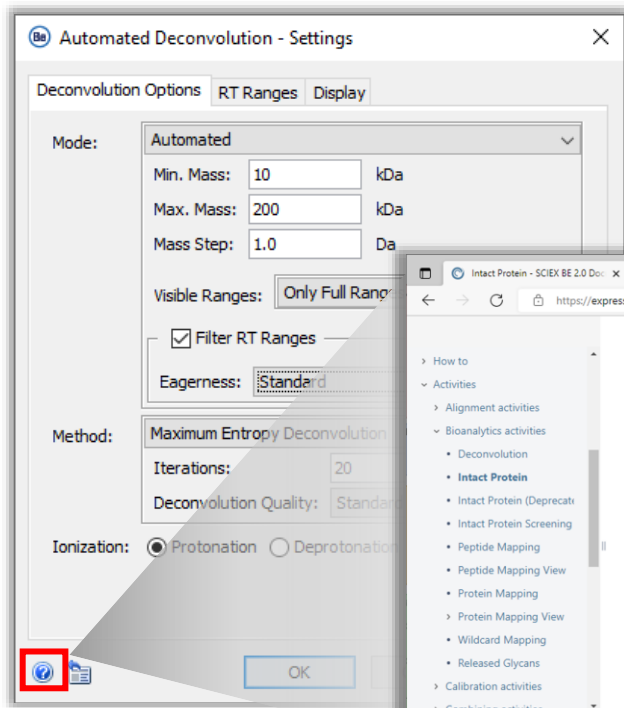


- 遵循最佳实践，以确保 Biologics Explorer 拥有足够的内存和计算能力：
 - 一次仅运行一个工作流程：有些活动节点非常耗费资源。协同处理可能会用尽所有可用资源。
 - 为节省内存，请尽量激活已优化的工作流程中的 Trash 图标。
 - 审核数据并保存结果后，在启动新分析之前重置或弃置工作流程。
 - 使用 *Save Snapshot* 活动节点，以在 Intact_ReviewSnapshots 工作流程中保存或审核已完成的结果。
- 处理计算机至少应拥有 250 GB 的可用磁盘空间和 6 GB 的内存缓存。
 - 为完整蛋白工作流程处理的文件加起来不应超过 12 GB。

Biologics Explorer 使用方法

查看在线帮助

- 有关单个活动节点及其设置的信息，请单击 ? 图标查看相关的帮助页面。



A 部分

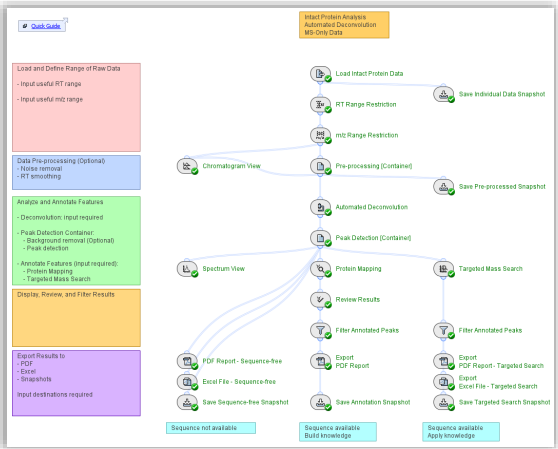
软件和工作流程

3. 完整工作流程的一般指南

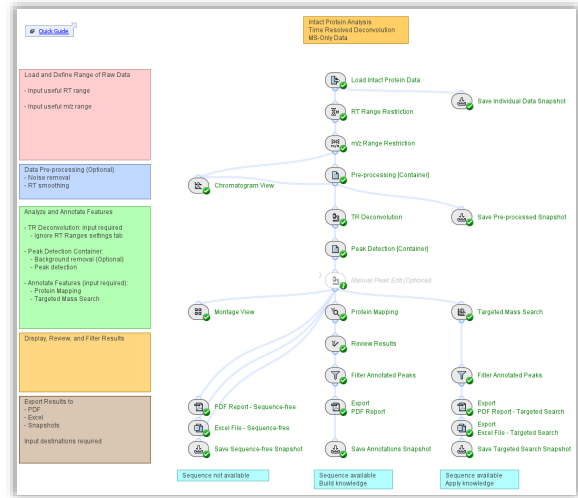


完整工作流程的一般指南

工作流程类型



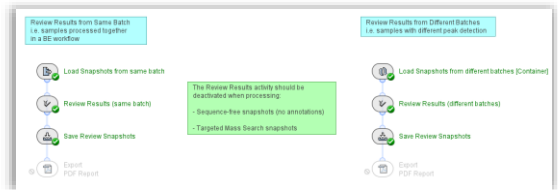
Intact_Automated Deconvolution
有和没有 UV 处理



Intact_TimeResolved Deconvolution
有和没有 UV 处理



Intact_MassScreening



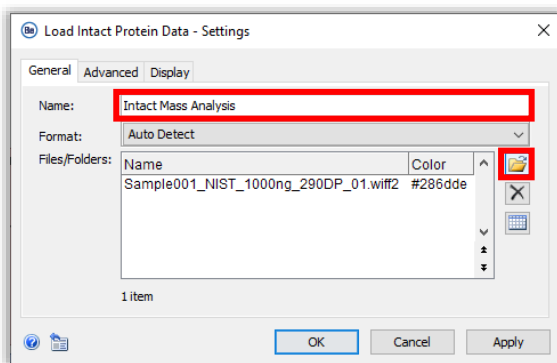
Intact_ReviewSnapshots

完整工作流程的一般指南




完整质量工作流程中的常见活动节点

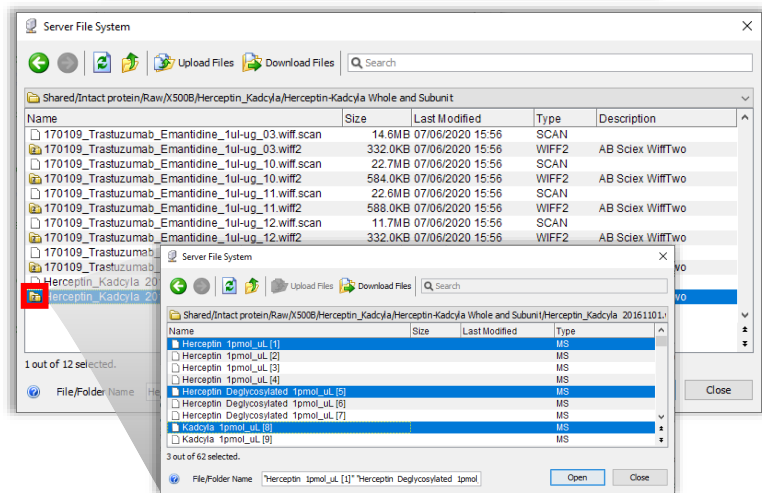
- A. *Load Intact Protein Data*
- B. *RT Range Restriction and m/z Range Restriction*
- C. *m/z Grid*
- D. *Spectrum Baseline Subtraction*
- E. *Chromatogram Chemical Noise Subtraction*
- F. *UV Processing [Container]*
- G. *Chromatogram View*
- H. 特征筛选器
- I. *Protein Mapping*
- J. *Targeted Mass Search*
- K. *Annotate UV Peaks from MS*
- L. 报告和导出

Load Intact Protein Data: 格式 (自动检测)



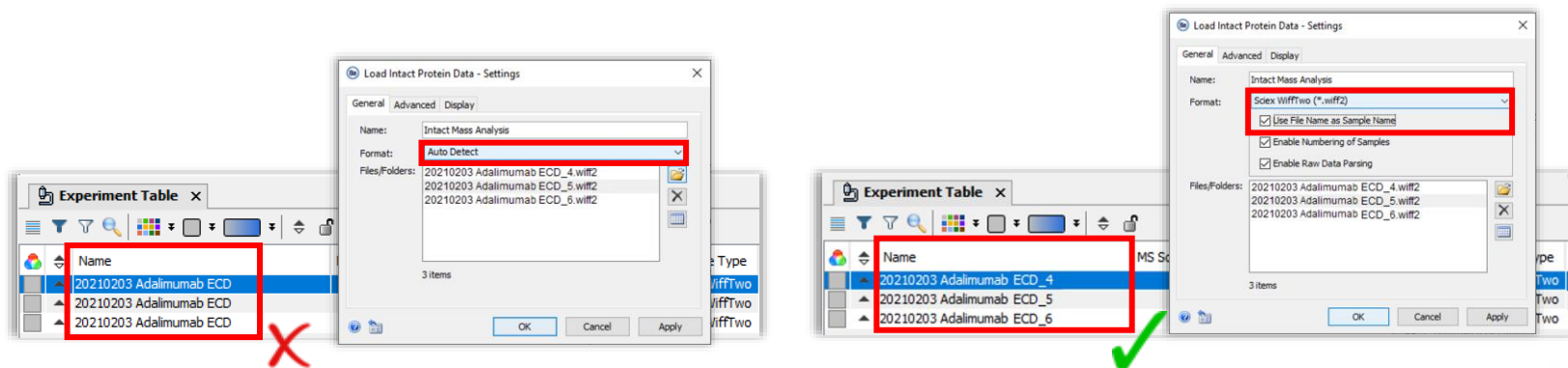
General 选项卡。

- 填写 **Name** 字段以定义分析。
- 上传原始数据文件 :
 - 仅选择 wiff 或 wiff2 容器文件。
 - 分析来自 ZenoTOF 7600 系统的数据时，仅使用 wiff2 文件（不使用 wiff 文件）。
 - 不要选择与之同名的辅助文件。
 - ✓  Herceptin_Kadcyla 20161101.wiff2
 - ✗  Herceptin_Kadcyla 20161101.wiff.scan
 - 要打开 wiff1 或 wiff2 容器并查看其中的任何文件，双击 wiff 或 wiff2 容器。
 - 从嵌入文件的列表中选择要上传的文件。



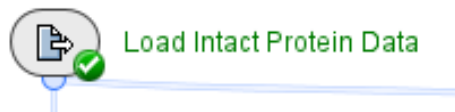
Load Intact Protein Data: 格式

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

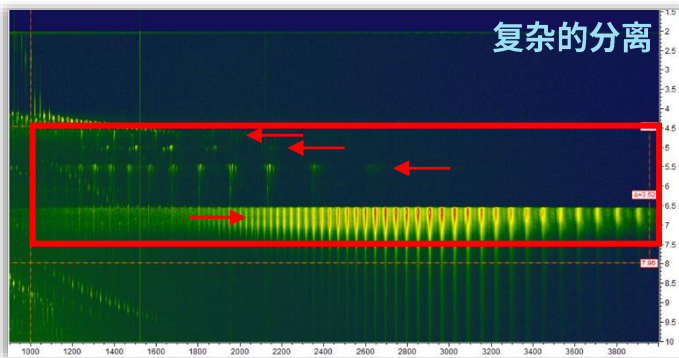
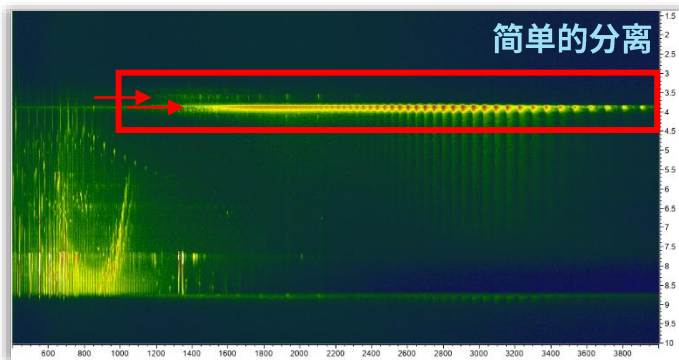


RT 和 m/z 范围的限制

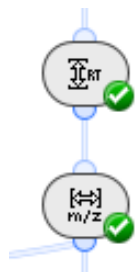
- 运行 *Load Intact Protein Data* 活动节点，然后在数据加载完成后将其打开（双击）。



- 确定包含有用数据的保留时间 (RT) 和质荷比 (m/z) 范围。
 - 排除因切换阀门或清洗色谱柱导致的杂散信号。
 - 重点关注分离范围。
 - 除非对较低质量的次要成分或污染物感兴趣，否则请将分析限制在目标蛋白洗脱范围内。



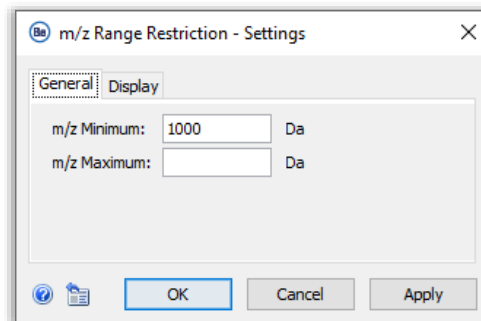
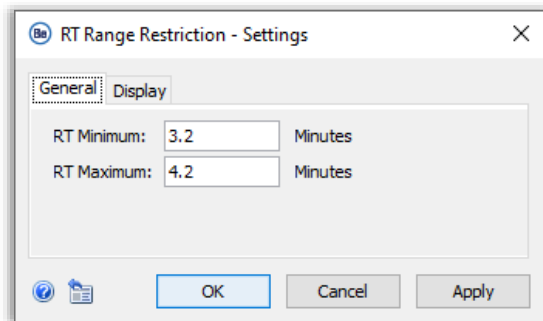
RT 和 m/z 范围的限制



RT Range Restriction

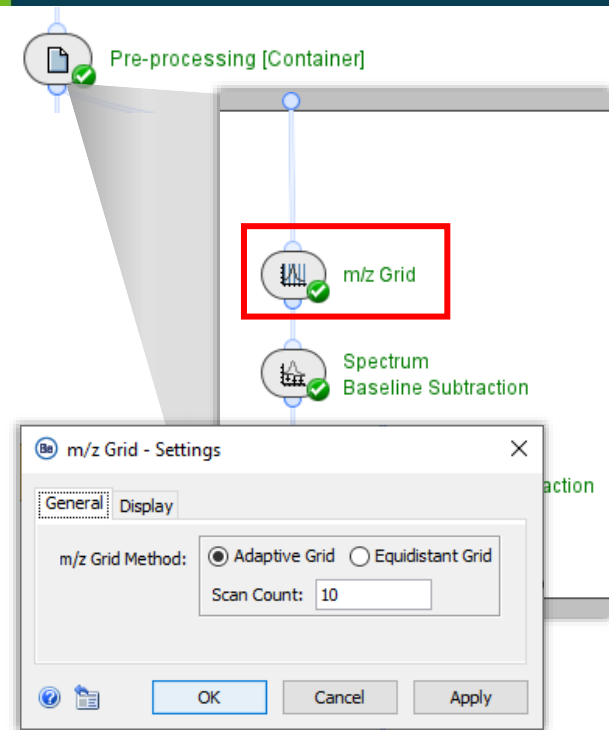
m/z Range Restriction

- 输入已确定的有用 RT 和 m/z 范围。
- 输入框留空时，使用完整的 RT 或 m/z 范围。



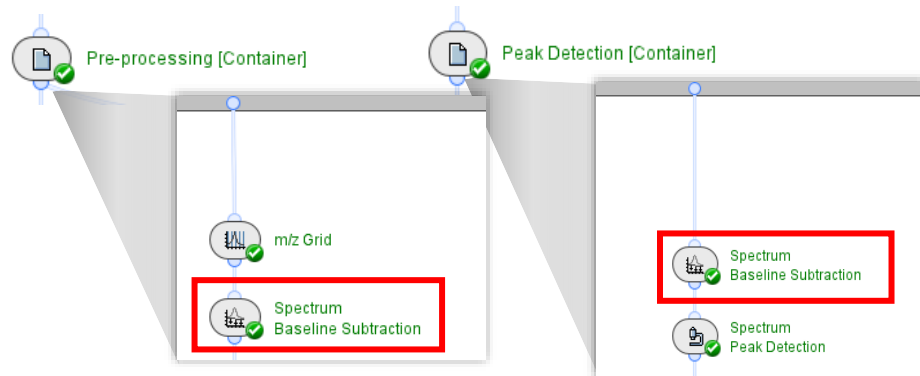
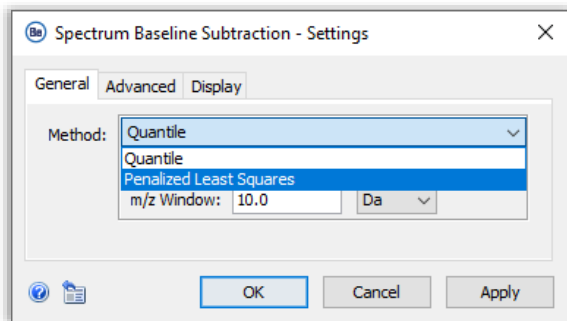
m/z Grid

- 在处理多个数据文件时请使用 *m/z Grid* 活动节点，以确保文件都在相同的 *m/z* 位置采样以进行峰检测。
- 默认设置为 **Adaptive Grid**。
 - 这种网格可适应数据密度。
 - 此设置可用于分析质量范围较大的样本。
- 使用 **Equidistant Grid** 设置分析重复样本和含有欠采样或噪声峰的数据。
 - **Equidistant Grid** 间距的最佳值能为低质量的关注峰提供足够的数点，且不会对高质量峰进行过采样。



Spectrum Baseline Subtraction

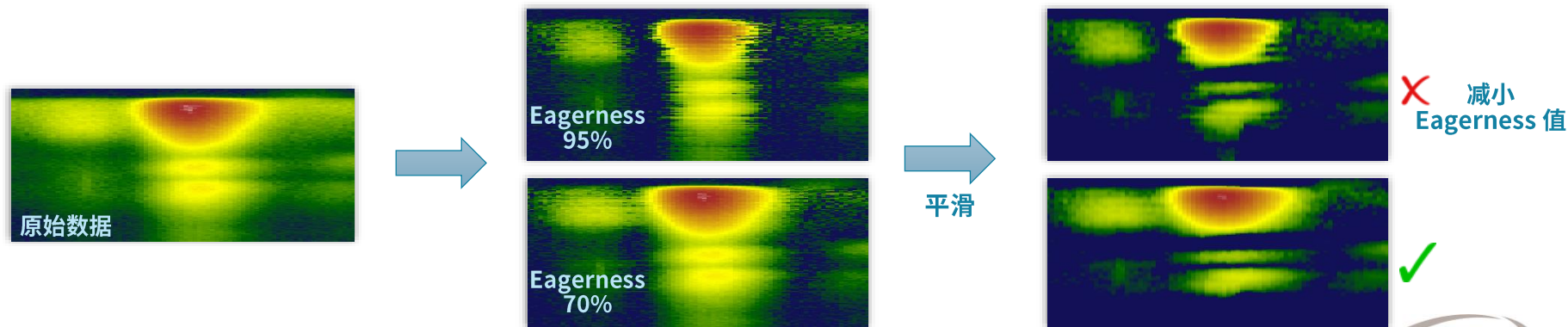
- *Spectrum Baseline Subtraction* 能够去除背景噪声并限制去卷积数据中产生卫星峰，因此可改进去卷积。
- 为改善峰检测，此活动节点也可在去卷积后使用。



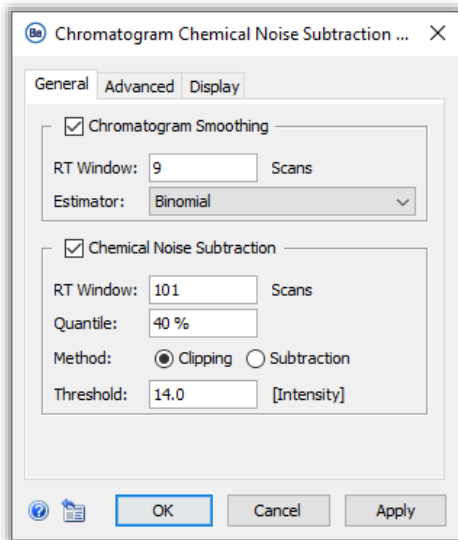
- **Quantile** 减除会影响所有信号：
 - 在减除之后，仅需少量平滑或无需平滑。
 - 如果将其用于高分辨率数据，则比 **Penalized Least Squares** 快很多。
 - 为避免减除有用信号，在分析完整全蛋白时应小心使用。
- **Penalized Least Squares** 减除只会影响低强度信号。

