



---

**Explorer**  
per SCIEX OS  
Esercitazione



---

Il presente documento è fornito ai clienti che hanno acquistato le apparecchiature SCIEX come guida per l'uso e il funzionamento di queste ultime. Il presente documento è protetto da copyright e qualsiasi riproduzione, parziale o totale, dei contenuti del presente documento è severamente vietata, salvo il rilascio di un'autorizzazione scritta da parte di SCIEX.

Il software menzionato nel presente documento viene fornito con un contratto di licenza. La copia, le modifiche e la distribuzione del software attraverso qualsiasi mezzo sono vietate dalla legge, salvo diversa indicazione presente nel contratto di licenza. Inoltre, il contratto di licenza può vietare che il software venga disassemblato, sottoposto a ingegneria inversa o decompilato per qualsiasi fine. Le garanzie sono indicate nel presente documento.

Alcune parti di questo documento possono far riferimento a produttori terzi e/o ai loro prodotti, che possono contenere parti i cui nomi siano registrati e/o siano usati come marchi registrati dei rispettivi proprietari. Tali riferimenti mirano unicamente a designare i prodotti di terzi forniti da SCIEX e incorporati nelle sue apparecchiature e non implicano alcun diritto e/o licenza circa l'utilizzo o il permesso concesso a terzi di utilizzare i nomi di tali produttori e/o dei loro prodotti come marchi registrati.

Le garanzie di SCIEX sono limitate alle garanzie espresse fornite al momento della vendita o della licenza dei propri prodotti e costituiscono le uniche ed esclusive dichiarazioni, garanzie e obblighi di SCIEX. SCIEX non concede altre garanzie di nessun tipo, né espresse né implicite, comprese, a titolo esemplificativo, garanzie di commerciabilità o di idoneità per uno scopo particolare, derivanti da leggi o altri atti normativi o dovute a pratiche ed usi commerciali, tutte espressamente escluse, né si assume alcuna responsabilità o passività potenziale, compresi danni indiretti o conseguenti, per qualsiasi utilizzo da parte dell'acquirente o per eventuali circostanze avverse conseguenti.

**Solo per scopi di ricerca.** Non usare nelle procedure diagnostiche.

AB Sciex è sul mercato come SCIEX.

I marchi registrati menzionati nel presente documento sono di proprietà di AB Sciex Pte. Ltd. o dei rispettivi proprietari.

AB SCIEX™ è utilizzato su licenza.

© 2018 AB Sciex



AB Sciex Pte. Ltd.  
Blk 33, #04-06  
Marsiling Ind Estate Road 3  
Woodlands Central Indus. Estate.  
SINGAPORE 739256

# Contenuto

---

<b>1 Introduzione.....</b>	<b>5</b>
Organizzazione.....	5
Opzioni.....	6
Riquadri.....	6
Barra degli strumenti del riquadro generico.....	7
Barra degli strumenti a due riquadri.....	9
Grafici.....	11
Barra degli strumenti specifica del grafico.....	12
Barra degli strumenti specifica dello spettro.....	17
Sovrapposizioni.....	18
Aprire i file.....	19
Aprire un file campione.....	20
Aprire più file campioni.....	21
Cromatogrammi e spettri.....	21
Cromatogramma a corrente ionica totale (TIC).....	22
Spettri.....	22
Cromatogramma ioni estratti (XIC).....	23
Contour Plot e mappe termiche.....	24
<b>2 Lavorare con cromatogrammi e spettri.....</b>	<b>27</b>
Aprire un file di dati.....	27
Mostrare il TIC per One Experiment.....	29
Mostrare un XIC per una formula molecolare nota.....	30
Creare e interagire con uno spettro.....	34
Utilizzo di un Contour Plot.....	40
Riepilogo.....	43
<b>3 Lavorare con IDA Explorer.....</b>	<b>45</b>
Mostrare e unire spettri.....	45
Filtrare dati IDA.....	50
Utilizzare uno spettro di riferimento.....	51
Riepilogo.....	52
<b>4 Lavorare con Strumenti di struttura.....</b>	<b>53</b>
Collegare una struttura a uno spettro MS/MS.....	53
Lavorare con i frammenti.....	56
Aggiungere sottostrutture a uno spettro.....	61
Lavorare con spettri MS/MS correlati.....	62
Riepilogo.....	65
<b>5 Lavorare con campioni multipli.....</b>	<b>66</b>
Lavorare con due campioni.....	66
Lavorare con più di due campioni.....	72
Riepilogo.....	79

## Contenuto

---

<b>6 Lavorare con la funzione Bio Tool Kit.....</b>	<b>80</b>
Sequenza manuale.....	80
Ordine manuale collegato con frammenti peptidi.....	86
Aggiungere e rimuovere i punti chiave ricostruiti manualmente.....	90
Proteina digerita.....	93
Barra degli strumenti.....	93
Digestione teorica della proteina.....	95
Ricostruzione peptide cromatografia liquida a spettrometria di massa (LCMS).....	99
Barra degli strumenti.....	103
Ricostruzione peptide LCMS con proteina digerita.....	105
Ricostruire la proteina.....	106
Riepilogo.....	110

Questo documento fornisce una panoramica delle esercitazioni relative ad alcuni degli strumenti e delle funzionalità disponibili nel software. Ciò non fornisce una descrizione dettagliata di ogni operazione disponibile, ma spiega alcuni dei più comuni flussi di lavoro che il software può seguire.

## Organizzazione

Mentre alcune funzioni e operazioni sono specifiche per alcuni flussi di lavoro e applicazioni, per la maggior parte sono generiche e sono utilizzate frequentemente quando si esplorano dati qualitativi. Questa sezione del documento fornisce una breve introduzione ai concetti del software e una descrizione di alcune delle operazioni più comuni ed essenziali. Le sezioni successive descrivono approcci a specifici flussi di lavoro e utilizzano i file di dati campione forniti con il software.