Spectrum Baseline Subtraction

- **Penalized Least Squares** 减除可减少大峰之间的谷高，进而减少去卷积谱图中的卫星峰。
 - 这种方法可能会比较耗费时间，特别是将其与 **Time Resolved Deconvolution** 和更高分辨率的数据（如亚基和碎片）配合使用时。
- 高 **Eagerness** 值（大于 90%）需要在 *Chromatogram Chemical Noise Subtraction* 活动节点进行大量 **Smoothing**。
 - 如果热图中的特征在平滑后仍然显示不规则的边界，则应减小 **Eagerness** 值。



Chromatogram Chemical Noise Subtraction



Chromatogram Smoothing 可用于改善峰的 RT 曲线。


- 使用 **Penalized Least Squares**（位于 *Spectrum Baseline Subtraction* 中）之后需要进行平滑处理，特别是在使用较高的 **Eagerness** 值后。
- **Estimator:**
 - **Moving Average** 可使用 **RT Window** 所含数据点的平均强度生成额外的数据点。因此，较高值将导致峰宽增加，但峰体积则保持不变。
 - **Binomial** 是 **Moving Average** 的迭代形式，对峰宽的影响较小。

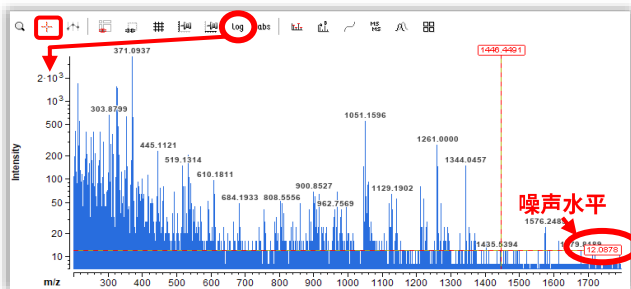
Chemical Noise Subtraction 有助于：

- 减少在原生数据中经常观察到的宽峰或拖尾峰。
- 抑制卫星峰并通过 TRD 改善峰检测。

• 设置：

- **RT Window:** 增加此值可减除更少的数据。
- **Quantile:** 减小此值可减除更少的数据。
- **Threshold:** 检查噪声水平以确定适当的强度值。

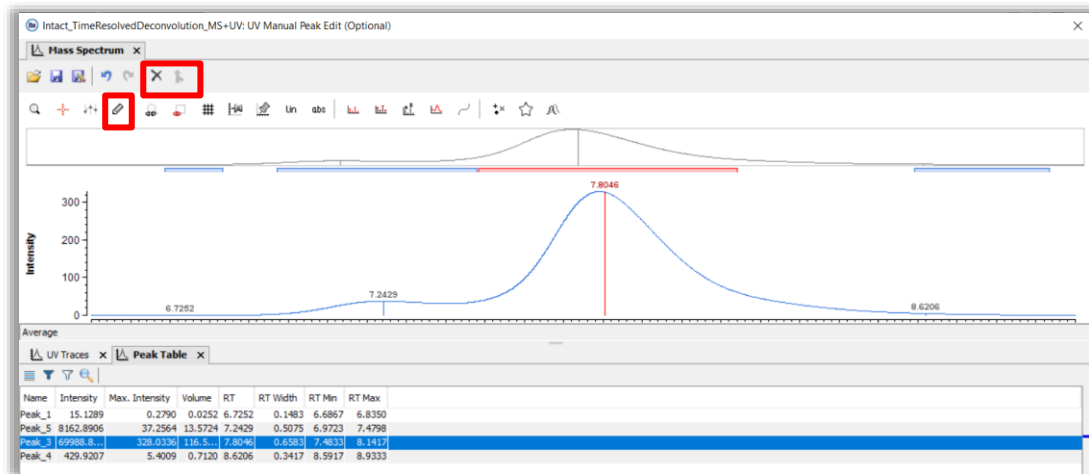
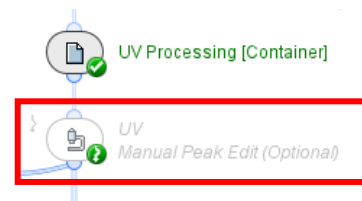
1. 通过拖动质谱强度轴直到噪声水平清晰可辨来扩展该轴，或使用工具栏的相应图标将该轴从线性刻度改为对数刻度。
2. 使用十字准线工具  来测量噪声水平的强度。



UV Processing: UV Manual Peak Edit

- 默认情况下会跳过此活动。
- *UV Manual Peak Edit* 可用于手动调整 UV 色谱图中的峰检测，方法如下：

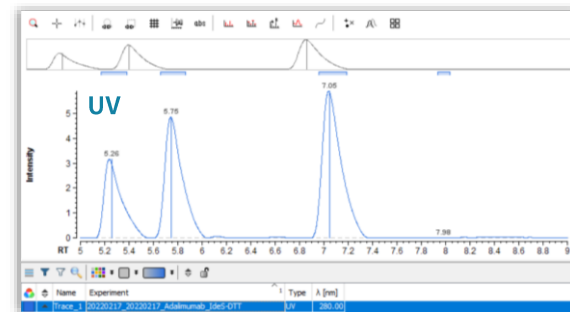
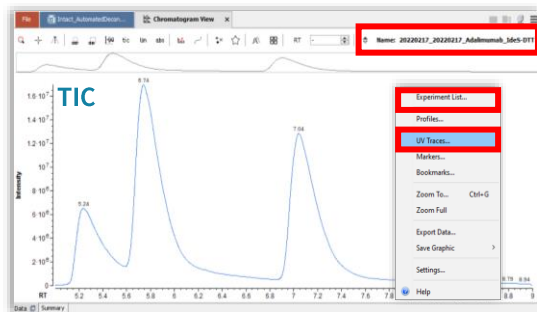
- 修改关注峰的边界。
- 分离重叠峰。
- 删除不需要的峰。
- 绘制新峰。



- *UV Manual Peak Edit* 是优化问题峰的 *UV Peak Detection* 参数的便捷替代方式。

Chromatogram View

- *Chromatogram View* 可显示每个样本在预处理前后的 TIC 色谱图。
- 右键单击该图即可查看 *UV Processing* 前后的 **Experiment List** 和 **UV Chromatograms**。

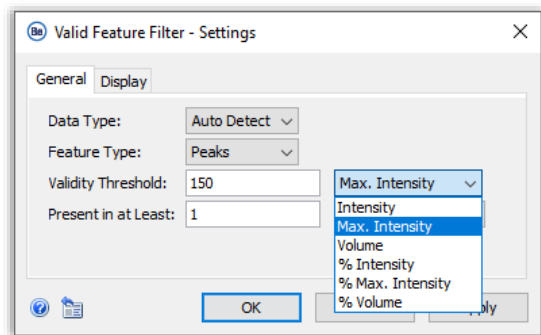
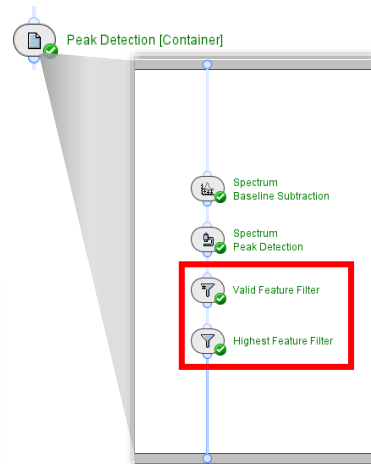


- 用户可以选择 **Experiment List** 中的多个色谱图，然后叠加或翻转以生成镜像视图。

Name	Scans	Method Name
20190615_Bevacuzimab_10ug_OC_100mM_AmAc_0.2_15min_UV_69	74	SEC MS Method Optimised 15
20190615_Bevacuzimab_10ug_OC_100mM_AmAc_0.2_15min_UV_...	74	SEC MS Method Optimised 15

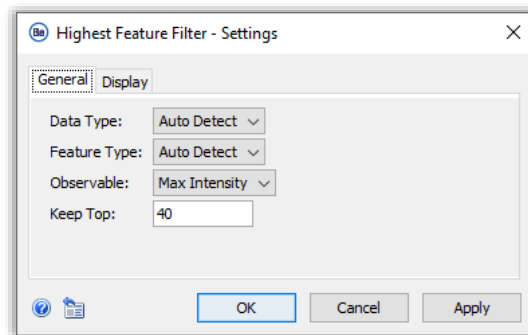
特征筛选器

- *Feature Filter* 活动节点可用于限制纳入的峰数量，这样即可仅保留最相关的峰，还能排除噪声产生的峰。
 - 如果无需对峰进行筛选，可使用 **Bypass** 图标限制其使用。



Valid Feature Filter

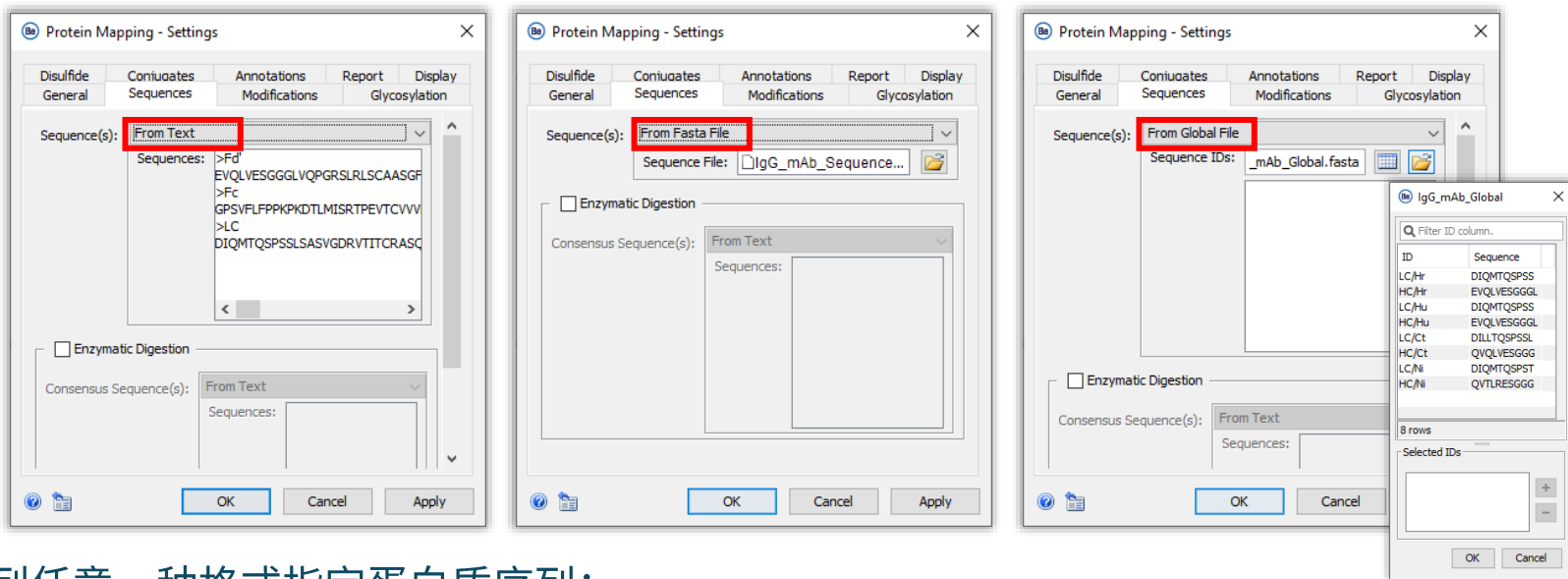
- 定义最小峰的强度和实验百分比，每个峰必须满足这些条件才能被纳入。



Highest Feature Filter

- 定义在每个确定的 RT 范围内报告多少个丰度最高的峰。

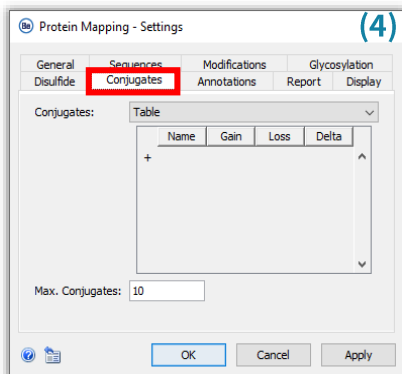
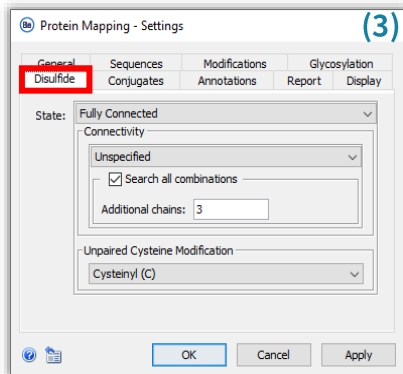
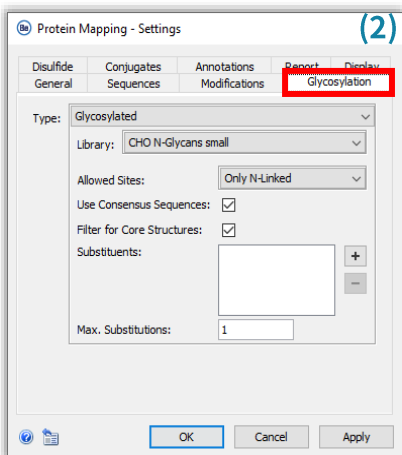
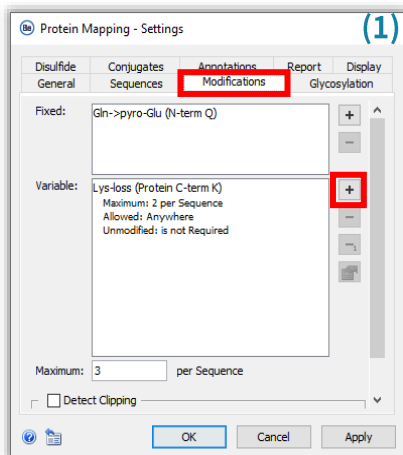
Protein Mapping: 序列



- 以下列任意一种格式指定蛋白质序列：

- **From Text:** 在 **Sequences** 框中指定蛋白质序列。
- **From Fasta File:** 上传包含目标序列的 fasta 文件。
- **From Global File:** 上传含有多个条目的 fasta 文件，所需使用的序列可从附加的弹出窗口中选择。

Protein Mapping: 修饰



1. 指定 **Fixed** 和 **Variable** PTM。

- 如果蛋白质序列携带 N-端基 E，则建议将 Glu-pyroGlu (N-端基 E) 设置为可变修饰，因为这种修饰形式不会成为主导。

2. 指定糖基化参数。

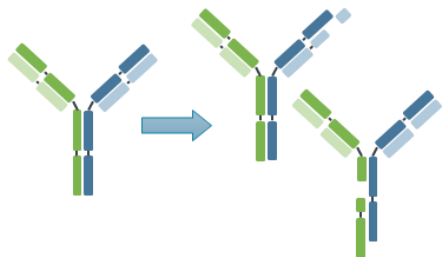
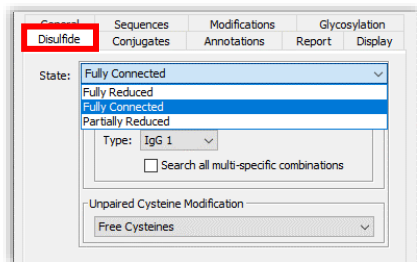
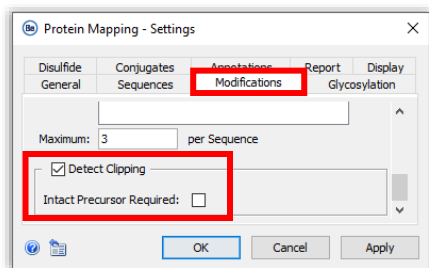
- 将 **Type** 设置为 **Glycosylated** 或 **Deglycosylated**:
 - Deglycosylated** 会假设每个 N-糖基化共有位点都发生脱酰胺事件，因此没有必要将脱酰胺指定为可变修饰。
 - 选择供 **Glycosylated** 使用的聚糖谱库。

3. 指定半胱氨酸连接的类型。

- mAbs 及其未连接的亚基可一起标注。可为游离半胱氨酸设置可变 PTM。

4. 如果目标蛋白是 ADC，请指定共轭物的名称和质量。

Protein Mapping: 检测剪切

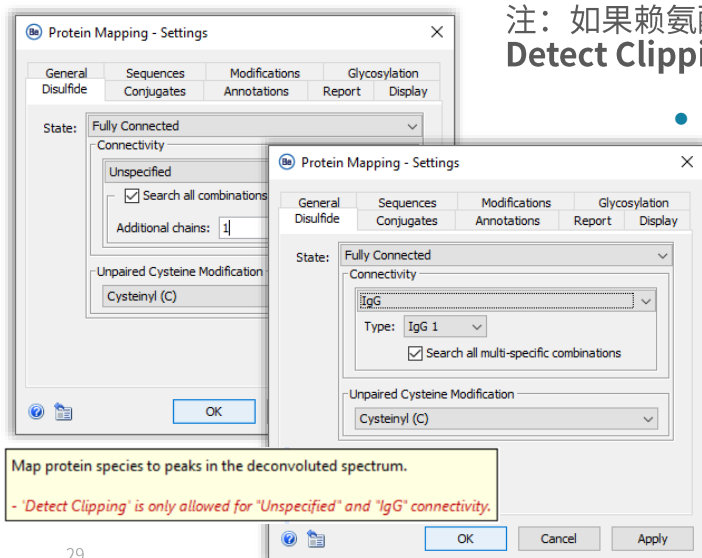


- **Detect Clipping** 功能可将潜在（经由电脑模拟）剪切事件的质量与在数据中检测到的峰进行匹配。
- 选择 **Modifications** 选项卡中的 **Detect Clipping**，以识别任何序列位置的单个剪切事件产生的 MS 峰。
 - 这种设置需要二硫键为 **Fully Connected** 或 **Fully Reduced**。（不支持部分还原样本的分析）。
 - **Detect Clipping** 功能不可与 **Sequences** 选项卡上的 **Enzymatic Digestion** 功能一起使用。
- 既定搜索空间内的组合可能性的数量应该受到限制。变量太多会导致：
 - ⚠️ 工作流程的处理时间延长或工作流程无法完成运行。
 - ⚠️ 高水平的假阳性识别需要进行过多的数据审核。

Protein Mapping: 检测剪切建议

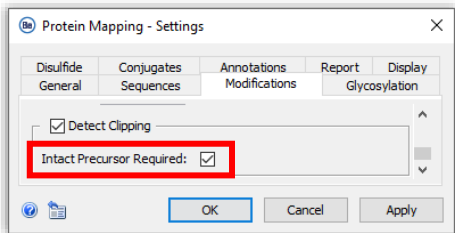
- 通过重点关注特定关注峰来限制搜索空间的一般指南：
 - 使用 *Feature Filter* 活动节点删除不可能来自剪切事件的峰。
 - 使用 TRD 工作流程中的 *Manual Peak Edit* 删除不可能来自剪切事件的峰。
 - 仅搜索已知存在且以合理丰度存在的修饰。
 - 将可变修饰的数量和所选谱库中的聚糖数量保持在最低水平。例如，仅包括构成大部分 (95%) 聚糖特征的糖型。

注：如果赖氨酸丢失（蛋白 C-端基 K）也作为修饰被纳入 *Protein Mapping* 搜索中，**Detect Clipping** 则会将 C-端赖氨酸丢失报告为重复标注。

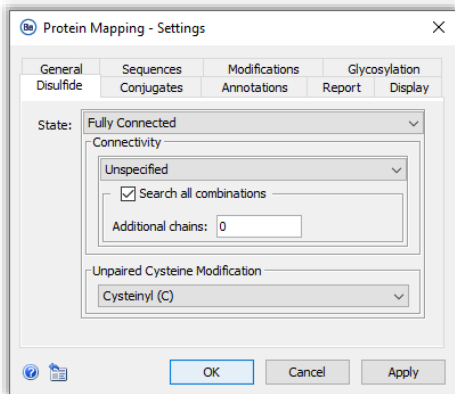


- 将 **Detect Clipping** 与 **Disulfide** 选项卡设置结合使用：
 - 要检测来自二硫键蛋白的已剪切粒种，请选择 **Fully Connected**、**Unspecified** 或 **IgG** 连接。
 - 如果选择 **Intact Precursor Required**，则在选中 **Search all combinations** 时，应将 **Additional chains** 设置为 0。
 - 如未选择 **Intact Precursor Required**，则在选中 **Search all combinations** 时，可将 **Additional chains** 设置为 0 或 1。
 - 如需识别还原的 IdeS 消化物中的碎片剪切，建议单独研究每个碎片。

Protein Mapping: 检测剪切 - 需要完整母离子

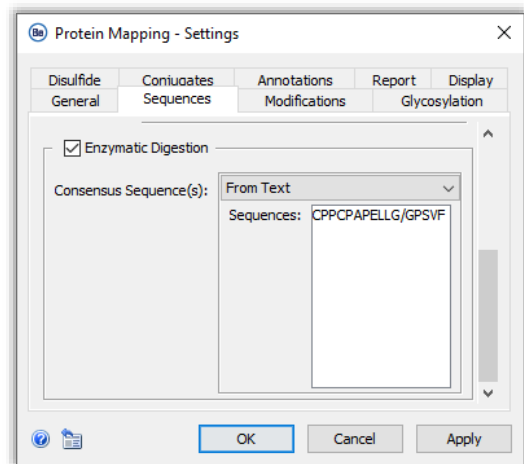


- 如果选择 **Intact Precursor Required**，则只有在数据中也识别出携带相同修饰的未剪切形式，才可识别含有修饰的剪切蛋白。
- 选择 **Intact Precursor Required** 会导致搜索时间会增加，但假阳性会减少。
 - 该算法可确认已识别的所有剪切形式都与全长的未剪切形式匹配。
 - 不含未剪切匹配的所有剪切形式都会被拒绝。



- 将 **Intact Precursor Required** 与 **Disulfide** 选项卡设置结合使用：
 - **Intact Precursor Required** 只能与以下一种设置结合使用：
 - **Connectivity: IgG**。必要时可选择 Search all multi-specific combinations。
 - **Connectivity: Unspecified**。可选择 **Search all combinations** 和 **0 Additional chains**。

Protein Mapping: 酶促裂解



- 酶促裂解是一种样本制备策略，可产生 MS 分析所需的蛋白亚基。
- 选择 **Enzymatic Digestion** 并提供 **Consensus Sequence**，以定义蛋白图谱的裂解点。

- 当添加多个共有位点时，该算法会假设所有位置都发生裂解，而不是将它们当作替代位置。
- 要查找单个共有序列的非特定裂解（例如 CPPCPAPELLG/GPSFV 和 CPPCPAPELLGG/PSFV），请单独搜索每个裂解。
 - 为此，请按顺序运行该工作流程。用户可以重新分析 *Save Annotations Snapshot* 的输出并跳过任何不需要的活动节点。

Peak Detection [Container]

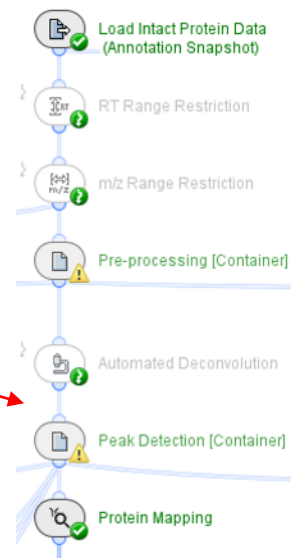
Protein Mapping

Map protein species to peaks in the deconvoluted spectrum.

- Enzymatic cleavages are only allowed for "Unspecified" connectivity.

Map protein species to peaks in the deconvoluted spectrum.

- 'Detect Clipping' and 'Enzymatic Digestion' can not be both activated at the same time.



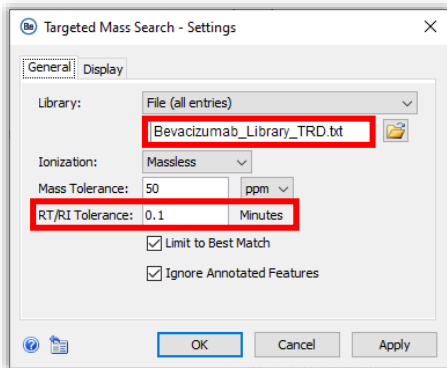
- 使用 **Enzymatic Digestion** 时：

- 选择 **Disulfide** 选项卡上的 **Unspecified** 连接。
- 不要选择 **Modifications** 选项卡上的 **Detect Clipping**。

Targeted Mass Search

- Targeted Mass Search 的输入谱库必须是在 Excel 中编辑并用制表符分隔的文本文件形式。

Targeted Mass Search



- Automated Deconvolution 工作流程的格式：

- 第一列 (Mass) 为必填项。

- Time Resolved Deconvolution 工作流程的格式：

- 前两列 (RT 和 Mass) 都是必填项。

- 根据需要删除不需要的列，或插入所需列以提供附加信息。

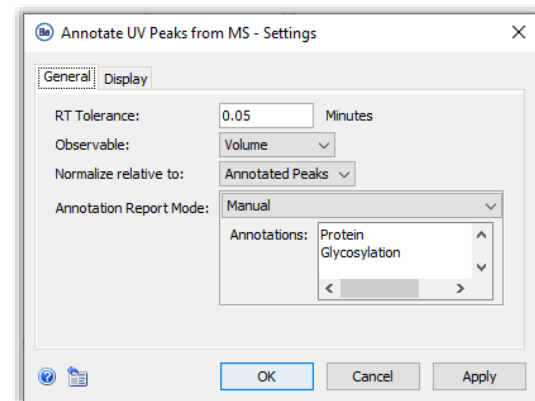
- 调整 RT/RI Tolerance 以解释色谱偏移。

Mass	Protein	Disulfide Bonds	Modifications	Glycosylation
23173.51646	Hein	2*5-5		
46245.01703	LC-LC	5*5-5		
147833.4673	HC-HC-LC-LC	16*5-5	2*Gln->pyro-Glu + 2*Lys-loss	G0F + G0F-GlcNAc
148036.6602	HC-HC-LC-LC	16*5-5	2*Gln->pyro-Glu + 2*Lys-loss	2*G0F
148198.801	HC-HC-LC-LC	16*5-5	2*Gln->pyro-Glu + 2*Lys-loss	G0F + G1F
148360.9419	HC-HC-LC-LC	16*5-5	2*Gln->pyro-Glu + 2*Lys-loss	2*G1F
148523.0827	HC-HC-LC-LC	16*5-5	2*Gln->pyro-Glu + 2*Lys-loss	G1F + G2F
148685.2236	HC-HC-LC-LC	16*5-5	2*Gln->pyro-Glu + 2*Lys-loss	2*G2F

RT	Mass	Protein	Modifications	Glycosylation
5.33	25400.3672	FC		G1F
5.295	25332.1262	FC		G0F
5.354	25366.0946	FC	Lys-loss	G1F
5.347	24975.7083	FC	Lys-loss	Man5
5.362	25203.9537	FC	Lys-loss	G0F
5.35	25000.7609	FC	Lys-loss	G0F-GlcNAc
6.048	23411.8919	LC		
8.042	25458.2347	Fd		
8.044	25440.309	Fd	Glu->pyro-Glu	

Annotate UV Peaks from MS

- 此活动使用 MS 峰信息来标注 UV 迹线中的相应峰。
 - 相应的峰必须在指定的 **RT Tolerance** 内洗脱。
- 还可根据 UV 吸光度计算 UV 峰的相对比率。
 - 需要使用蛋白质序列来归一化 UV 吸光度的值。
 - 如果无法计算 UV 归一化因子，则该活动节点将显示**黄色警告**。
 - UV 归一化 不适用于 **Time Resolved Deconvolution**。
 - UV 归一化 不适用于 *Targeted Mass Search*，因为此活动节点不包含蛋白质序列。



Experiment Table		Peak Table	
Name	RT	Area	Height
20190615_Bevacuzumab_10ug_OC_100mM_Am			

1 row (1 selected)

Data | UV Quantities | **Summary**

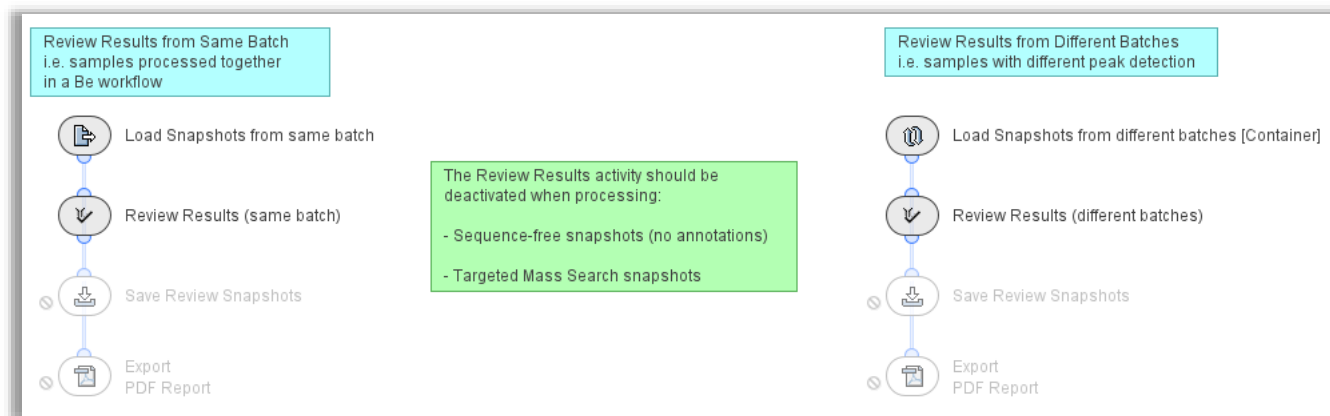
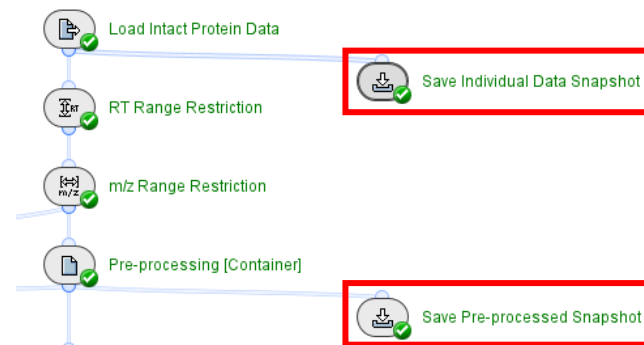


Annotate UV Peaks from MS

Start Time 13:28:14 04/11/22
 Complete Time 13:28:14 04/11/22
 Elapsed Time 3 msec
 Status Suspicious
 Message The normalized UV absorbances could not be computed due to missing and/or duplicated annotations.

报告: *Save Snapshots*

- 在整个工作流程的不同阶段后存储中间结果。
 - Save Snapshot* 活动节点可创建包含已处理数据的必要属性的文件 (sbf)。
- 要查看存储的数据, 请打开在 Intact_ReviewSnapshots 工作流程的 *Load Snapshots* 活动节点中保存的 sbf 文件。



报告: *Save Snapshots*

- 选择或创建将用于存储结果的文件夹。
 - 默认位置是: C:\ProgramData\Sciex\BiologicsExplorer\data\data\user

可用于保存快照的选项:

1. *Save Individual Data Snapshot*: 将原始数据转换为 sbf 格式。无论是位于相同 wiff 或 wiff2 容器中的多个样本, 还是位于同一批次的多个实验, 都会作为单独的快照保存。
2. *Save Pre-processed Snapshot*: 存储去卷积之前清理数据和校准 RT 得到的中间结果。
3. *Save Sequence-free Snapshot*: 在峰检测后保存, 在去卷积后储存峰信息, 无需蛋白质序列。
4. *Save Annotation Snapshot*: 在完成审核流程后保存, 存储所有中间信息, 包括特征标注以及手动审核的筛选和结果。
5. *Save Targeted Search Snapshot*: 在 *Filter Annotated Peaks* 后保存, 使用 *Targeted Mass Search* 保存标注后的峰信息。
6. *Save Review Snapshots*: 在 Intact_ReviewSnapshots 工作流程的审核流程后保存。存储所有信息, 类似 *Save Annotation Snapshot*。



Save Individual Data Snapshot



Save Pre-processed Snapshot



Save Sequence-free Snapshot



Save Annotation Snapshot

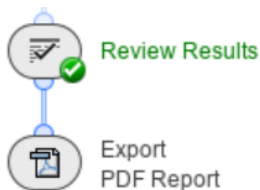


Save Targeted Search Snapshot



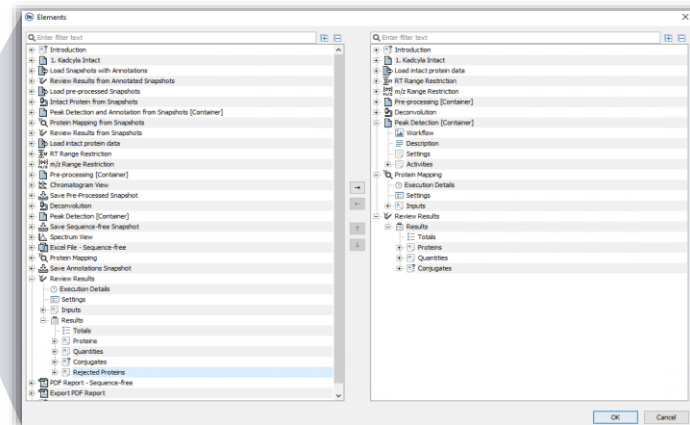
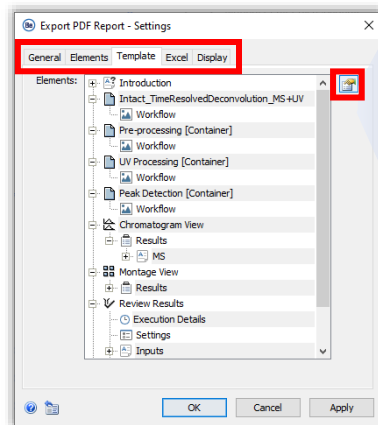
Save Review Snapshots

报告: *Export PDF Report*



- *Export PDF Report* 活动节点会产生：
 - 一个 PDF 文件。
 - 一个含有来自去卷积的谱图信息的 Excel 文件。
 - 一个已执行的工作流程 (xml)，包括用于生成结果的设置。
 - 要打开 xml 文件，请将其拖放到 Biologics Explorer 工作流程的主页。

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



报告：保存或导出 Excel 文件

- 生成的 Excel 文件包含峰相关的定量信息：
 - **Automated Deconvolution**: 将定量信息导出为 **Maximum Intensity**。
 - **Time Resolved Deconvolution**: 将定量信息导出为 **Volume**。

Name	Mass	RT	Mass Wtd	RT Height	Area	Mass Min	Mass Max	RT Min	RT Max	
1 Peak_00	3206.03833	25332.38	5.290895	18	0.448667	8.0742	25323.5	25341.5	5.157967	5.606533
2 Peak_00	480.4490356	25494.41	5.245409	12	0.28145	3.3774	25488.5	25500.5	5.157967	5.439417
4 Peak_01	432.8087769	25223.43	5.343585	12	0.369408	4.4329	25219.5	25231.5	5.19315	5.562558
5 Peak_01	5228.773926	25366.3	5.351897	18	0.49255	8.8659	25357.5	25375.5	5.19315	5.6857
6 Peak_02	785.7726525	24976.16	5.344246	16	0.351825	5.6292	24968.5	24984.5	5.201942	5.553767
7 Peak_02	1240.089233	25001.06	5.344819	15	0.360617	5.40925	24994.5	25009.5	5.201942	5.562558
8 Peak_02	207.4940948	25142.44	5.304126	5	0.263867	1.319333	25140.5	25145.5	5.201942	5.465808
9 Peak_02	23351.86328	25204.28	5.362964	20	0.439775	8.7955	25194.5	25214.5	5.201942	5.641717
10 Peak_02	258.5281372	25350.26	5.350916	7	0.325433	2.27803	25346.5	25353.5	5.201942	5.573775
11 Peak_04	536.6027832	24838.63	5.337205	11	0.325433	3.579767	24832.5	24843.5	5.210733	5.536167
12 Peak_04	223.7139282	25136.6	5.322132	4	0.272667	1.090667	25134.5	25138.5	5.210733	5.4834
13 Peak_04	1393.563965	25185.9	5.364173	12	0.4046	4.8552	25178.5	25190.5	5.210733	5.615333
14 Peak_04	231.4377747	25250.44	5.357551	8	0.334233	2.673867	25245.5	25253.5	5.210733	5.544967
15 Peak_10	424.6436462	25204.39	5.85781	12	0.158317	1.8998	25198.5	25210.5	5.78245	5.940767
16 Peak_10	67678.54688	23412.21	6.044723	21	0.510142	10.71298	23403.5	23424.5	5.826425	6.336567
17 Peak_10	307.2645874	22546.69	5.997263	9	0.263867	2.3748	22543.5	22552.5	5.8704	6.134267
18 Peak_11	2944.370605	23933.47	6.040324	12	0.474958	5.6995	23386.5	23396.5	5.8704	6.345358
19 Peak_11	806.7955322	23434.23	6.039181	10	0.422183	4.221833	23429.5	23439.5	5.8792	6.301383
20 Peak_11	1119.460615	23457.05	6.050581	11	0.430983	4.740817	23450.5	23461.5	5.8792	6.310183
21 Peak_11	1142.189697	23464.35	6.050805	4	0.430975	1.7239	23462.5	23466.5	5.888	6.318975
22 Peak_12	431.1587524	22630.68	6.056369	4	0.395792	1.583167	22628.5	22632.5	5.896792	6.292583



Excel File - Sequence-free



Export
Excel File - Targeted Search

- 选择或创建将用于存储结果的文件夹。
 - 默认位置是：C:\ProgramData\Sciex\BiologicsExplorer\data\data\user

A 部分

软件和工作流程

特定的完整工作流程指南

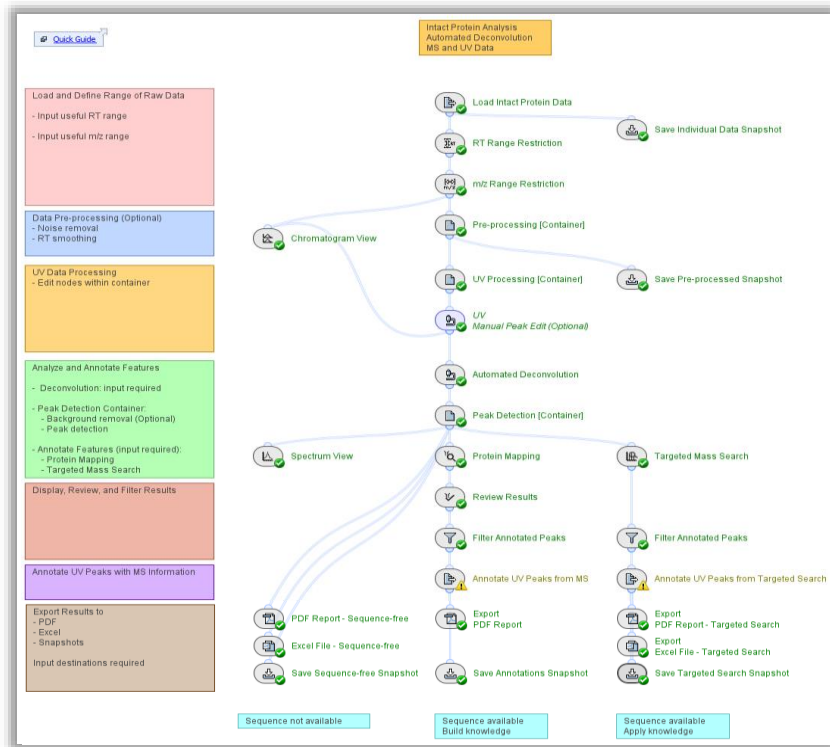
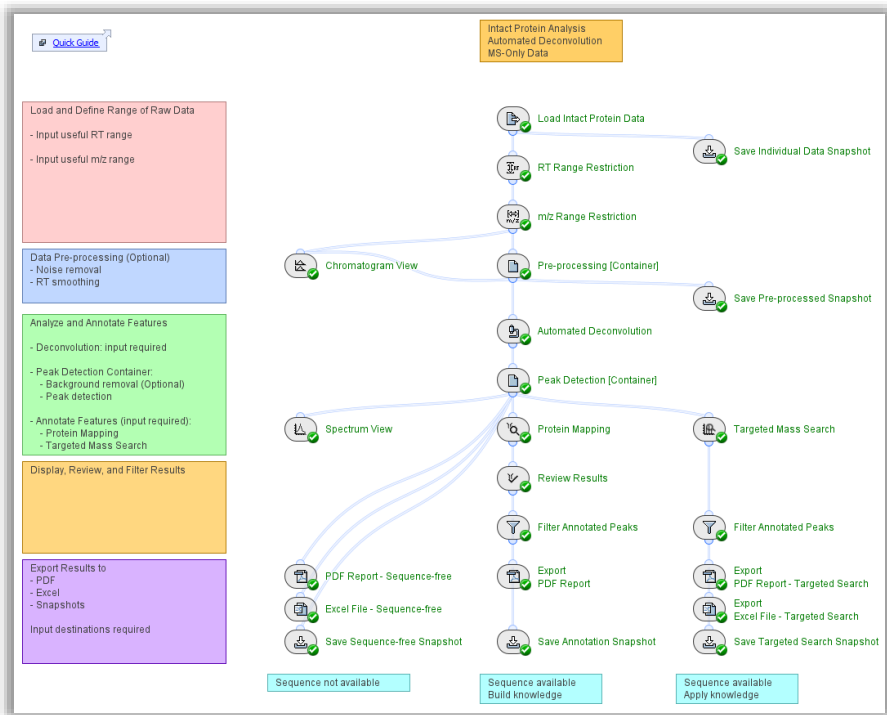