I file campione sono distribuiti sul DVD SCIEX OS, nella cartella Extras/Example Project. Copiare l'intero progetto nella cartella D:\SCIEX OS DATA sul computer. Negli esempi di questa esercitazione vengono usati i seguenti file campione:

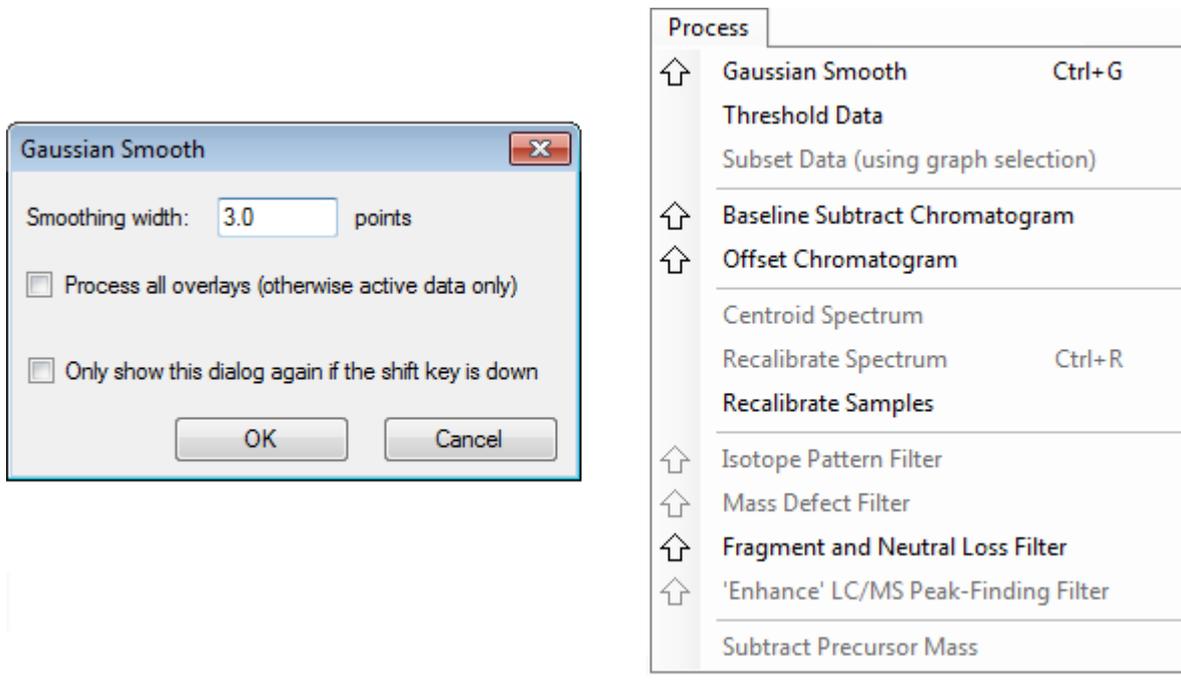
- Bromocrip\_IDA-DBS alone\_T=1.wiff
- Bromocrip\_IDA-DBS in plasma\_T=0.wiff
- Bromocrip\_IDA-DBS in plasma\_T=1.wiff
- DataSET61.wiff
- DataSET62.wiff
- DataSET63.wiff
- DataSET64.wiff
- DataSET65.wiff
- DataSET66.wiff
- RP\_digests.wiff
- RP\_Intact.wiff
- Bromocriptine.mol

I file Bromocriptine provengono da analisi IDA in modalità negativa di un'incubazione con microsomi di fegato di ratto. Bromocrip\_IDA-DBS alone\_T=1.wiff è stato ottenuto dal punto temporale di un'ora, mentre gli altri due sono per i punti temporali zero e un'ora addizionati nel plasma. Il file Bromocriptine.mol contiene la struttura molecolare per Bromocriptina. Da DataSET61 a DataSET66 sono file raccolti da Loratadina e dalle sue impurità. I diversi set di dati rappresentano diversi livelli di concentrazione. Il file RP\_Intact.wiff deriva dall'analisi della mioglobina intatta. Il file RP\_digests.wiff deriva dall'analisi di mioglobina digerita tripticamente.

## Opzioni

Il software fornisce molte opzioni per regolare in maniera fine il funzionamento dei comandi. Alcuni, come mostrato in [Figura 1-1](#), forniscono una casella di controllo che consente di visualizzare la finestra di dialogo solo se si preme il tasto **Maiusc**. Si elimina, così, la necessità di interagire con la finestra di dialogo se non sono necessarie modifiche ai parametri. Il menu per questi comandi contiene una freccia con la punta in alto.