自动去卷积 (使用 MS 或 MS 和 UV 数据)

工作流程指南



自动去卷积工作流程：设计



Intact_AutomatedDeconvolution_MS 工作流程

Intact_AutomatedDeconvolution_UV+MS 工作流程

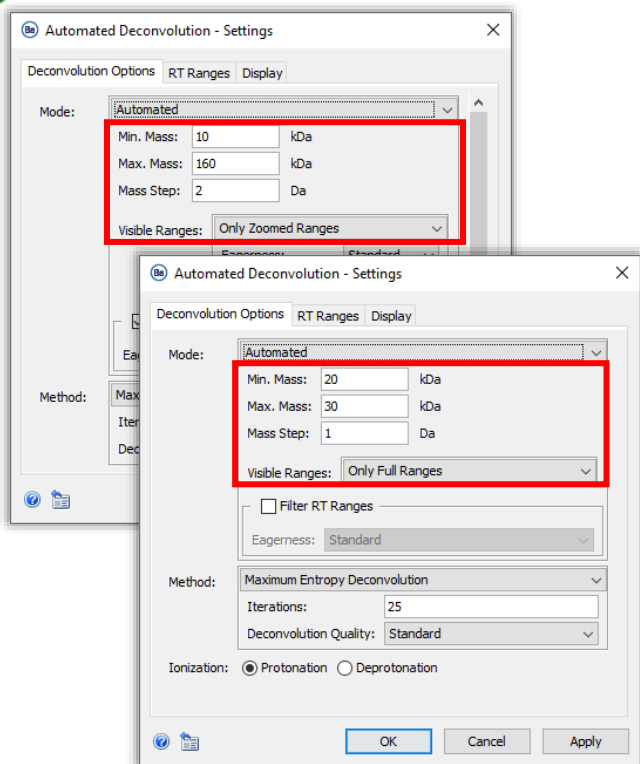
自动去卷积工作流程：概述

- **Automated Deconvolution** 是目标粒种在色谱分辨良好情况下的最佳选项。
- 同时分析多个样本时（批量分析），Biologics Explorer 软件会使用通用的峰检测方法。
 - 为确保标注和定量保持一致，请使用相似的数据。例如，仅同时分析所有完整蛋白或所有亚基的数据集。
 - 如果正在分析多个峰强度变化很大的样本，请参阅幻灯片“*Automated Deconvolution: 手动 RT 范围*”以获得优化工作流程设置的说明。

Automated Deconvolution: 去卷积选项



Automated Deconvolution



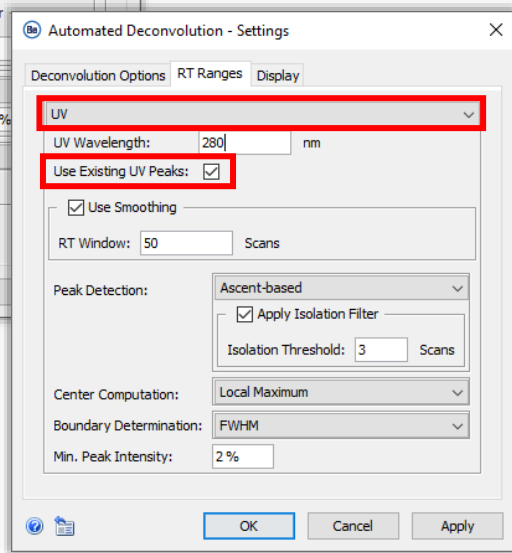
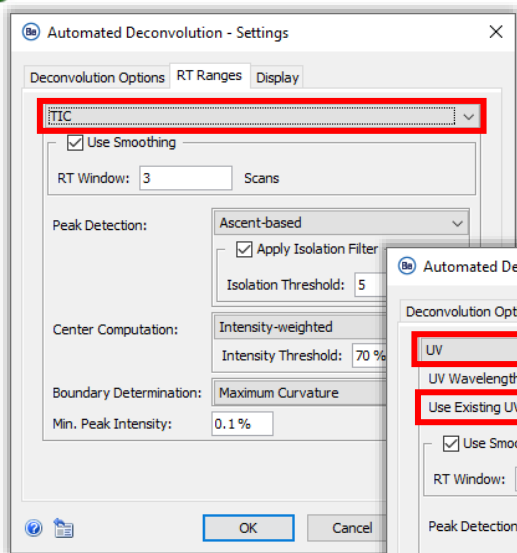
配置 **Deconvolution Options** 选项卡上的设置，以定义去卷积谱图的相关质量范围和可视化选项。

- **Mass range:**
 - 分析多个粒种时，使用较宽的质量范围以防止出现明显的谐波峰。
 - 分析单个实体则使用较窄的质量范围。
- **Visible Ranges** 可控制结果的显示方式。
 - 如果在相同 RT 范围内检测到多个成分，则使用 **Only Zoomed Ranges**。
- 设置能在去卷积前后产生相同数量的峰间数据点的 **Mass Step** 值。
 - 0.1 Da - 0.2 Da 适用于同位素分辨数据。
 - 1 Da 适用于亚基（较低分辨率数据）。
 - 2 Da 适用于完整蛋白（较低分辨率数据）。
 - 如果所需的数据点更少，则使用 3 Da。

Automated Deconvolution: RT 范围



Automated Deconvolution



- 配置 **RT Ranges** 选项卡中的设置，以确定感兴趣的 RT 区域。

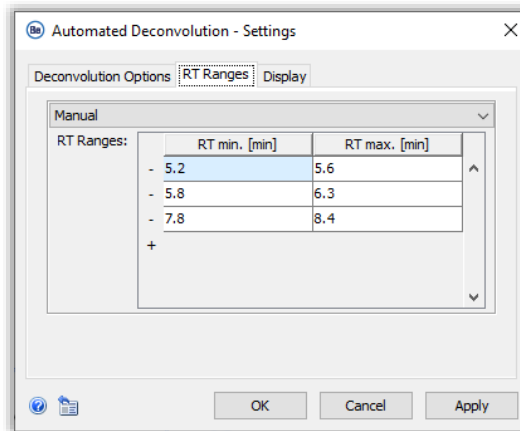
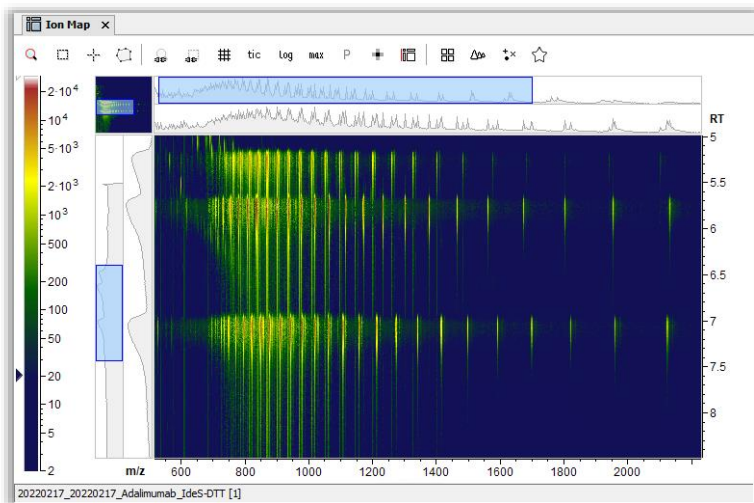
- 从列表中选择以下选项之一：
 - TIC**: 使用总离子色谱图确定 RT 范围。
 - Manual**: 手动定义 RT 范围。
 - UV**: 根据 UV 数据中的峰定义 RT 范围。
 - 要使用 UV 数据定义 RT 范围，请执行以下操作：
 - 使用 Intact_AutomatedDeconvolution_UV+MS 工作流程。
 - 定义 **UV Wavelength**。
 - 选择 **Use Existing UV Peaks**。此选项卡上的后续峰检测设置将被忽略。

Automated Deconvolution: 手动 RT 范围



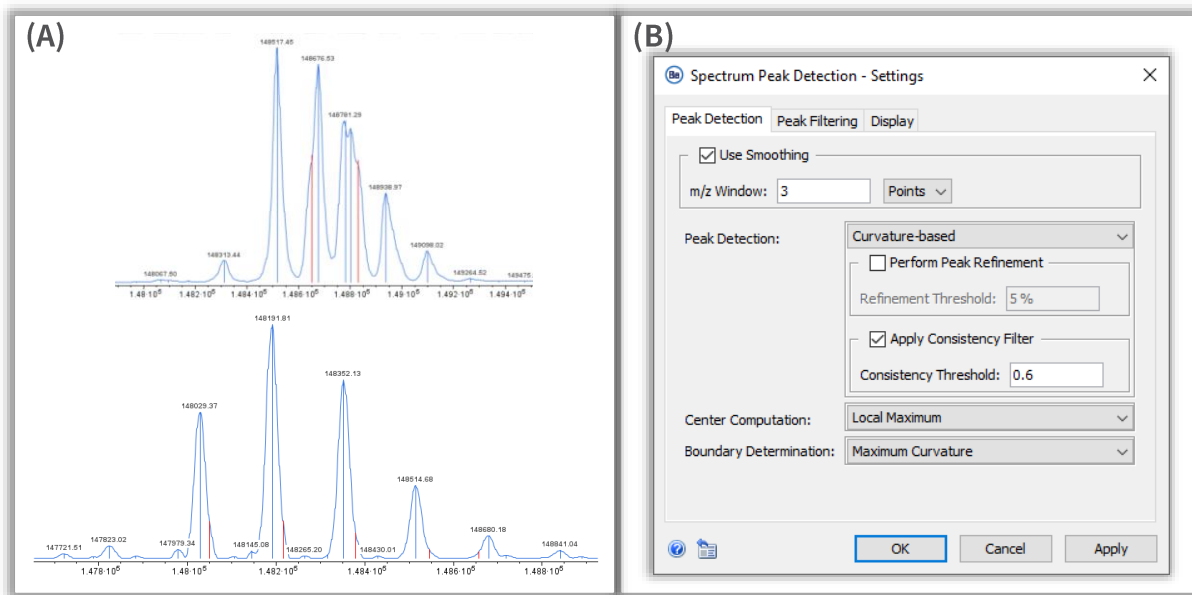
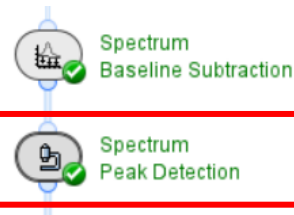
Automated Deconvolution

- 如果批量分析所含不同样本的信号强度存在显著差异，请手动定义 RT 范围。
 - 例如，在稀释系列或时间过程实验中。
- 选择 **RT Ranges** 选项卡中的 **Manual** 模式。



Spectrum Peak Detection

- 默认设置 (**Ascent-based** 峰检测) 是大多数用例的最佳选择。
- 使用 **Curvature-based** 峰检测来解析肩峰。
 - 有关参数的详细说明, 请参阅在线帮助。

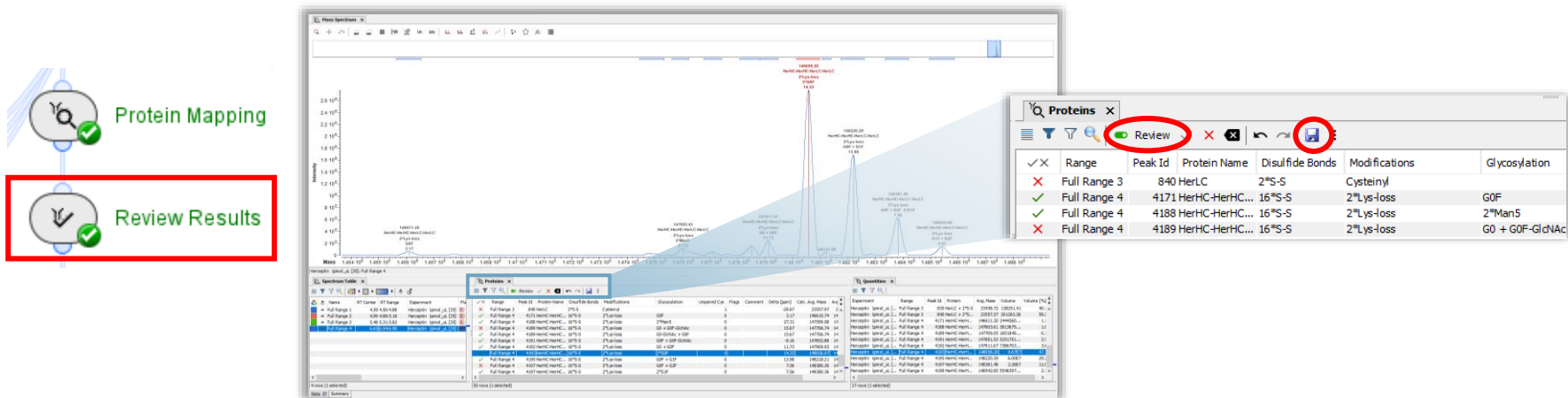


- 使用 **Curvature-based** 峰检测来解析肩峰时会产生去卷积谱图。
- 用于解析所示谱图所含肩峰的示例设置。

Review Results: 接受和拒绝标注

• 打开 *Review Results* 活动节点:

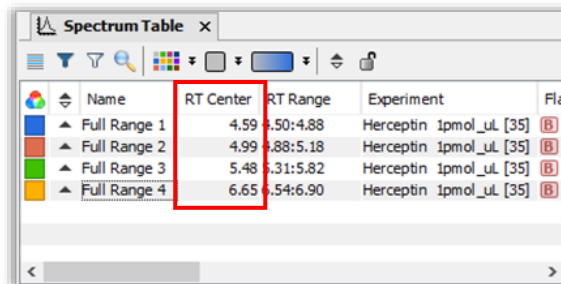
1. 激活 **Review** 模式并接受所有相关峰的某个标注。
2. 拒绝所有其他多余的标注。
3. 单击 **Save** 以应用更改。该活动节点会再次运行，自动重新计算数量。



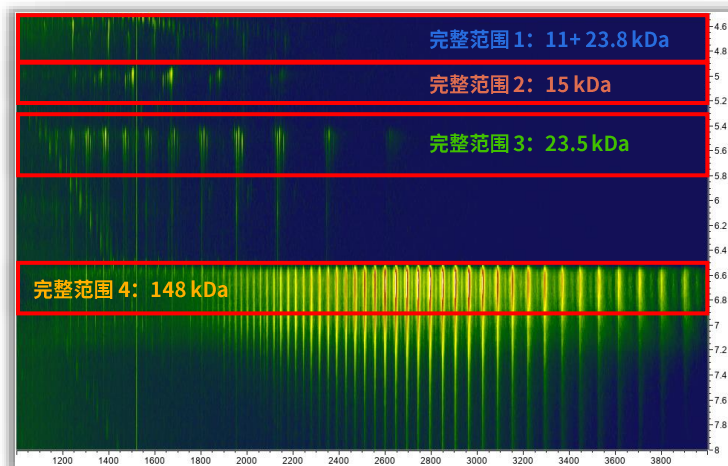
- *Review Results* 是分析具有复杂糖基化模式的蛋白以及确保 ADC 正确计算 DAR 值的关键步骤。

Review Results: 谱图表

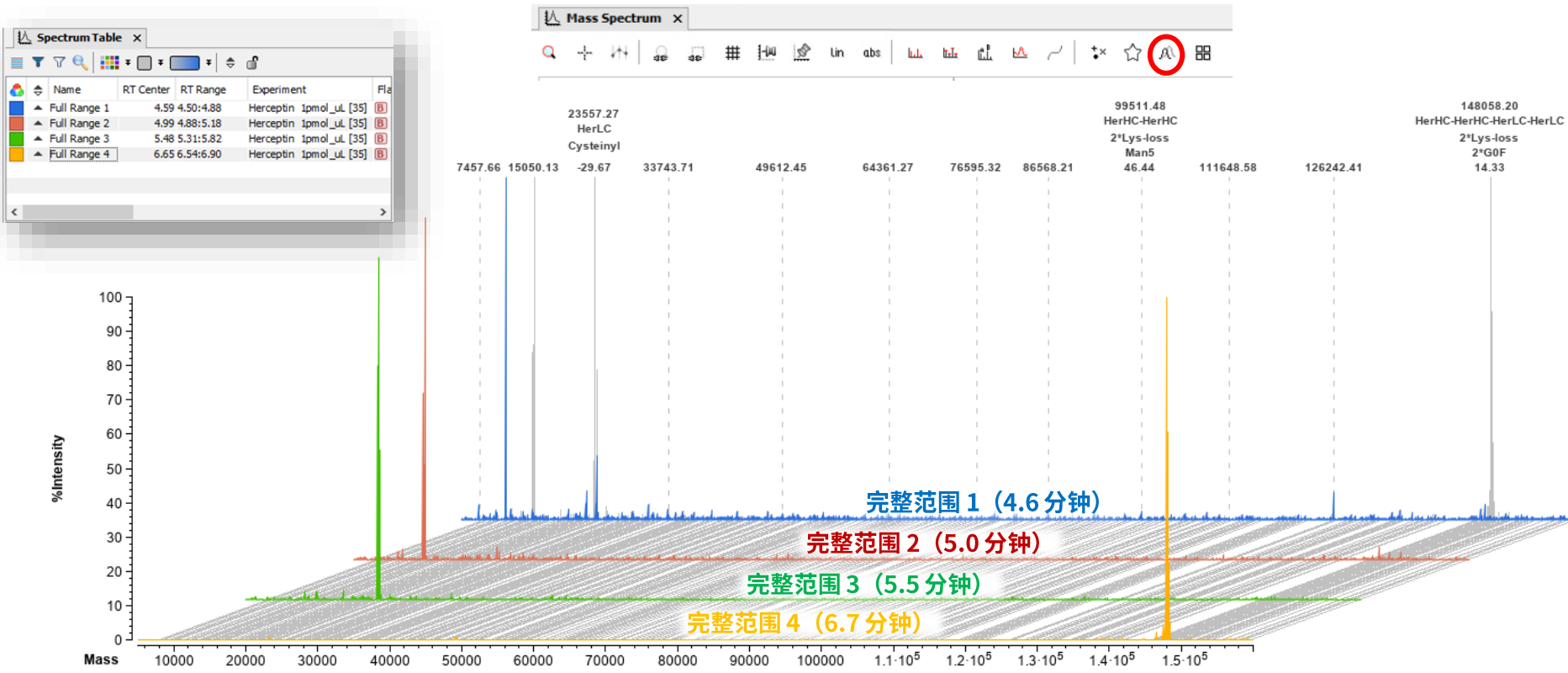
- **Spectrum Table** 已列出所检测到的 RT 范围和检测到的蛋白信号的 **RT Center**。
- 对每个时间范围内的所有扫描进行求和以及去卷积，以产生相应的谱图。



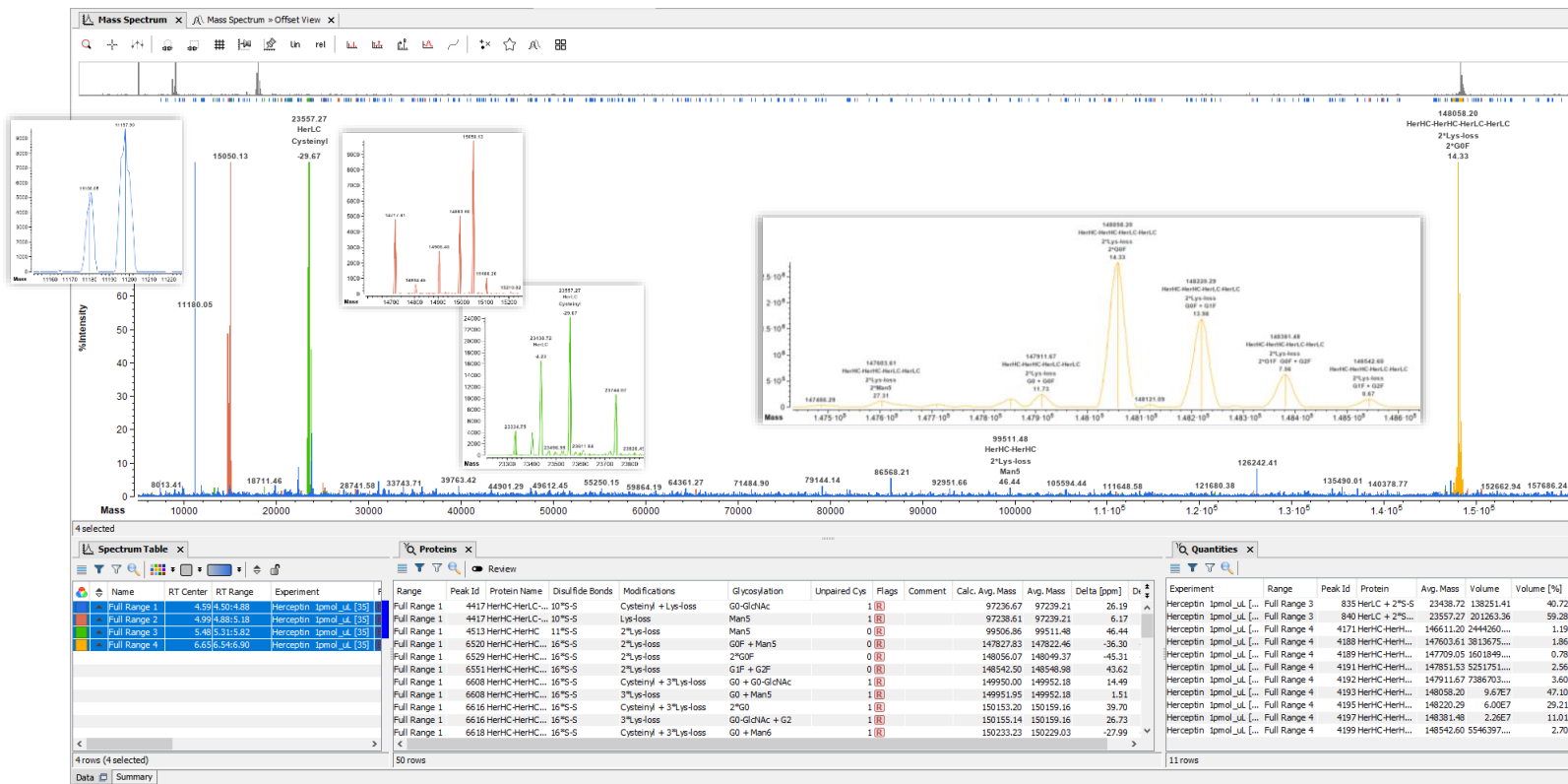
Name	RT Center	RT Range	Experiment	File
▲ Full Range 1	4.59	4.50:4.88	Herceptin 1pmol_ul [35]	B
▲ Full Range 2	4.99	4.88:5.18	Herceptin 1pmol_ul [35]	B
▲ Full Range 3	5.48	5.31:5.82	Herceptin 1pmol_ul [35]	B
▲ Full Range 4	6.65	6.54:6.90	Herceptin 1pmol_ul [35]	B



Review Results: 谱图偏移视图



Review Results: 谱图重叠视图

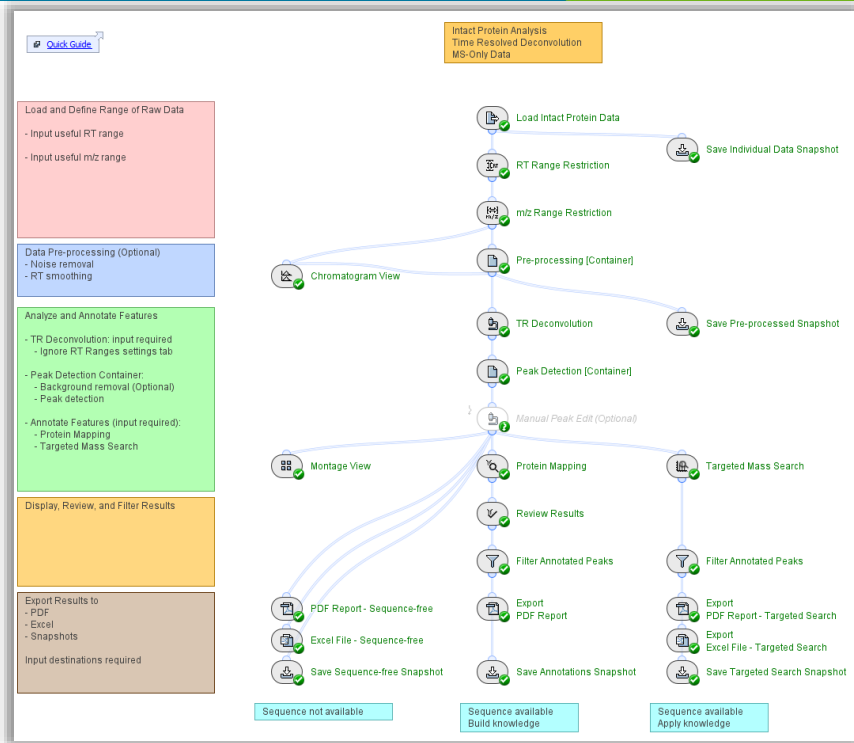


时间分辨去卷积（使用 MS 或 MS 和 UV 数据）

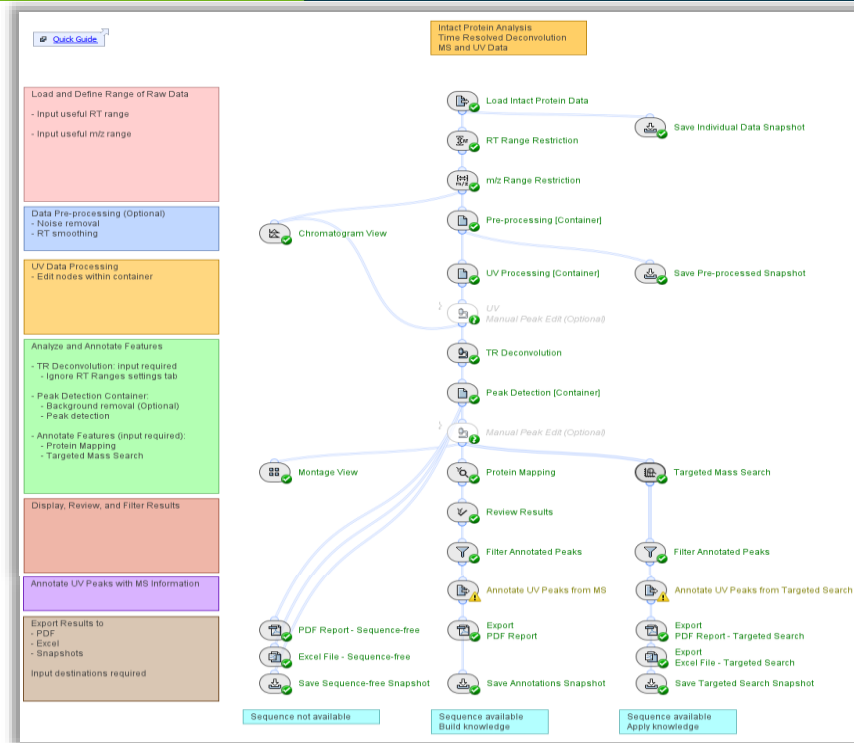
工作流程特定指南



TRD 工作流程：设计



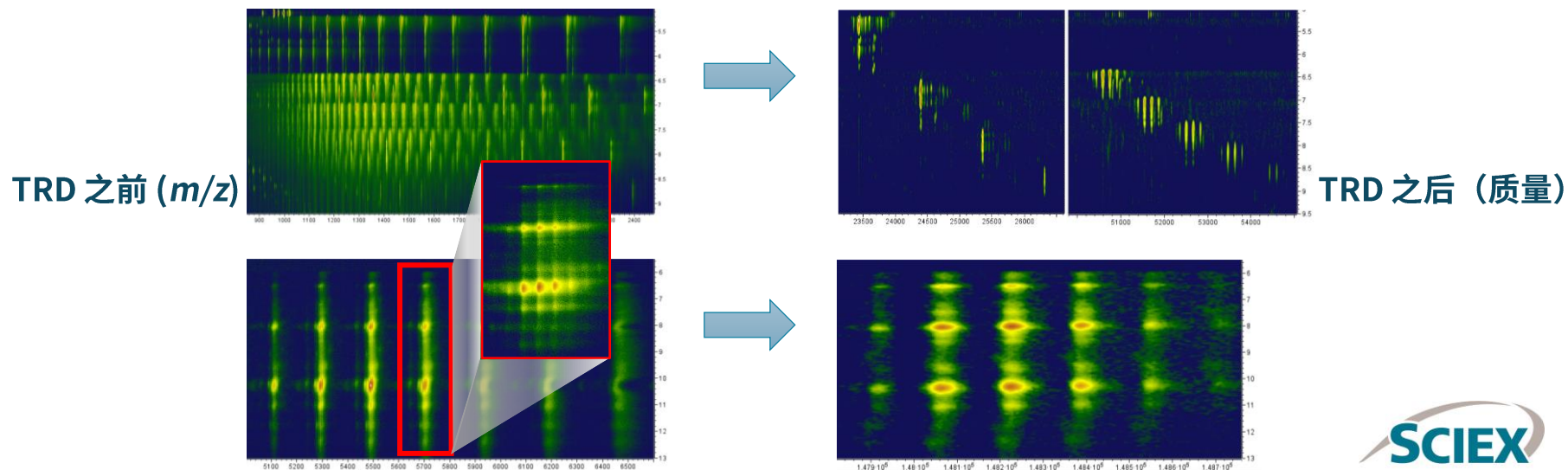
Intact_TimeResolvedDeconvolution_MS 工作流程



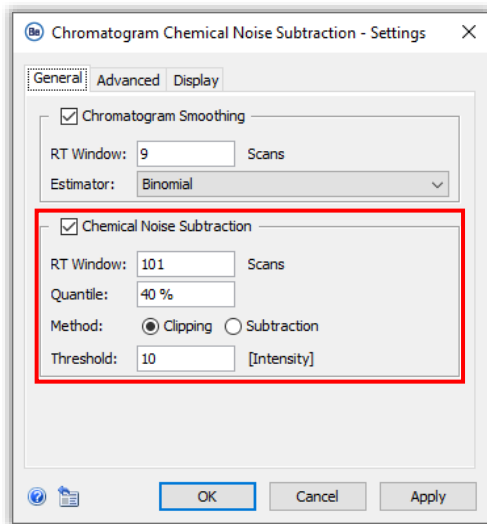
Intact_TimeResolvedDeconvolution_UV+MS 工作流程

TRD 工作流程：概述

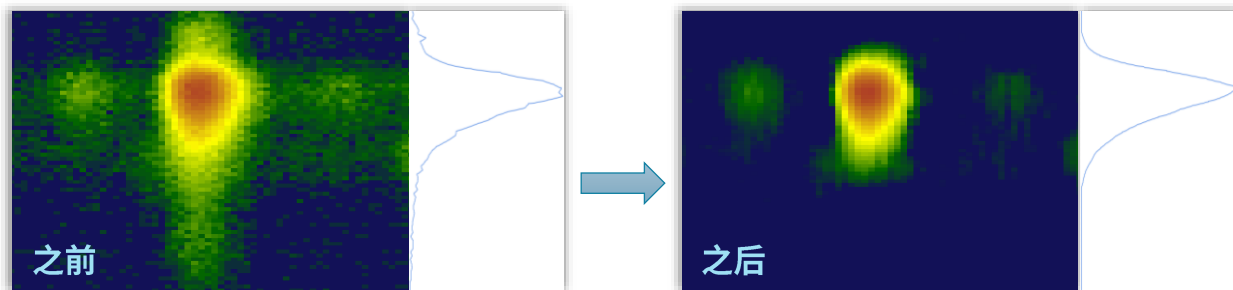
- 在分析具有相似质量和重叠色谱轮廓图的多种成分时，**TRD** 对于进行稳定量化至关重要。
- 在表征已修饰的蛋白形式期间，**TRD** 也会提供深刻的见解，例如提供与氧化、部分还原和加合物相关的峰详细信息。



化学噪声减除：优化



- 将 **Chemical Noise Subtraction** 用于 **TRD** 数据有助于抑制卫星峰并改善峰检测，方法如下：
 - 删除宽峰上的大量拖尾。
 - 降低整体背景噪声。

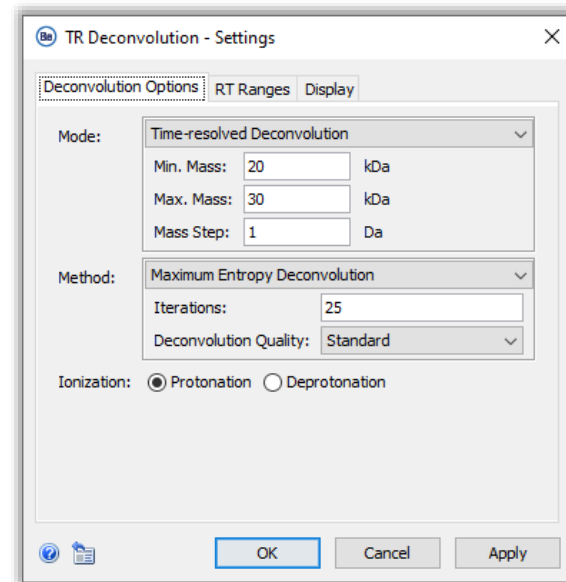


- 设置的典型范围：
 - **RT Window**：约为最大峰扫描次数的 1.3 倍。
 - **Quantile**：40-50%。
- 设置的影响摘要：
 - **RT Window** 越大 = 减除的数据越少。
 - **Quantile** 越高 = 减除的数据越多。

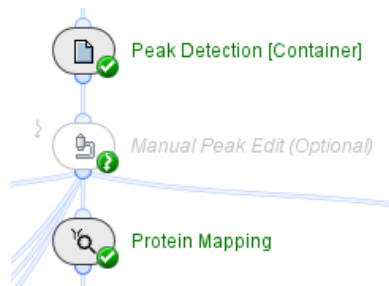
TR Deconvolution: 对数据分析速度的影响

相较于自动去卷积，**TRD** 是一种更耗费计算机资源的算法。

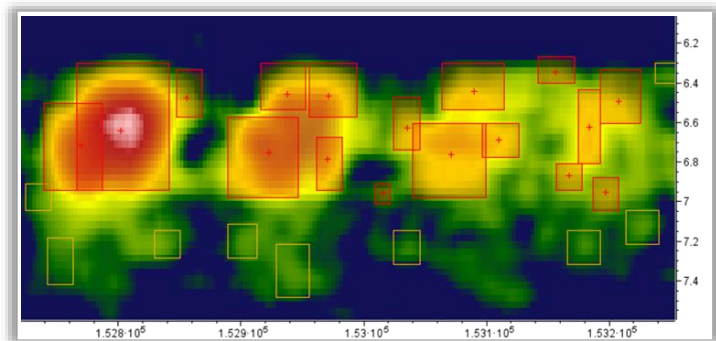
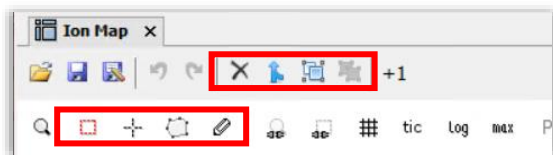
- 去卷积的质量范围和数据密度会对处理时间产生重大影响。
 - 碎片/亚基数据集的数据密度通常高于整个 mAb 数据集。
- 每个数据集的 **Min./Max. Mass** 和 **Mass Step** 应得到优化。
 - 如果适用于特定数据集，则更小的质量范围和更大的质量步长可以减少所需的处理时间。
- 选择 **TRD** 后，**RT Ranges** 选项卡上的设置会被忽略。
 - 为了生成去卷积的离子图，去卷积会发生在整个 RT 范围内。



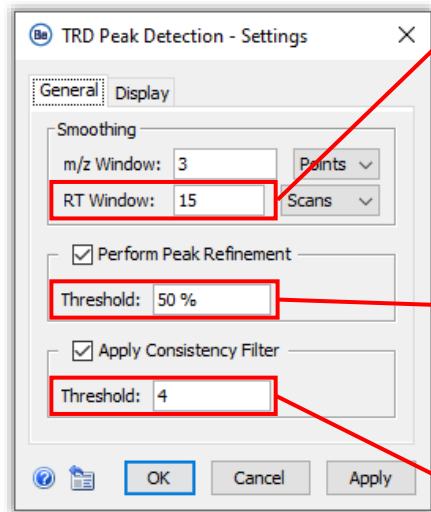
Manual Peak Edit (可选)



- 默认情况下，会跳过此活动。
- 在去卷积离子图中自动检测到的峰可以使用 *Manual Peak Edit* 进行优化，方法如下：
 - 修改峰的边界。
 - 分离重叠峰。
 - 删除峰。
 - 绘制新峰。
- 使用 *Manual Peak Edit* 将重叠成分的强度分布准确地重新分配给各个峰。
 - 这样才能为复杂的分析捕获更多详尽的细节。



TRD Peak Detection: 优化



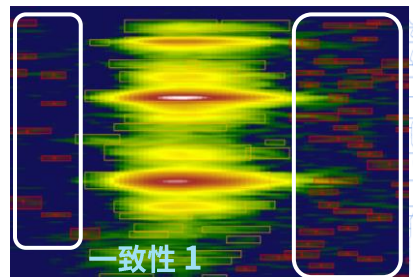
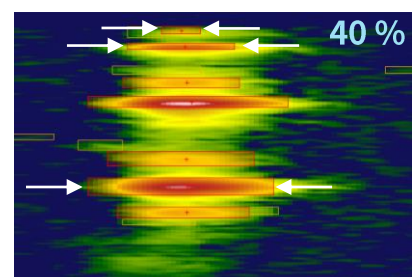
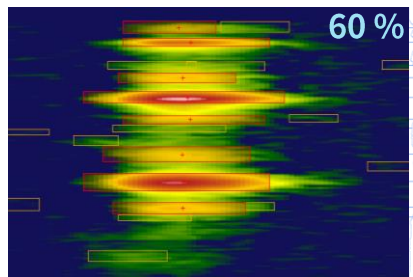
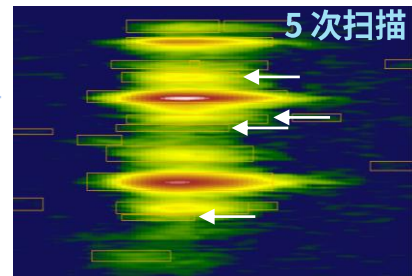
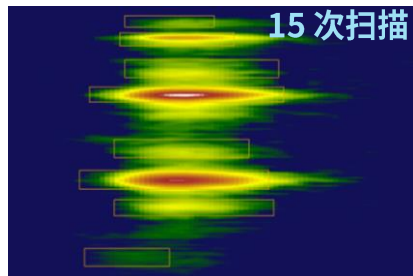
影响沿 RT 分离的峰数量 (↕)。