**Figura 1-1** Opzioni



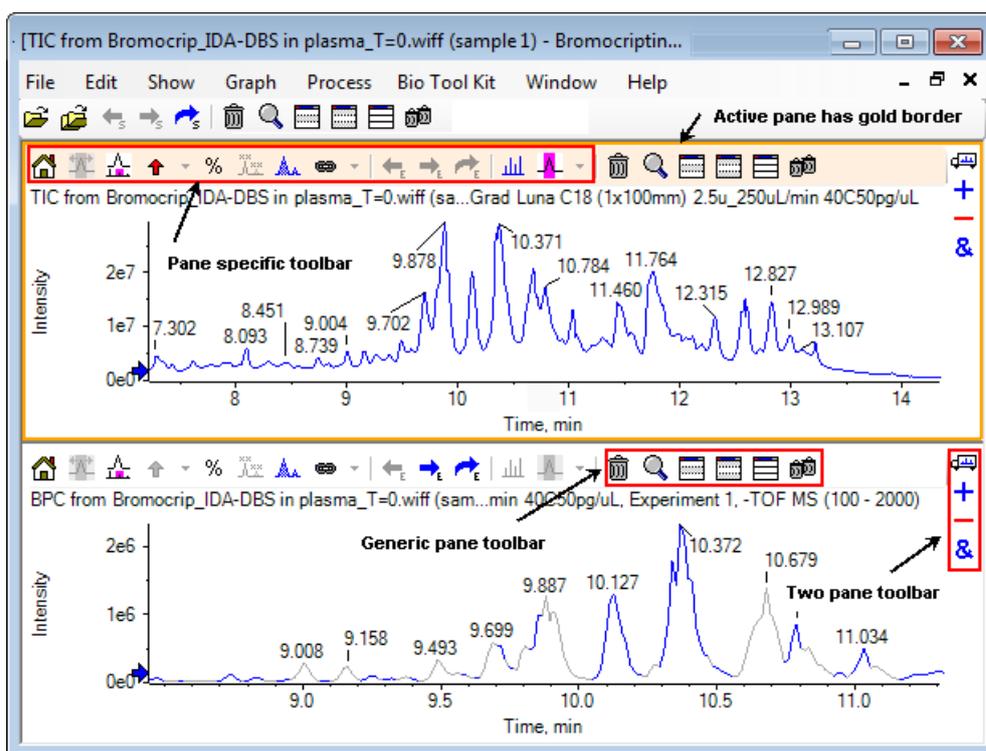
## Riquadri

Mentre il software utilizza le finestre per mostrare e ricevere informazioni, il componente dell'interfaccia utente di base è un riquadro. Una finestra può contenere uno o più riquadri, ma può essere attivato solo un riquadro alla volta. I riquadri ricevono i comandi dai menu e dalle barre degli strumenti. I menu e le barre degli strumenti forniscono i modi per manipolare i riquadri o i dati contenuti in essi.

I riquadri possono contenere dei grafici come spettri e cromatogrammi, mappe termiche o tabelle, così come viste più specializzate. Le tipiche operazioni di elaborazione creano dei riquadri per visualizzare le informazioni o per lavorare sui dati riportati all'interno di un riquadro. Ogni riquadro contiene strumenti generici a singolo e doppio riquadro. La maggior parte dei riquadri sono strumenti aggiuntivi che sono specifici per il tipo di riquadro. Gli strumenti aggiuntivi consentono di accedere ai comandi più comuni.

Un esempio di una finestra comune è mostrato nella [Figura 1-2](#). La finestra contiene due riquadri, con il riquadro attivo, il cromatogramma, identificato dal bordo colorato e la barra degli strumenti.

Figura 1-2 Esempio di riquadri all'interno di una finestra



Le operazioni comuni del riquadro sono riassunte in [Barra degli strumenti del riquadro generico](#) e in [Barra degli strumenti a due riquadri](#). Le operazioni specifiche del riquadro sono riassunte in [Grafici](#).

## Barra degli strumenti del riquadro generico



Fare clic su un'icona per utilizzare le operazioni generiche a riquadro singolo.

Tabella 1-1 Icone della barra degli strumenti del riquadro generico

Icona	Nome (Suggerimento)
	Elimina questo riquadro
	Espande il riquadro attivo per riempire la finestra
	Nasconde questo riquadro
	Nasconde tutti gli altri riquadri
	Mostra tutti i riquadri attualmente nascosti
	Elimina tutti gli altri riquadri (tenere premuto il tasto Ctrl per eliminare solo i riquadri dopo questo)

## Introduzione

---

**Nota:** Icone simili sono disponibili anche nella barra degli strumenti principale, che si trova appena sotto la barra dei menu. Facendo clic su una delle icone nella barra degli strumenti principale si ha lo stesso risultato nel riquadro attivo di quando si fa clic sull'icona nel riquadro attivo. Questa barra degli strumenti può essere utile se il riquadro attivo è stato ridimensionato e alcune icone non sono visibili.

---

### Elimina questo riquadro

In presenza di più riquadri aperti, utilizzare questa icona per eliminare il riquadro corrispondente. Se è aperto un solo riquadro, l'icona non è disponibile.

### Espande il riquadro attivo per riempire la finestra

Utilizzare questa icona per espandere il riquadro per riempire l'intera finestra o per far tornare il riquadro alla dimensione originale. Se la finestra contiene più riquadri, questa icona si concentra momentaneamente su uno di essi.

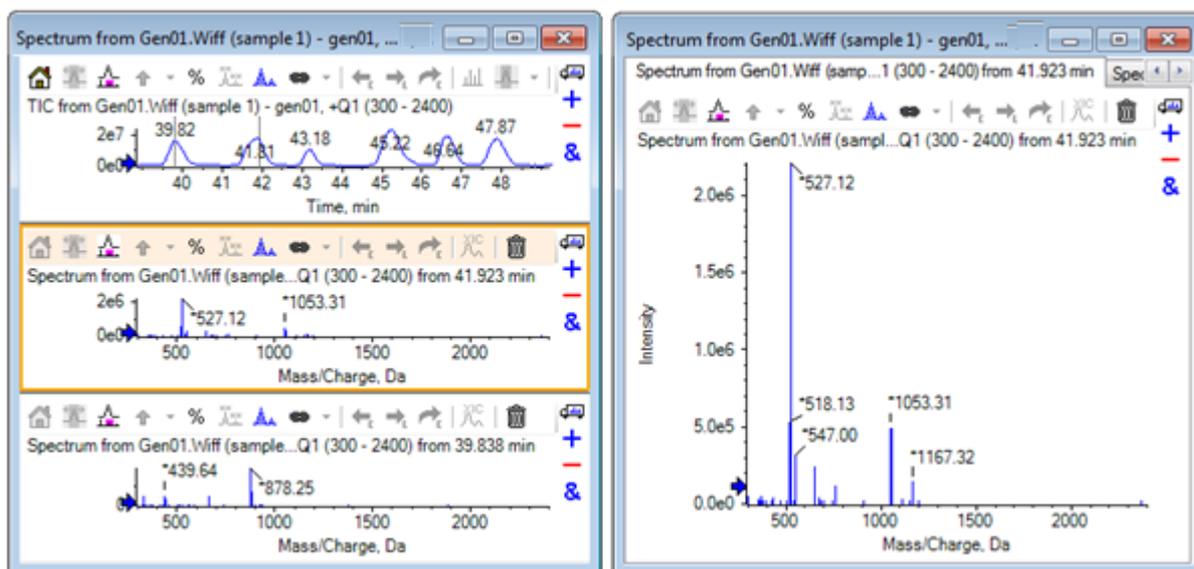
Nella finestra in alto di ogni riquadro viene visualizzata una scheda separata. Fare clic sulla scheda appropriata per passare da un riquadro all'altro.