值越低 = RT 方向分离越多。

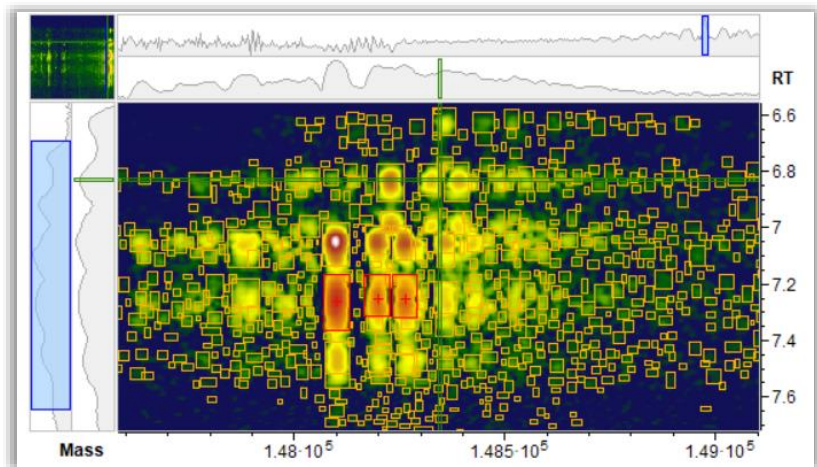
影响沿质量轴的峰数量和峰宽 (↔)。

值越低 = 峰在 m/z 方向分离的可能性越高。

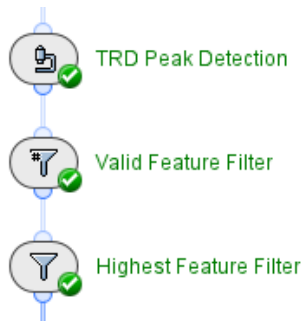
影响灵敏度，背景峰的数量也会因此受到影响。
值越低 = m/z 分离越多。



TRD Peak Detection: 优化

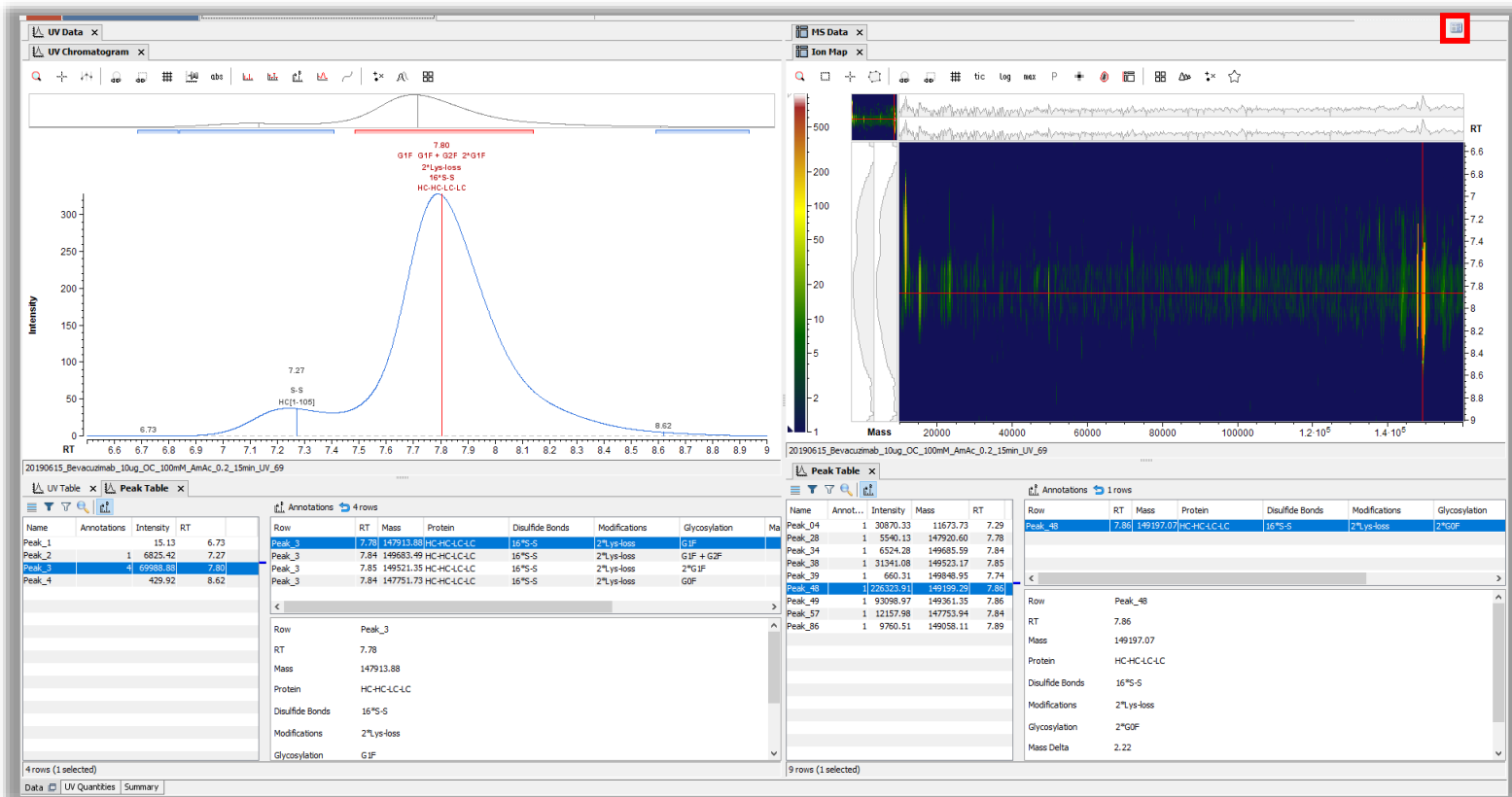


- 如果在复杂的去卷积离子图中检测到多个小特征：
 - 可以通过增加 **Consistency Filter Threshold** (增加到 2 或 3) 降低灵敏度。



- *Valid Feature Filter* 和 *Highest Feature Filter* 活动节点也可用于减少所选特征的数量。

审核含 UV 数据的 TRD 结果的推荐布局



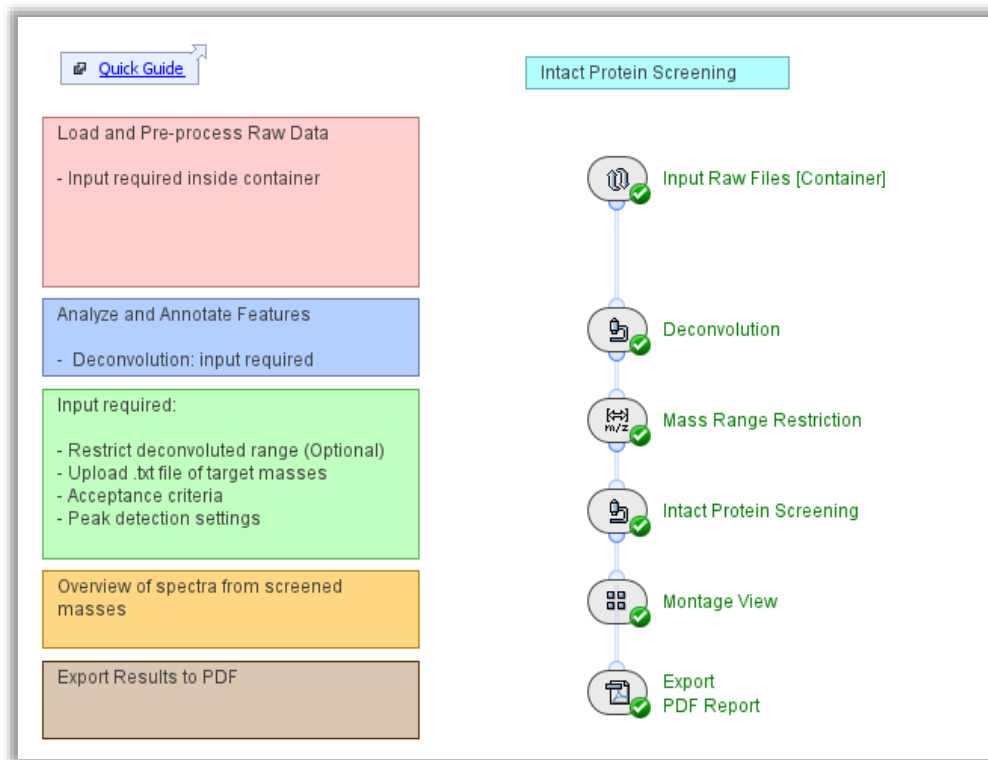
— 收藏的夹布局可以通过布局图标保存和访问。

完整质量筛选

工作流程特定指南



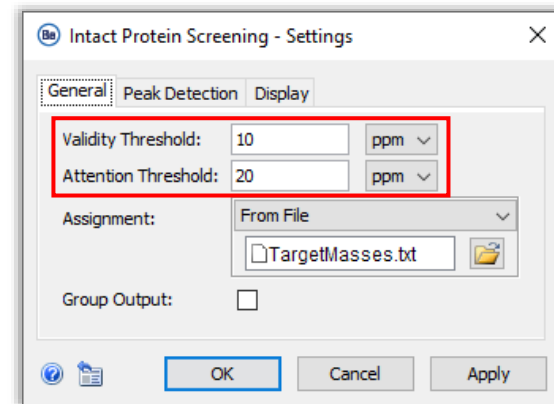
完整质量筛选工作流程：设计



Intact_MassScreening

完整质量筛选工作流程：概述

- 此工作流程可为大批量样本的高通量筛选提供快速去卷积。
- 此流程还可以在质量置信度的指定限值（ppm 或 Da）内验证是否存在目标质量。
- 可视化摘要表将每个样本标识为：
 - 有效 (✓)：计算得到的质量低于 Validity Threshold。
 - 临界 (!!)：计算得到的质量介于 Validity Threshold 和 Attention Threshold 之间。
 - 无效 (✗)：计算得到的质量高于 Attention Threshold。

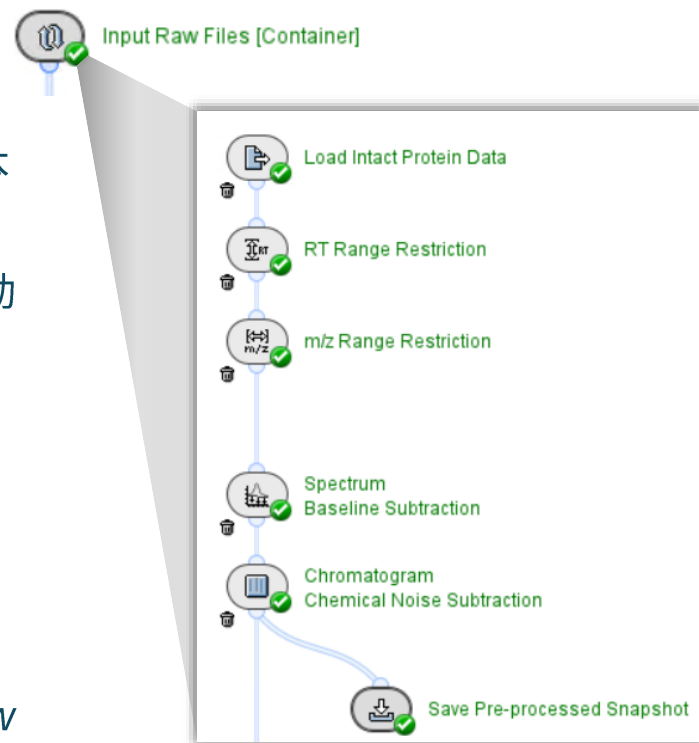


Zoomed Range 3

Name	Expected Mass	Detected Mass	Delta [Da]	Delta [ppm]	Valid
Remicade_IdeS_reduced	25647.51	25647.35	-0.17	-6.0	✓
Rituxan_IdeS_reduced	25328.19	25327.79	-0.41	-16.0	✗
Herceptin_IdeS_TCEP	25383.31	25383.14	-0.16	-6.0	✓
Humira_IdeS_TCEP	25458.33	25457.95	-0.37	-15.0	!!
NIST_500ngOC_IdeS_Red_01	25688.91	25688.72	-0.19	-7.0	✓

完整质量筛选工作流程：概述

- 要减少用于高通量筛选的计算内存，请记住：
 - *Input Raw Files* 容器使用迭代过程对该批次中的每个样本独立进行预处理。
 - **Trash** 在容器中默认激活，所以中间结果被传到后续活动节点后就会被删除。
 - 每个预处理样本的预处理结果都可以被保存为快照 (sbf)，必要时还可以将其用于其他完整质量分析工作流程中，以便开展进一步研究。
- *Montage View* 活动节点可以显示多达 200 个样本。
 - 如果待筛选的样本超过 200 个，则可以绕过 *Montage View* 活动节点。

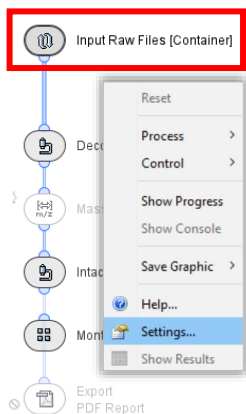


完整质量筛选工作流程：条件和行为

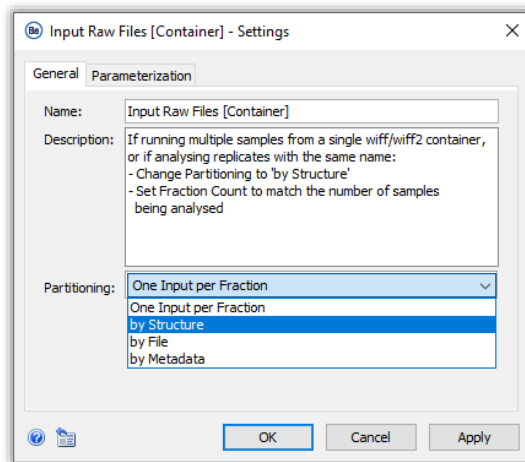
- 用户可为每个样本搜索多个质量，但提交的样本应满足某些条件：
 - 样本必须属于相同的分子类型，例如完整蛋白、亚基或碎片。
 - 样本应具有一致的色谱、相同的成分数量和相似的预期去卷积范围。
 - 样本必须具有相同数量的 **Full** 或 **Zoomed RT Ranges**。
- 该工作流程可执行以下行为：
 - 每个样本的每个去卷积 RT 范围（**Full** 或 **Zoomed RT Range**）中的最高峰会被独立检测，并根据质量列表分配给单个匹配项。
 - 结果不包括标注。
 - 报告检测到的质量值。

Input Raw Files: 分析同名重复样本

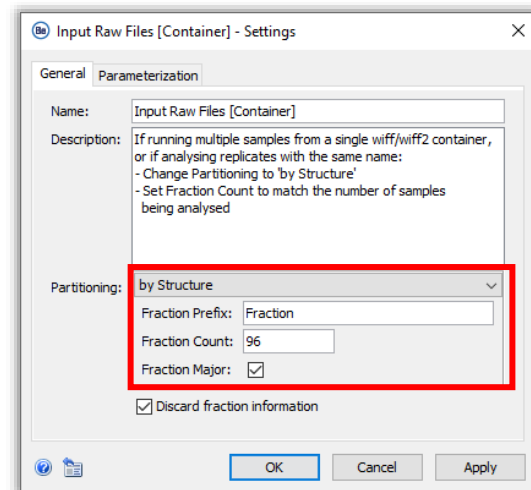
- 为完成以下操作，必须更改 *Input Raw Files* 容器的设置：
 - 分析具有相同文件名的重复样本。
 - 加载单个 wiff 或 wiff2 容器内的多个不同样本。



(1) 右键单击 *Input Raw Files [Container]* 以访问 *Settings*。



(2) 将 **Partitioning** 改为 **by Structure**。



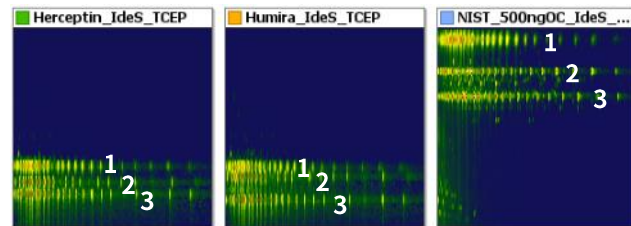
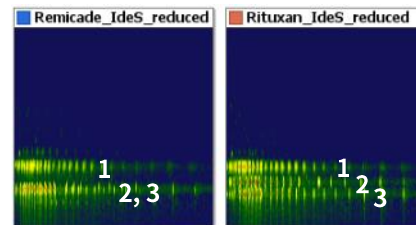
(3) 将已加载的样本数量指定为 **Fraction Count**。

Deconvolution: 复杂数据集的优化

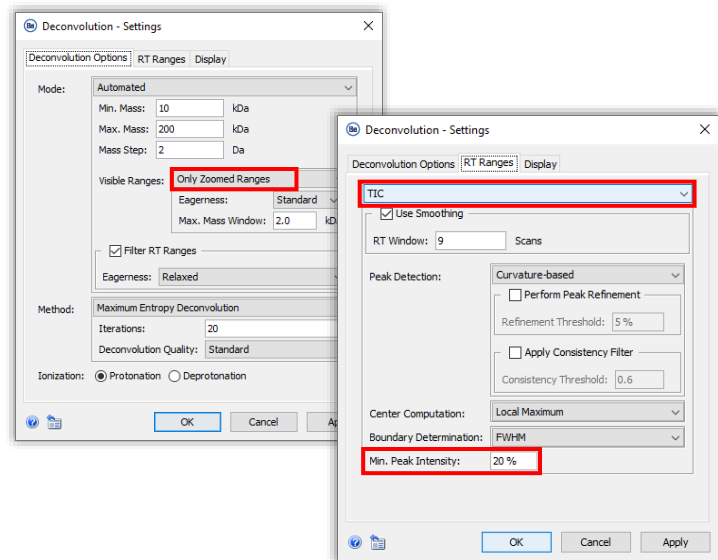


Deconvolution

- 该模板工作流程表示高度复杂的筛选应用：
 - 共有三种来自不同 mAbs 的目标成分（mAb 碎片）。
 - 色谱不一致。
 - Fc/2 糖型具有相似的强度，并且不同样本的强度顺序会发生变化。
 - 数据来自 wiff 和 wiff2 文件。



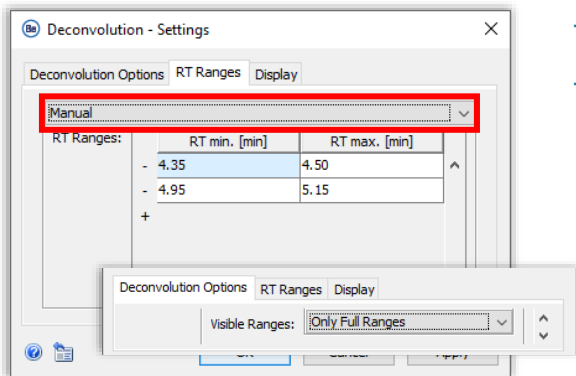
- 要克服此类数据集的潜在挑战，请执行以下操作：
 - 使用 **TIC** 自动确定每个样本的特定 RT 范围。
 - 使用 20%（或更高）的 **Min. Peak Intensity**，将去卷积 RT 范围的数量限制在与目标碎片相关的范围内。
 - 使用 **Only Zoomed Ranges**，因为相同批次的所有已筛选样本的范围预期都相同，前提是它们是相同类型的分子。



Deconvolution: 适用于存在/缺乏 RT 范围的优化



Deconvolution

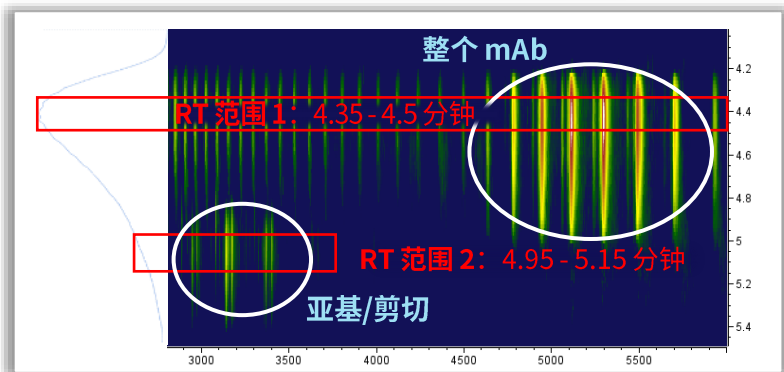


适合筛选工作流程被用于分析以下各项的用例：

- 主要目标成分：整个 mAb（总是预期）。
 - 已知副产物：可能存在或缺乏的错接亚基。
- 使用 **TIC** 确定 RT 范围将导致每个样本的 RT 范围数量可变。这会阻止该筛选工作流程。

如果成分并不总是存在，则 **RT Ranges** 的最佳设置为：

- 使用 **Manual** 模式指定每个成分的 RT 范围（关注洗脱曲线顶点的小 RT 窗口）。
- 将 **Visible Ranges** 设置为 **Only Full Ranges**。
- 只要满足以下条件，便能完成该工作流程：
 - 该样本批次的色谱保持一致。
 - 成分之间出现一些分离。