---

**Nota:** Se i titoli dei riquadri sono lunghi, tutte le schede potrebbero non essere visibili. Utilizzare i pulsanti freccia a destra delle schede per scorrerle. Fare clic ancora sull'icona per tornare alla visualizzazione originale, mostrando tutti i riquadri.

---

Figura 1-3 Esempio di riquadro allargato



### Nasconde questo riquadro

Utilizzare questa icona per nascondere il riquadro corrispondente in modo che gli altri riquadri nella finestra riempiano lo spazio disponibile. Questa icona è utile se si desidera visualizzare un sottoinsieme dei riquadri, ma non si desidera eliminare permanentemente gli altri riquadri.

---

## Nasconde tutti gli altri riquadri

Utilizzare questa icona per nascondere tutti i riquadri tranne il riquadro corrispondente. Il risultato è qualcosa di simile a quando si fa clic sull'icona **Espande il riquadro attivo per riempire la finestra**, perché in entrambi i casi rimane solo il riquadro corrispondente e riempie lo spazio disponibile. La differenza è evidente quando successivamente viene creato un altro riquadro. Nel caso del riquadro ingrandito, il nuovo riquadro diventa attivo e riempie lo spazio disponibile. Nel caso di riquadri nascosti, i due riquadri (il riquadro attivo originale e il nuovo riquadro) sono entrambi visibili.

## Mostra tutti i riquadri attualmente nascosti

Utilizzare questa icona per mostrare tutti i riquadri che sono stati nascosti.

## Elimina tutti gli altri riquadri

Se non si tiene premuto il tasto Ctrl, questa icona elimina tutti i riquadri nella finestra, a eccezione del riquadro corrispondente. Questa opzione è utile per pulire e avviare una nuova analisi del campione. Verranno cancellati anche tutti i riquadri correntemente nascosti.

Se si tiene premuto il tasto Ctrl, verranno eliminati solo i riquadri che si trovano dopo il riquadro corrispondente. Questa opzione è utile nel caso in cui ci siano molti riquadri aperti e solo un certo numero di quelli iniziali è necessario. In questo caso i riquadri nascosti non verranno eliminati.

## Barra degli strumenti a due riquadri



Trascinare l'icona per utilizzare le operazioni a due riquadri (la disponibilità dipende dal tipo di riquadro). Il riquadro d'origine è quello che contiene l'icona selezionata, mentre il secondo è il riquadro di destinazione.

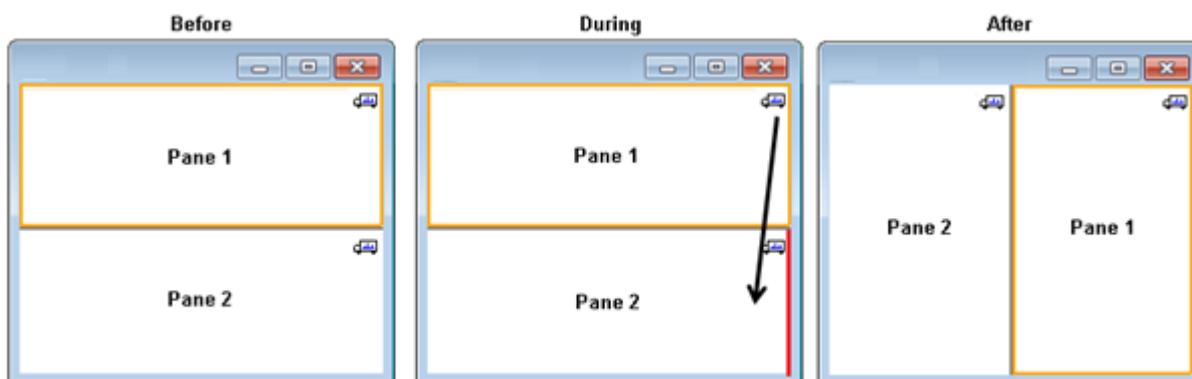
**Tabella 1-2** Icone della barra degli strumenti a due riquadri

Icona	Nome (Suggerimento)
	Trascinare la selezione per riorganizzare i riquadri.
<b>+</b>	Trascinare in un altro grafico per aggiungere i dati attivi ai dati attivi dell'altro grafico. (Tenere premuto il tasto Ctrl per aggiungere i dati attivi a tutti i set di dati dell'altro grafico.)
<b>-</b>	Trascinare in un altro grafico per sottrarre i dati attivi da quelli attivi del grafico di destinazione. (Tenere premuto il tasto Ctrl per sottrarre da tutti i set di dati della destinazione. Tenere premuto il tasto Maiusc per mantenere i valori negativi.)
<b>&amp;</b>	Trascinare in un altro grafico per sovrapporre i dati attivi nel grafico di destinazione. (Tenere premuto il tasto Ctrl per sovrapporre tutti i set di dati, non solo quelli attivi.)

### Trascinare la selezione per riorganizzare i riquadri

Questa icona è mostrata nell'angolo in alto a destra di ogni riquadro ed è utilizzata per cambiare le relative posizioni dei riquadri. Fare clic sull'icona in un riquadro e poi trascinarlo nella parte superiore, inferiore, sinistra o destra di un secondo riquadro. A seconda del punto in cui viene rilasciato il mouse, il primo riquadro cambia le posizioni rispetto al secondo. Mentre si trascina il cursore, un lato del secondo riquadro viene evidenziato in rosso per indicare il punto in cui viene posizionato il primo riquadro. La [Figura 1-4](#) mostra il risultato del trascinamento di questa icona dal riquadro superiore alla parte destra del riquadro inferiore.

**Figura 1-4 Risultato del trascinamento dell'icona dal riquadro superiore alla parte destra del riquadro inferiore.**



---

**Nota:** È possibile trascinare i riquadri da una finestra all'altra.

---

### Trascinare in un altro grafico per aggiungere i dati attivi ai dati attivi dell'altro grafico

Utilizzare questa icona per sommare due set di dati insieme, punto per punto. I dati sorgente (del riquadro sul quale è stato fatto clic in origine) sono aggiunti ai dati di destinazione (il riquadro sopra il quale viene rilasciata l'icona). Il titolo dei dati che si modificano si aggiorna per indicare che è stato modificato.