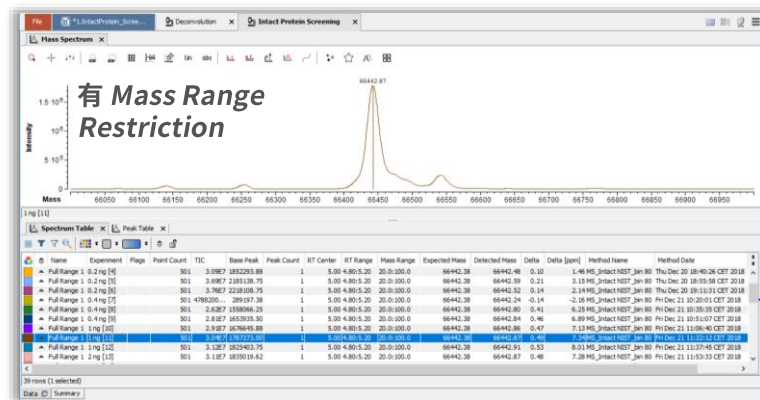
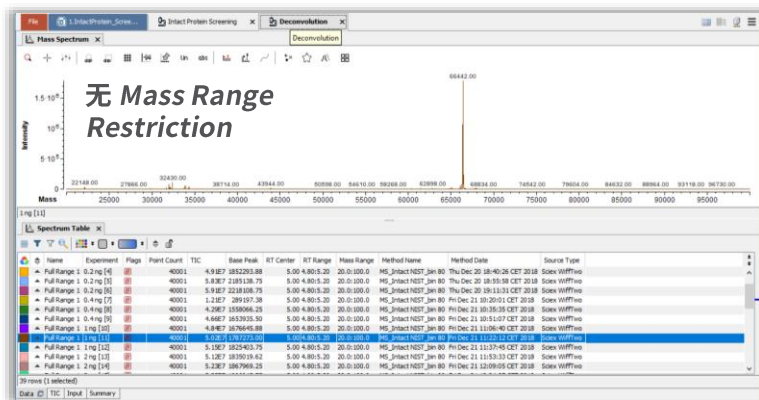


Mass Range Restriction



Mass Range Restriction

- 默认情况下会跳过此活动。
- *Mass Range Restriction* 可用于将去卷积谱图的可视化限制在特定的目标质量。
 - 当使用 **Only Full Ranges** 时，该限制会继续适用。
 - 此活动节点可用作 **Only Zoomed Ranges** 的替代方式。

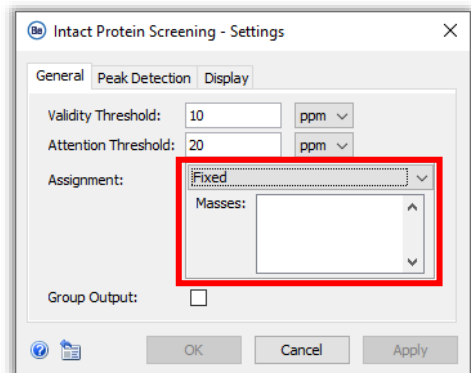


定义 *Intact Protein Screening* 的目标质量

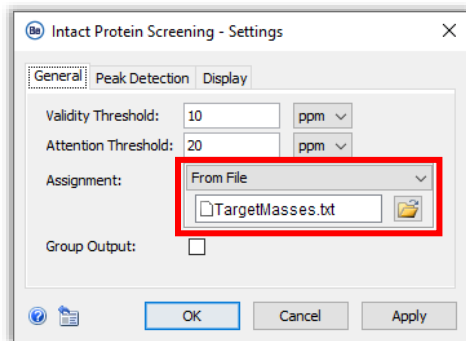


- 指定要筛选的目标质量：

- 如果预计所有样本的质量相同，则将 **Assignment** 更改为 **Fixed**，并在 **Masses** 部分输入相应值。



- 如果预计不同样本的质量不同，则将 **Assignment** 更改为 **From File**，并上传包含每个样本的目标质量的 txt 文件。



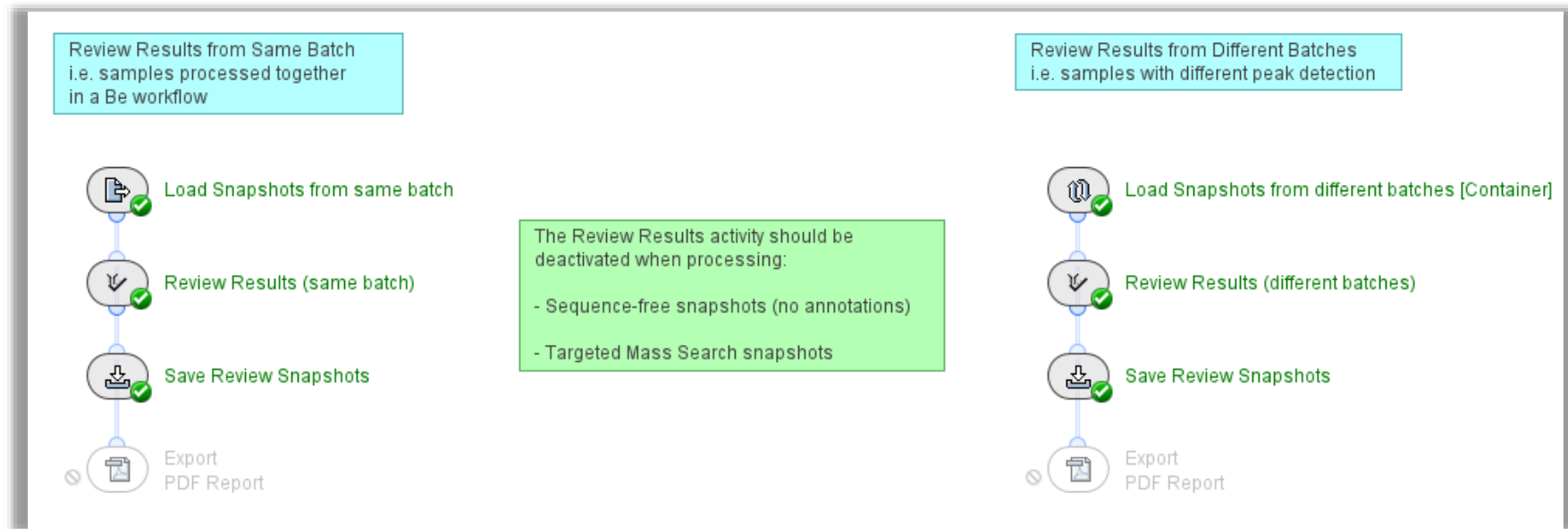
- 无需更改默认的 **Peak Detection** 设置。

审核存储的结果

工作流程特定指南



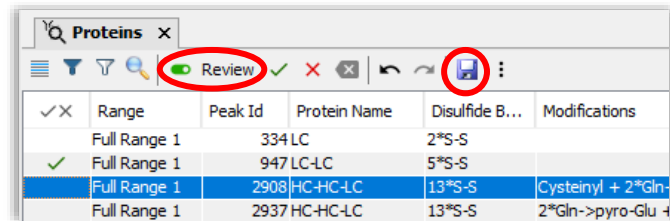
审核存储的结果工作流程：设计



Intact_ReviewSnapshots

审核存储的结果工作流程：概述

- 这些工作流程可以在 Biologics Explorer 软件中打开任何完整质量工作流程保存的所有已储存快照 (sbf)。
 - 使用在相同或不同批次中分析的数据查看以前分析的结果。
 - 完成进一步的审核，并在必要时更改在初始审核流程（仅 *Annotations Snapshots*）已被接受或拒绝的结果。
- 使用 *Sequence-free*、*Targeted Mass Search*、*Individual Data* 和 *Pre-processed Snapshots* 时，跳过 *Review Results* 活动节点。
 - 这些快照不包括 *Review Results* 所需的序列信息。
- 完成进一步审核后，将修改后的 *Annotations Snapshots* 保存为 *Review Snapshots*，或将结果导出为 PDF 报告。



✓ X	Range	Peak Id	Protein Name	Disulfide B...	Modifications
	Full Range 1	334 LC		2*S-S	
✓	Full Range 1	947 LC-LC		5*S-S	
	Full Range 1	2908	HC-HC-LC	13*S-S	Cysteinylyl + 2*Gln-
	Full Range 1	2937	HC-HC-LC	13*S-S	2*Gln->pyro-Glu-

B 部分

工作流程应用

特定应用的优化设置

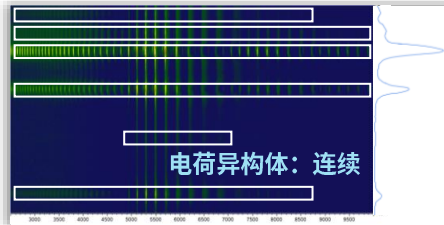
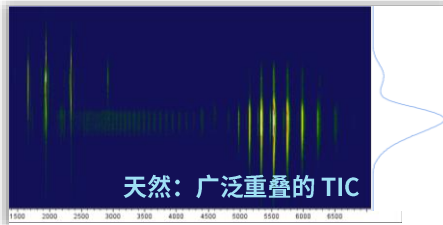
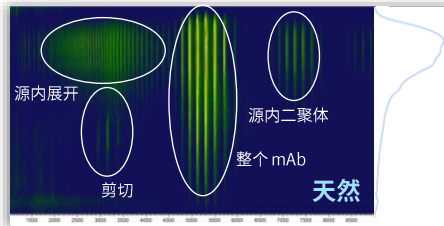
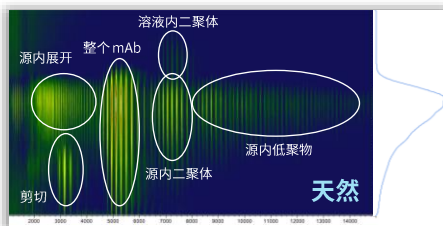
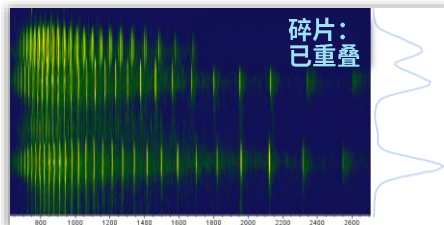
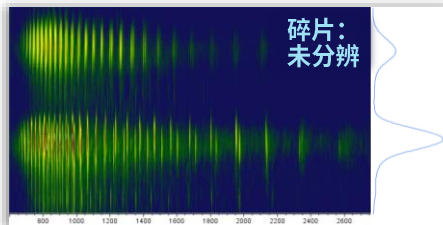


选择时间分辨或自动去卷积

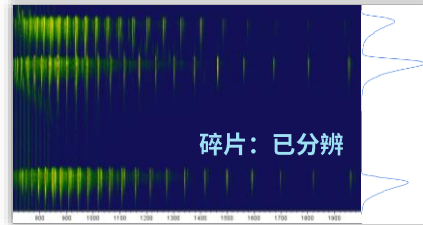
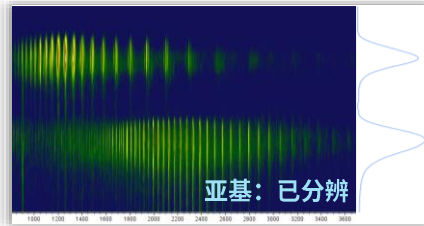
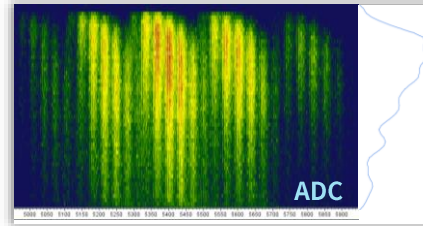
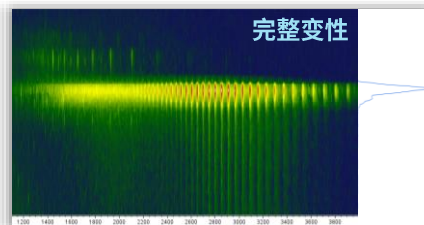
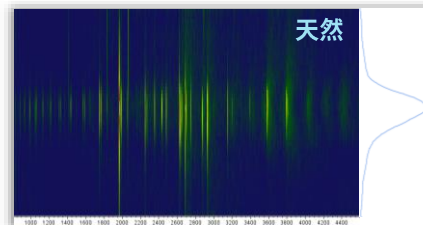
- **Automated:** 去卷积的范围可自动确定。
 - 建议用于色谱分辨良好的粒种。
- **Time-resolved:** 去卷积在 RT 的每次扫描中完成。
 - 建议用于包含分辨欠佳的复杂混合物的数据。
 - 创建去卷积数据的 2D 离子图视图，以便更好地显示重叠或未分辨的峰。
 - 简化重叠或未分辨峰的定量。

时间分辨和自动去卷积的用例

时间分辨去卷积 的关键用例： 复杂的色谱



适合自动去卷积 的关键用例： 简单的色谱



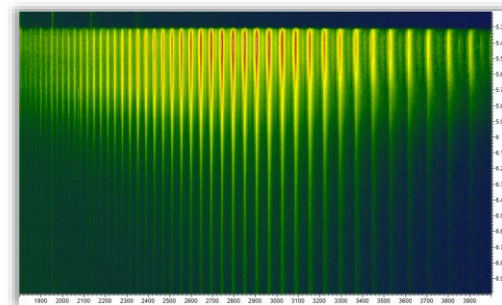
变性完整蛋白

变性蛋白：单一物质

关注：单一目标蛋白。
没有感兴趣的副产物。

建议的初始设置：

样本类型：	单一变性蛋白
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	140 kDa - 160 kDa Visible Ranges: Only Full Ranges 适用于可视化和报告。
Mass step (Da) ¹	2
RT Ranges ¹	RT Window: 5 - 9 (目标是确定单个 RT 范围)。 Isolation Threshold: 5 - 15 (取决于扫描频率)。
Mass Tolerance (ppm) ²	20 - 50 (取决于所用的分辨率)。
Glycosylation ²	包含谱库选项的 Deglycosylated 或 Glycosylated 。
Disulfide ²	State: Fully Connected。 Connectivity: IgG (如适用, 否则请另行说明)。



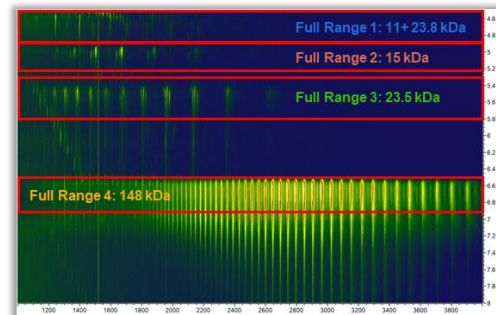
变性完整蛋白

变性蛋白：复杂的样本

关注：所有可见的 RT 范围。
包括低质量的降解产物（未连接的亚基、剪切）。

建议的初始设置：

样本类型：	变性蛋白及其杂质/降解产物
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution Intact_TimeResolvedDeconvolution（用于多个重叠的 RT 范围）
Deconvolution range ¹	10 kDa - 160 kDa Visible Ranges: Only Zoomed Ranges 适用于可视化和报告。
Mass step (Da) ¹	2
RT Ranges ¹ (用 TRD 则忽略)	RT Window: 3 - 5 Isolation Threshold: 3 - 7 Min. Peak Intensity: <1% 也可手动输入所有范围，以获得更高的灵敏度和效率。
Mass Tolerance (ppm) ²	20 - 50（取决于所用的分辨率）。
Glycosylation ²	包含谱库选项的 Deglycosylated 或 Glycosylated。
Disulfide ²	State: Fully Connected。 Connectivity: Unspecified + 3 Additional chains。 CysteinyI 适用于未配对的半胱氨酸。



带有杂质的变性完整蛋白

¹去卷积，²蛋白图谱

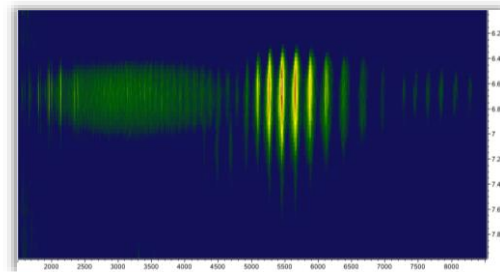
天然的完整蛋白

天然蛋白：单一物质

关注：单一目标蛋白。
没有感兴趣的副产物。

建议的初始设置：

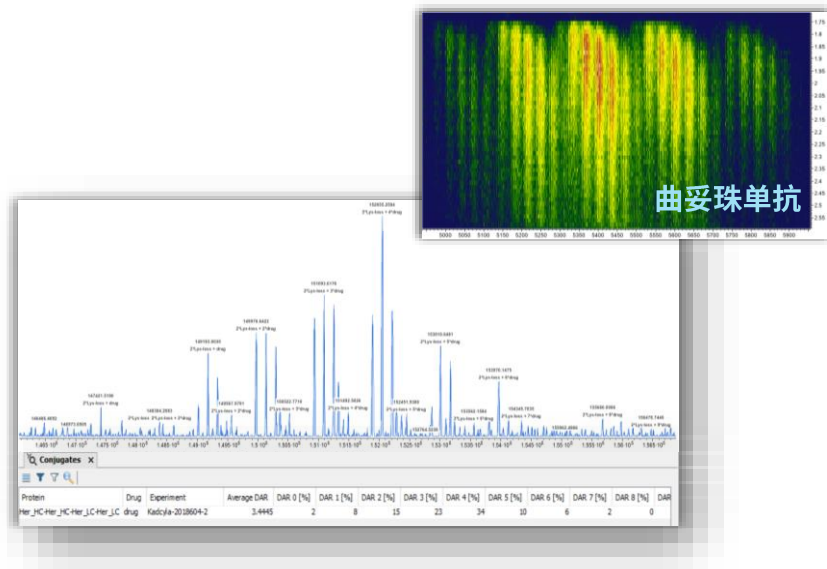
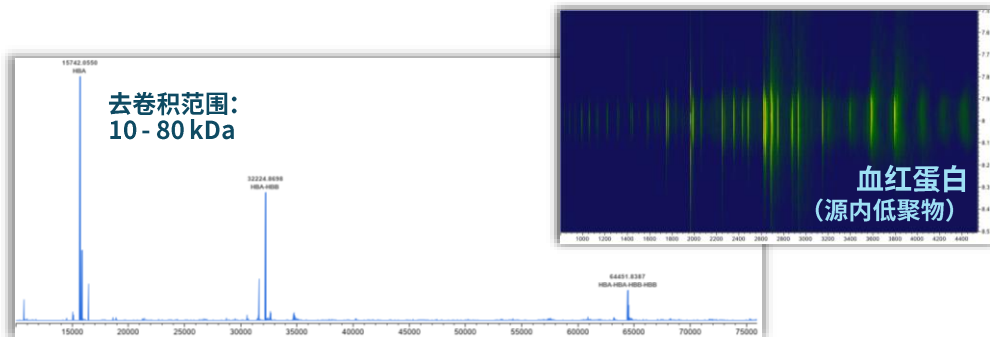
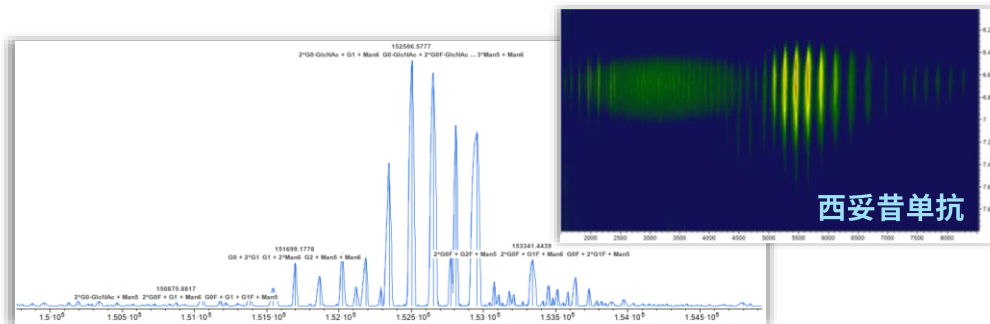
样本类型：	单一天然蛋白
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	140 kDa - 160 kDa Visible Ranges: Only Full Ranges 适用于可视化和报告。
Mass step (Da) ¹	2
RT Ranges ¹	RT Window: 5 - 9 (目标是确定单个 RT 范围)。 Isolation Threshold: 5 - 15 (取决于扫描频率)。
Mass Tolerance (ppm) ²	20 - 50 (取决于所用的分辨率)。
Glycosylation ²	包含谱库选项的 Deglycosylated 或 Glycosylated 。
Disulfide ²	State: Fully Connected。 Connectivity: IgG (如适用, 否则请另行说明)。