---

**Nota:** È possibile solo aggiungere due set di dati dello stesso tipo insieme. Ad esempio, non è possibile aggiungere uno spettro a un cromatogramma.

---

**Nota:** Se il grafico di destinazione contiene più di una traccia sovrapposta, come impostazione predefinita i dati di origine sono aggiunti solo ai dati di destinazione attivi. Se si preme il tasto Ctrl, è aggiunta l'origine a tutti i set di dati di destinazione.

---

### Trascinare in un altro grafico per sottrarre i dati attivi da quelli attivi del grafico di destinazione

Utilizzare questa icona per sottrarre i dati di origine dai dati di destinazione. Questa icona è molto utile per sottrarre il fondo di uno spettro di massa.

---

**Nota:** Se il grafico di destinazione contiene più di una traccia sovrapposta, allora, come da impostazione predefinita, i dati di origine vengono sottratti solo dai dati di destinazione attivi. Tenere premuto il tasto Ctrl per sottrarre l'origine da tutto l'insieme di dati di destinazione.

---

**Suggerimento!** Normalmente, i dati per i quali l'intensità nell'origine è maggiore di quella di destinazione non vengono conservati. Ciò significa che i valori negativi y vengono scartati. Se si preme il tasto Maiusc, si conservano i punti con intensità negativa.

---

### Trascinare in un altro grafico per sovrapporre i dati attivi nel grafico di destinazione

Utilizzare questa icona per sovrapporre i dati attivi nel grafico di origine sul grafico di destinazione. Dopo il completamento dell'operazione, il grafico di destinazione conterrà una nuova serie con una copia dei dati di destinazione.

---

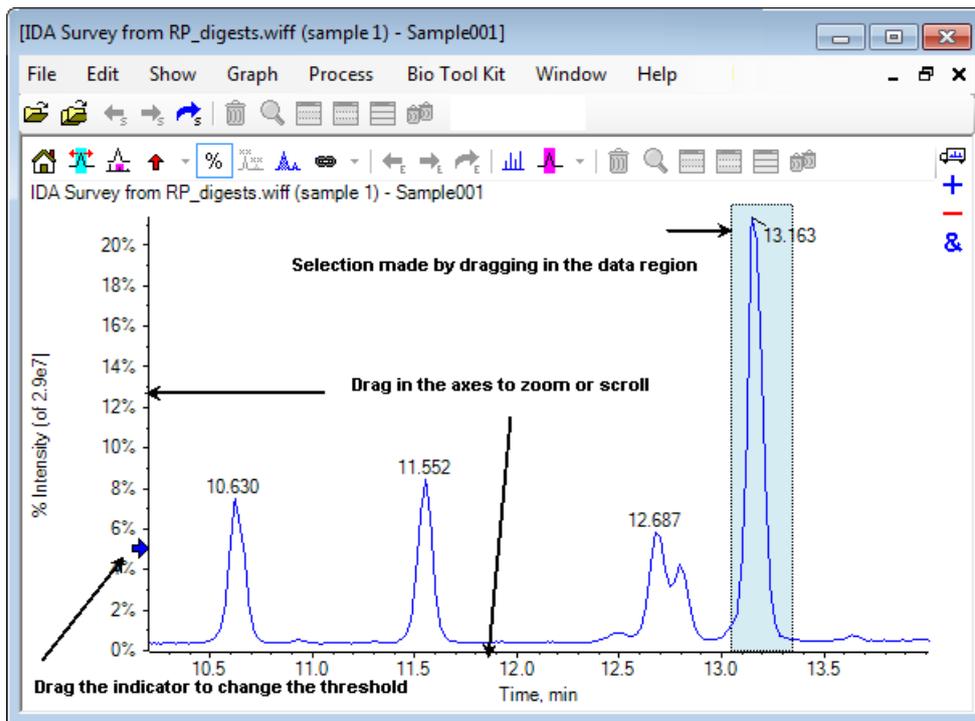
**Nota:** Se il grafico di origine contiene più di una traccia sovrapposta, come impostazione predefinita solo una copia dei suoi dati attivi verrà spostata nel grafico di destinazione. Tenere premuto il tasto Ctrl per sovrapporre una copia di tutti i set di dati nel grafico di origine sul grafico di destinazione.

---

## Grafici

I grafici sono riquadri che consentono la visualizzazione dei dati e l'interazione con gli stessi. Diverse opzioni sono comuni a tutti i grafici, mentre altre dipendono dal tipo di dati mostrati.

Figura 1-5 Grafici



I comandi generici sono riassunti come segue:

- L'ingrandimento e lo scorrimento sono eseguiti trascinando il cursore nell'area dell'asse x o y del grafico. Facendo doppio clic si ripristina l'asse all'intervallo originale e facendo clic nell'asse mentre si preme il tasto **Maiusc** riporta il grafico alla visualizzazione precedente (annullare per ingrandimento e scorrimento).
- È possibile posizionare un indicatore di soglia trascinandolo. La soglia di solito determina quali picchi siano etichettati ed è talvolta utilizzata per determinare quali picchi siano elaborati.
- Le selezioni sono eseguite trascinando nell'area dati. Le selezioni sono utilizzate per definire una parte dei dati da utilizzare o elaborare. Selezionare aree multiple premendo il tasto **Maiusc** mentre si trascina. Premere il tasto **Ctrl** per eseguire selezioni negli assi x e y.

## Barra degli strumenti specifica del grafico



Tabella 1-3 Icone della barra degli strumenti specifica del grafico

Icona	Nome (Suggerimento)
	Passa dal grafico ingrandito alla pagina iniziale
	Esegue l'ingrandimento della selezione a visualizzazione a schermo intero

Tabella 1-3 Icone della barra degli strumenti specifica del grafico (continua)

Icona	Nome (Suggerimento)
	Mostra il grafico "Zoom" (per monitorare l'ingrandimento corrente). Fare riferimento alla <a href="#">Figura 1-6</a> .
	Aggiunge i marcatori a freccia ai picchi selezionati
	Utilizzare la percentuale dell'asse y
	Etichettare tutte le tracce sovrapposte
	Riempi i picchi
	Collega l'asse x del grafico ad altri (con le stesse unità) nella finestra (Tenere premuto il tasto Control per applicare a tutti i grafici correnti)
	Scambia dati per utilizzare l'esperimento precedente
	Scambia dati per utilizzare il prossimo esperimento
	Scambia dati per utilizzare l'esperimento selezionato
	Visualizza uno spettro per la selezione
	Impostare l'intervallo di sottrazione del fondo

**Nota:** Le ultime sei icone in questa barra degli strumenti, a cominciare dall'icona Elimina questo riquadro, sono descritte in [Barra degli strumenti del riquadro generico](#).

### Passa dal grafico ingrandito alla pagina iniziale

Se il tracciato è stato ingrandito, utilizzare questa icona per tornare alla visualizzazione iniziale, ovvero la visualizzazione in cui gli assi x e y mostrano i propri intervalli predefiniti e tutti i dati disponibili sono visibili. Facendo doppio clic sull'asse x si riporta il grafico alla visualizzazione iniziale. Facendo doppio clic sull'asse y si riporta solo tale asse al suo intervallo completo.

### Esegue l'ingrandimento della selezione a visualizzazione a schermo intero

Utilizzare questa icona per ingrandire il tracciato in modo che la regione selezionata riempi l'intero spazio disponibile. Prima di selezionare questa icona, trascinare all'interno del tracciato per eseguire una selezione. È anche possibile ingrandire trascinando direttamente sull'asse x (o asse y) del tracciato.

### Mostra il grafico "Zoom" (per monitorare l'ingrandimento corrente)

Utilizzare questa icona per mostrare una piccola copia del grafico sotto il grafico principale come mostrato nella [Figura 1-6](#). Questo grafico generale mostra sempre l'intero intervallo disponibile e indica l'area ingrandita del grafico principale mediante una selezione rosa. La selezione viene aggiornata man mano che il grafico principale viene ingrandito.

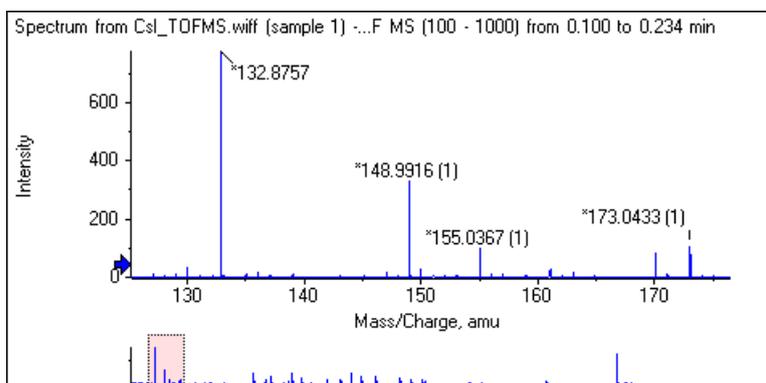
## Introduzione

---

Quando la selezione del picco viene trascinata in una nuova posizione, il grafico principale scorre come richiesto. Per regolare la larghezza, trascinare il cursore accanto al bordo sinistro o destro della selezione. In questo caso, è possibile ingrandire il grafico principale secondo necessità.

Questa funzionalità è particolarmente utile per gli spettri di massa ad alta risoluzione, vista la necessità di ingrandimenti frequenti per visualizzare i dettagli. Il grafico generale consente ancora all'utente di tenere traccia della posizione della regione ingrandita rispetto all'intervallo di massa.

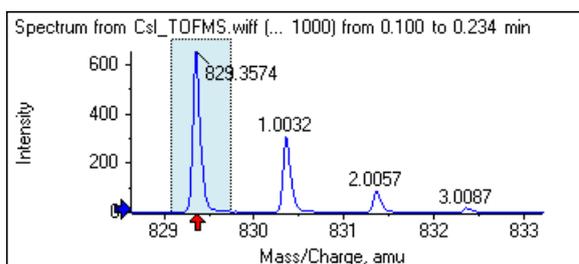
**Figura 1-6 Mostrare il grafico generale**



## Aggiunge i marcatori a freccia ai picchi selezionati

Utilizzare questa icona per aggiungere un marcatore a freccia al picco più grande all'interno della regione del grafico selezionata al momento. La [Figura 1-7](#) mostra il risultato per aver fatto clic su questa icona quando il picco 829 (approssimato) è selezionato come mostrato.

**Figura 1-7 Aggiungere un singolo marcatore a freccia**

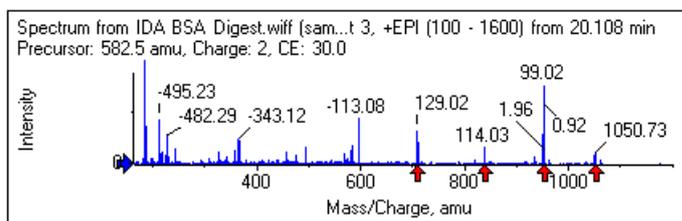


Le frecce fungono da punti di riferimento nei dati. Per impostazione predefinita, i picchi che non sono vicini a una freccia vengono etichettati con la distanza dalla freccia più prossima. Il picco vicino alla freccia con il valore  $x$  più grande viene etichettato con l'effettivo valore  $x$ . I picchi vicini a una freccia diversa dall'ultima vengono etichettati rispetto alla freccia con un valore  $x$  più alto. Nella [Figura 1-7](#), il picco a circa 829 Da viene etichettato con l'effettivo valore  $m/z$  e i picchi dell'isotopo vengono etichettati con la loro distanza da questo picco. I picchi a sinistra della freccia (non mostrata) verranno etichettati con valori negativi.