天然的完整蛋白

天然蛋白：单一物质

关注：单一目标蛋白。
没有感兴趣的副产物。

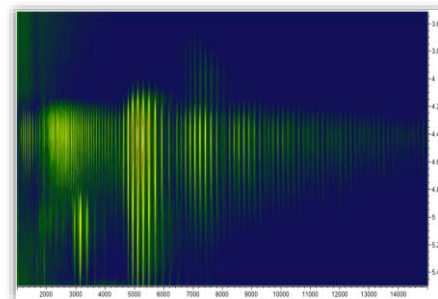


天然蛋白：复杂的样本

关注：所有可见的 RT 范围。
包括低质量的降解产物（未连接的亚基、剪切）。

建议的初始设置：

样本类型：	天然蛋白及其杂质/降解产物
Suggested workflow	Intact_TimeResolvedDeconvolution（用于多个重叠的 RT 范围）。 Intact_AutomatedDeconvolution（如果峰已被分辨。）
Deconvolution range ¹	10 kDa - 160 kDa Visible Ranges: Only Zoomed Ranges 适用于可视化和报告。
Mass step (Da) ¹	2
RT Ranges ¹ (用 TRD 则忽略)	RT Window: 3 - 5 Isolation Threshold: 5 - 15（取决于成分之间的分离情况）。 Min.Peak Intensity: <1% 也可手动输入所有范围，以获得更高的灵敏度和效率。
Mass Tolerance (ppm) ²	20 - 50（取决于所用的分辨率）。
Glycosylation ²	包含谱库选项的 Deglycosylated 或 Glycosylated
Disulfide ²	State: <i>Fully Connected</i> 。 Connectivity: <i>Unspecified + 3 Additional chains</i> 。 CysteinyI 适用于未配对的半胱氨酸。

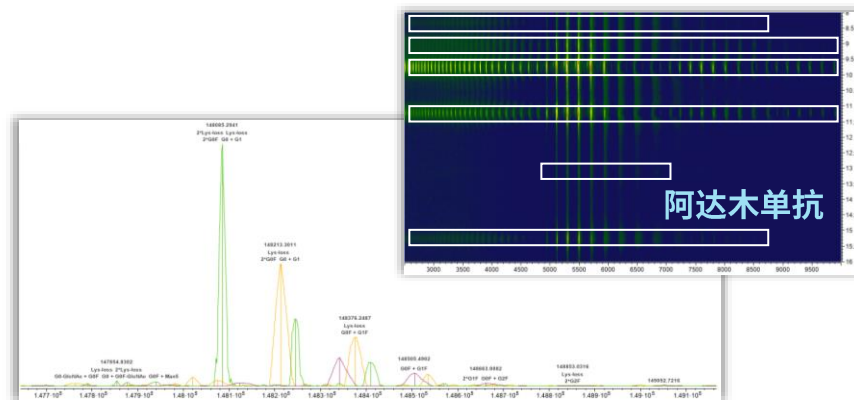
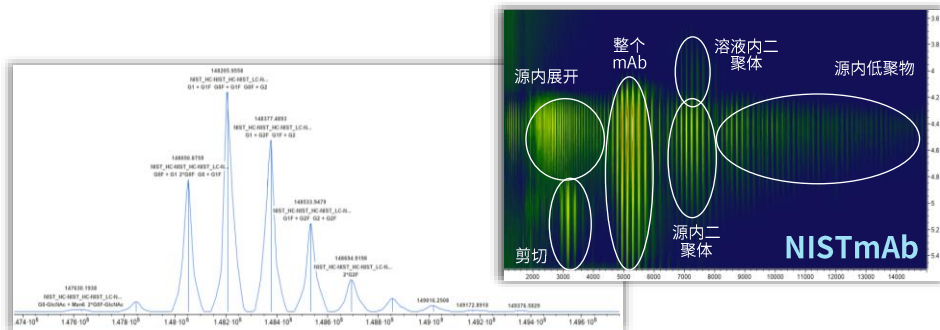
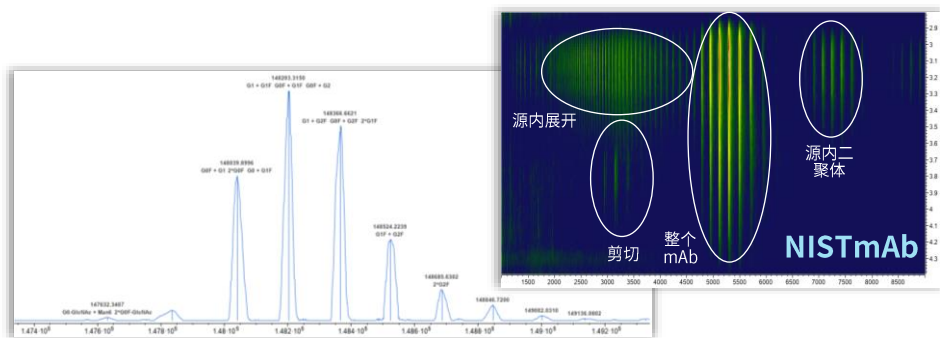


天然的复杂样本

¹去卷积，²蛋白图谱

天然蛋白：复杂的样本

关注：所有可见的 RT 范围。
包括低质量的降解产物（未连接的亚基、剪切）。



抗体药物共轭物

ADC: 全蛋白

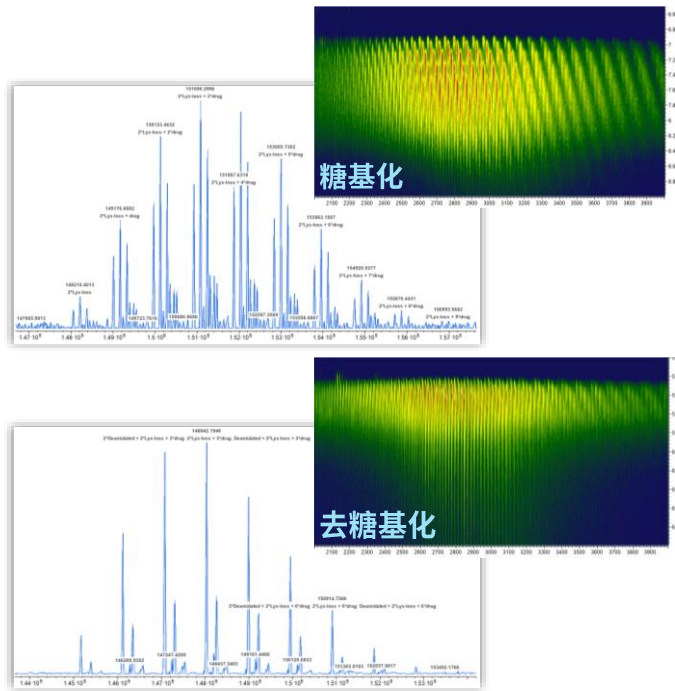
关注: 单一目标蛋白。
没有感兴趣的副产物。

建议的初始设置:

样本类型:	ADC: 变性
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	140 kDa - 160 kDa Visible Ranges: Only Full Ranges 适用于可视化和报告。
Mass step (Da) ¹	2
RT Ranges ¹	手动输入包含所有 ADC 信号的单个 RT 范围。
Mass Tolerance (ppm) ²	20 - 50 (取决于所用的分辨率)。
Glycosylation ²	包含谱库选项的 Deglycosylated 或 Glycosylated 。
Disulfide ²	State: Fully Connected. Connectivity: IgG (如适用, 否则请另行说明)。
Conjugates ²	指定共轭物的名称和质量。
其他注释	<i>Review Results:</i> 删除多余的标注, 以便正确计算 DAR。

¹去卷积, ²蛋白图谱

85



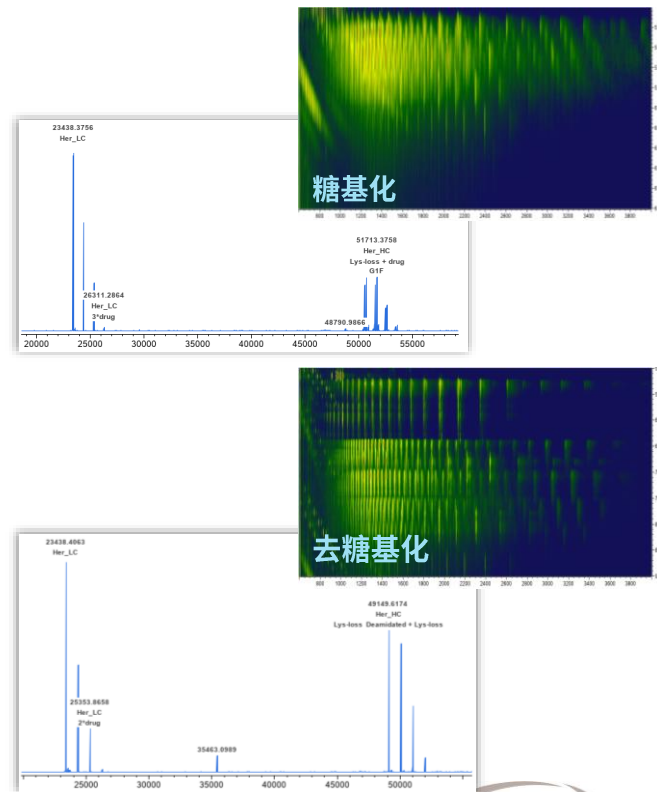
SCIEX
The Power of Precision

ADC: 亚基

关注: 还原的 ADC。

建议的初始设置:

样本类型:	ADC: 变性和还原
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	10 kDa - 60 kDa Visible Ranges: Only Full Ranges 适用于可视化和报告。
Mass step (Da) ¹	1-2
RT Ranges ¹	手动输入包含所有 ADC 信号的单个 RT 范围。
Mass Tolerance (ppm) ²	10 - 20 (取决于所用的分辨率)。
Glycosylation ²	包含谱库选项的 Deglycosylated 或 Glycosylated 。
Disulfide ²	State: Fully Reduced
Conjugates ²	指定共轭物的名称和质量。
其他注释	审核结果: 删除多余的标注, 以便正确计算 DAR



亚基分析

亚基分析

关注：重链和轻链。

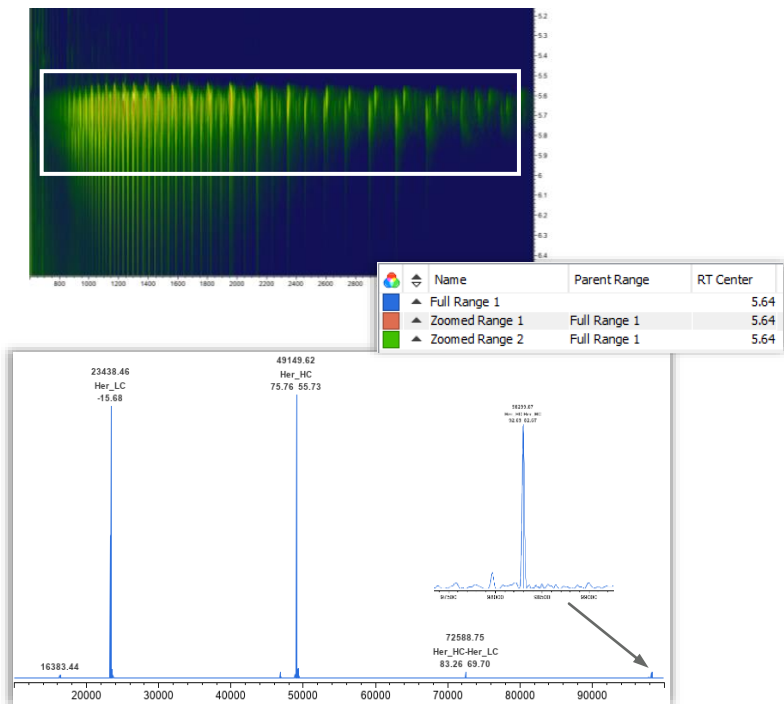
建议的初始设置：

样本类型：	将蛋白还原成 HC 和 LC
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution Intact_TimeResolvedDeconvolution (适合具有复杂修饰的碎片)。
Deconvolution range ¹	20 kDa - 60 kDa 或 20 kDa - 110 kDa 以识别部分连接的亚基。 Visible Ranges: All Ranges , 尤其是当亚基未被分离时。
Mass step (Da) ¹	1-2
RT Ranges ¹ (用 TRD 则忽略)	RT Window: 3 - 9 Isolation Threshold: 3 - 10 (取决于成分之间的分离情况)。 也可手动输入很多高度相邻峰的所有范围。
Mass Tolerance (ppm) ²	10 - 20 (取决于校准精度)。
Glycosylation ²	包含谱库选项的 Deglycosylated 或 Glycosylated 。
Disulfide ²	分离亚基 - State: Fully Reduced . 部分连接的亚基 - State: Partially Reduced, Connectivity: IgG . 可选：搜索还原的链内键。

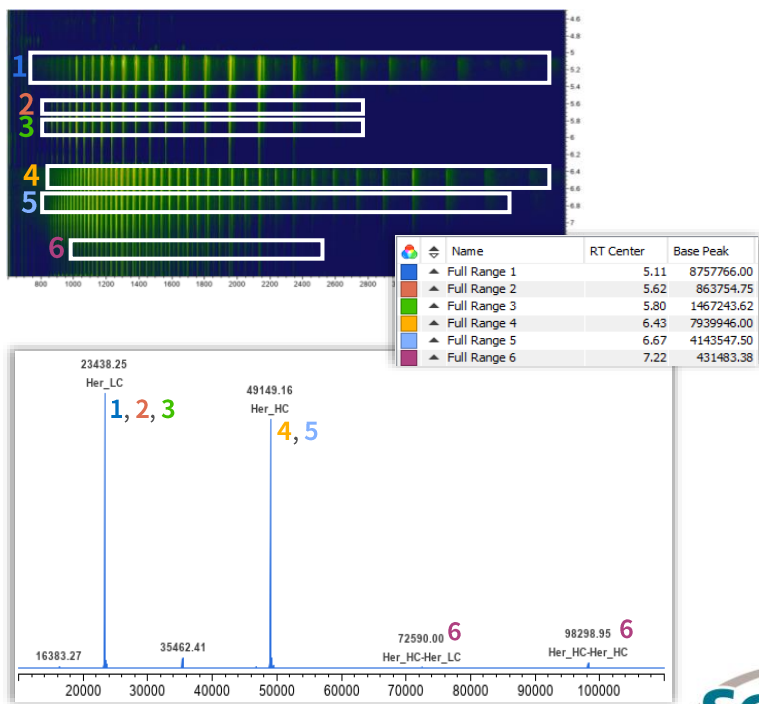
亚基分析

关注：重链和轻链。

完全还原



部分连接



碎片分析

碎片分析

关注： IdeS 消化蛋白，有或没有进一步还原。

建议的初始设置：

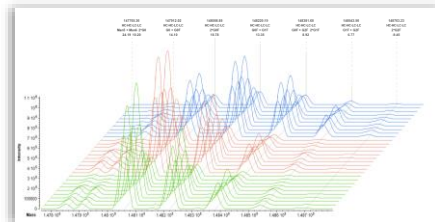
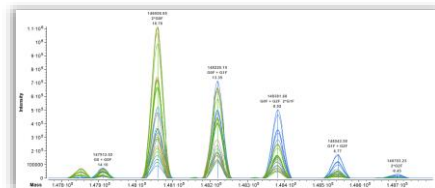
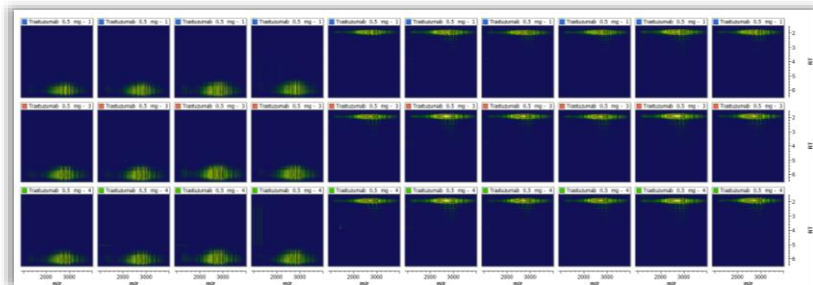
样本类型：	F(ab') ₂ 和 ScFc，或 LC、Fd 和 ScFc
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution Intact_TimeResolvedDeconvolution（适合具有复杂修饰的碎片）。
Deconvolution range¹	20 kDa - 110 kDa 或 20 kDa - 30 kDa，含已还原的碎片 Visible Ranges: Only Zoomed Ranges 或 All Ranges 可改善可视化（即使碎片发生共洗脱）。
Mass step (Da)¹	1-2
RT Ranges¹ (用 TRD 则忽略)	RT Window: 3 - 9 Isolation Threshold: 3 - 10
Mass Tolerance (ppm)²	10 - 20（取决于校准精度）。
Glycosylation²	包含谱库选项的 Deglycosylated 或 Glycosylated 。
Disulfide²	State: Fully Connected. Connectivity: Unspecified + 3 Additional chains. Free Cysteines 适用于未配对的半胱氨酸。 State: Fully Reduced 适用于已还原的碎片。
Sequence	各个碎片序列 (Fc/2、LC 和 Fd') 必须单独列出。

可比性测试 或 稀释系列

可比性测试

建议的初始设置：

样本类型：	全蛋白
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range ¹	140 kDa - 160 kDa Visible Ranges: Only Full Ranges 适用于可视化和报告。
Mass step (Da) ¹	2
RT Ranges ¹	手动输入包含所有目标蛋白信号的单个 RT 范围。
Mass Tolerance (ppm) ²	20 - 50 (取决于所用的分辨率)。
Glycosylation ²	包含谱库选项的 Deglycosylated 或 Glycosylated 。
Disulfide ²	State: Fully Connected. Connectivity: IgG (如适用, 否则请另行说明)。
注释	为了获得一致的峰标注和定量, 请根据已审核结果创建用于 <i>Targeted Mass Search</i> 的谱库。



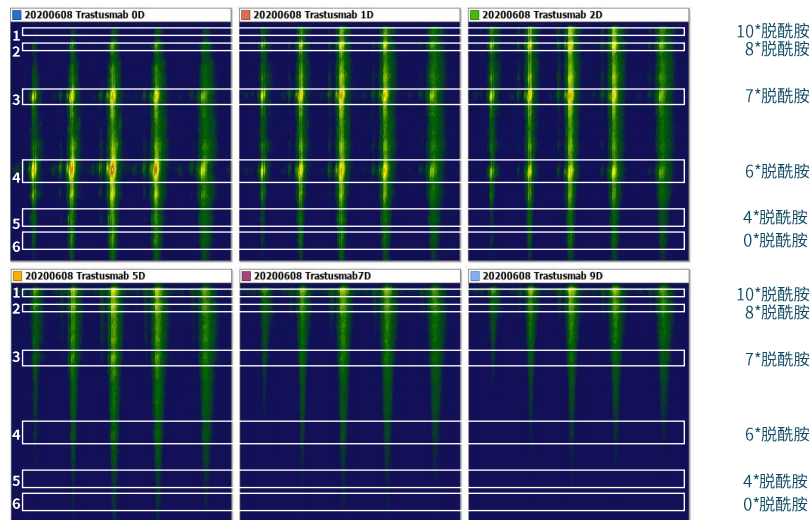
- 参考 mAb
- 生物相似物 1
- 生物相似物 2

压力测试

压力测试

建议的初始设置:

样本类型:	全蛋白
Suggested workflow	Intact_AutomatedDeconvolution
Deconvolution range¹	140 kDa - 160 kDa Visible Ranges: Only Full Ranges 适用于可视化和报告。
Mass step (Da)¹	2
RT Ranges¹	手动输入所有 RT 范围, 以检测所有样本的共有峰并进行有意义的相对定量。
Mass Tolerance (ppm)²	20 - 50 (取决于所用的分辨率)。
Glycosylation²	包含谱库选项的 Deglycosylated 或 Glycosylated 。
Disulfide²	State: Fully Connected. Connectivity: IgG (如适用, 否则请另行说明)。
注释	为了获得一致的峰标注和定量, 请根据已审核结果创建用于 <i>Targeted Mass Search</i> 的谱库。





The Power of Precision

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

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



商标/许可

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

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

© 2022 DH Tech.Dev.Pte.Ltd.RUO-IDV-05-13547-ZH-C