Le frecce vengono utilizzate principalmente con gli spettri e rappresentano un modo comodo per individuare le differenze di massa previste, quali isotopi, perdite neutre negli spettri MS/MS, ecc. La [Figura 1-8](#) mostra uno spettro MS/MS di un peptide in cui le frecce sono state aggiunte a valori corrispondenti alle perdite neutre di residui amminoacidi. Ad esempio, il picco etichettato 99.02 potrebbe essere una perdita di valina dal picco

a 1050.73 Da, quello successivo etichettato 114.03 potrebbe essere un'ulteriore perdita di asparagina, ecc. Il picco etichettato -113.08 potrebbe essere una perdita di leucina o isoleucina dal picco etichettato 129.02 (con un rapporto effettivo m/z vicino a 709 Da).

**Figura 1-8 Aggiungere più marcatori a freccia**



Se non viene utilizzata questa etichettatura per il picco relativo, deselezionare la voce di menu **Use Arrows for Relative Peak Labeling** mostrata nella [Figura 1-9](#). In questo caso le frecce servono per contrassegnare i picchi di un certo interesse.

**Figura 1-9 Menu Add Arrow Marker**



Gli utenti possono trascinare una freccia in una nuova posizione. Se la freccia viene trascinata nell'area del tracciato, l'operazione viene annullata. Se la freccia viene trascinata all'esterno del grafico, la freccia viene eliminata. È possibile eliminare le frecce selezionando **Remove All Arrows** dal menu mostrato nella [Figura 1-9](#).

## Utilizza Percentuale Asse Y

Questa icona determina il ridimensionamento dell'asse y. Se selezionata, questa opzione consente di scalare i tracciati sovrapposti in modo che il valore massimo di ogni tracciato sia pari al 100%. L'utilizzo di un asse y percentuale è utile se le intensità assolute dei tracciati sovrapposti sono molto diverse.

## Etichettare tutte le tracce sovrapposte

Per impostazione predefinita, se si sovrappongono più tracciati, verrà etichettato solo il tracciato attivo. Fare clic su questa icona per etichettare tutte le tracce. Fare nuovamente clic sull'icona per rimuovere tutte le etichette e tornare alla visualizzazione originale.

## Riempi i picchi

Fare clic su questa icona per riempire i picchi dei dati attivi utilizzando alternativamente riempimenti chiari e scuri. Questa funzione è utile se si desidera visualizzare l'inizio e la fine precisi dei picchi. Fare clic ancora sull'icona per rimuovere il riempimento e tornare alla visualizzazione originale.

### Collega l'asse x del grafico ad altri (con le stesse unità) nella finestra

Gli assi di due o più grafici possono essere collegati insieme in modo che quando si ingrandisce un asse in un grafico, gli altri vengano automaticamente regolati per visualizzare lo stesso intervallo. Questa funzione può essere utile per confrontare i dati in questi grafici. Un'alternativa è quella di sovrapporre i set di dati nello stesso grafico. Comunque, ciò non è sempre desiderabile.

Fare clic sull'icona **Collega l'asse x del grafico ad altri (con le stesse unità) nella finestra** in ciascuno dei grafici da collegare. Tenere premuto il tasto **Ctrl** facendo clic sull'icona per collegare tutti i grafici correnti con le stesse unità dell'asse x nella stessa finestra del grafico attivo. Ad esempio, se si dispone di tre spettri visibili e si fa clic su **Ctrl** + l'icona **Collega l'asse x del grafico ad altri (con le stesse unità) nella finestra** in uno di essi, tutti e tre gli spettri sono collegati l'uno all'altro.

---

**Nota:** Ad esempio, se successivamente si genera un nuovo spettro, questo non verrà collegato agli altri. Per collegare il nuovo spettro, fare clic sull'icona associata **Collega l'asse x del grafico ad altri (con le stesse unità) nella finestra**.

---

Per impostazione predefinita, vengono collegati solo gli assi x dei grafici. In questo caso, se si ingrandisce un grafico manualmente, gli altri ingrandiranno automaticamente l'asse y in modo che i picchi all'interno della visualizzazione riempiano lo spazio disponibile.

Per scollegare un grafico collegato, fare clic sull'icona **Collega l'asse x del grafico ad altri (con le stesse unità) nella finestra** nel grafico adatto. Tenere premuto il tasto **Ctrl** per scollegare tutti i grafici con le stesse unità dell'asse x nella stessa finestra.

### Scambia dati per utilizzare il prossimo esperimento

Se i dati attivi del grafico sono associati a un esperimento specifico diverso dall'ultimo, questa icona sostituisce i dati con quelli dello stesso tipo, ma relativi all'esperimento successivo.

Ad esempio, se il cromatogramma di corrente ionica totale (TIC) è attivo per l'esperimento 2, fare clic su questa icona per passare al TIC dell'esperimento 3. Se uno spettro è attivo per l'esperimento 2 in un dato momento, fare clic su questa icona per passare a uno spettro dello stesso periodo per l'esperimento 3.

### Scambia dati per utilizzare l'esperimento precedente

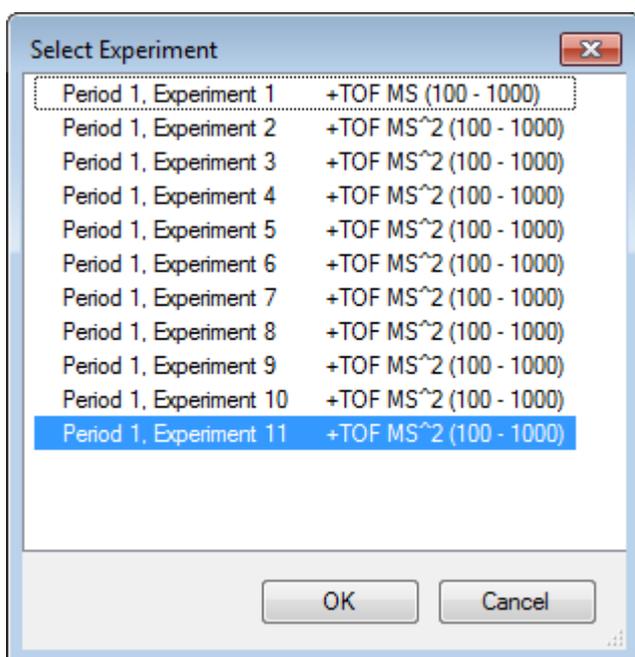
Se i dati attivi del grafico sono associati a un esperimento specifico diverso dal primo, questa icona sostituisce i dati con dati dello stesso tipo ma relativi all'esperimento precedente.

Ad esempio, se il cromatogramma di corrente ionica totale (TIC) è attivo per l'esperimento 3, fare clic su questa icona per passare al TIC dell'esperimento 2. Se uno spettro è attivo per l'esperimento 3 in un dato momento, fare clic su questa icona per passare a uno spettro dello stesso periodo per l'esperimento 2.

### Scambia dati per utilizzare l'esperimento selezionato

Usare questa icona per selezionare un esperimento specifico da utilizzare senza doverli sfogliare uno a uno. Facendo clic sull'icona si apre una finestra di dialogo che elenca tutti gli esperimenti disponibili. Il campione attivo è evidenziato. Fare clic su un esperimento nella lista per selezionarlo e quindi fare clic su **OK**. Fare riferimento alla [Figura 1-10](#).

Figura 1-10 Finestra di dialogo Select Experiment



### Visualizza uno spettro per la selezione

Utilizzare questa icona per generare uno spettro di massa mediato sull'intervallo di tempo della selezione attuale nel grafico. Lo stesso risultato può essere ottenuto facendo doppio clic nella selezione.

### Impostare l'intervallo di sottrazione del fondo

Utilizzare questa icona per eseguire la sottrazione automatica del fondo per spettri generati a partire dal cromatogramma.

### Barra degli strumenti specifica dello spettro



Tabella 1-4 Icone della barra degli strumenti specifica dello spettro

Icona	Nome (Suggerimento)
	Visualizza un XIC per la selezione

**Nota:** Le prime undici icone in questa barra degli strumenti, a cominciare dall'icona Passa dal grafico ingrandito alla pagina iniziale, sono descritte in [Barra degli strumenti specifica del grafico](#).

**Nota:** Le ultime sei icone in questa barra degli strumenti, a cominciare dall'icona Elimina questo riquadro, sono descritte in [Barra degli strumenti del riquadro generico](#).

---

### Visualizza un XIC per la selezione

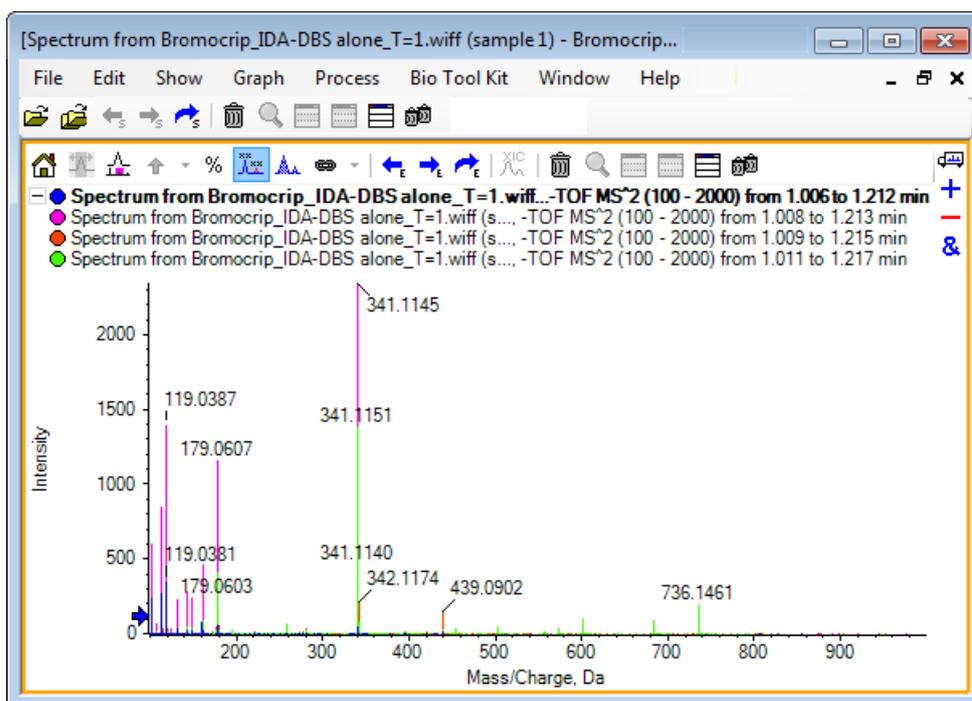
Utilizzare questa icona per generare un cromatogramma degli ioni estratti (XIC) sommato sull'intervallo di massa della selezione attuale nel grafico.

## Sovrapposizioni

I grafici possono contenere diverse tracce, denominate sovrapposizioni, che condividono gli stessi assi in modo che possano essere confrontate facilmente. Possono essere generati trascinando l'icona appropriata a due riquadri (l'icona **Trascinare in un altro grafico per sovrapporre i dati attivi nel grafico di destinazione**) e sono prodotti automaticamente con alcuni comandi di creazione di riquadri. Fare riferimento a [Cromatogrammi e spettri](#).

Nella [Figura 1-11](#), il grafico contiene quattro spettri con l'icona **Etichettare tutte le tracce sovrapposte** selezionata. L'area di intestazione del grafico mostra i titoli per i due spettri e cerchi colorati che indicano il colore della traccia. La traccia attiva è mostrata in grassetto. La traccia è la destinazione per qualsiasi operazione di elaborazione, ad esempio dati di soglia, smussamento, ecc., e normalmente sarebbe la sola etichettata. Facendo clic sull'icona alla sinistra del titolo, l'icona è modificata ed è disegnato solo il titolo della traccia attiva. Questa funzione è utile quando esistono molte sovrapposizioni. Fare nuovamente clic sull'icona per invertire il processo. Se esistono molte tracce e il cursore è spostato sui titoli, il cursore cambia in una freccia a doppia punta e agisce come una barra di scorrimento quando è trascinato, in modo che sia possibile accedere a tutti i titoli.

**Figura 1-11** Grafico contenente quattro spettri con l'icona Etichettare tutte le tracce sovrapposte selezionata



Esistono diversi modi di commutare la traccia attiva:

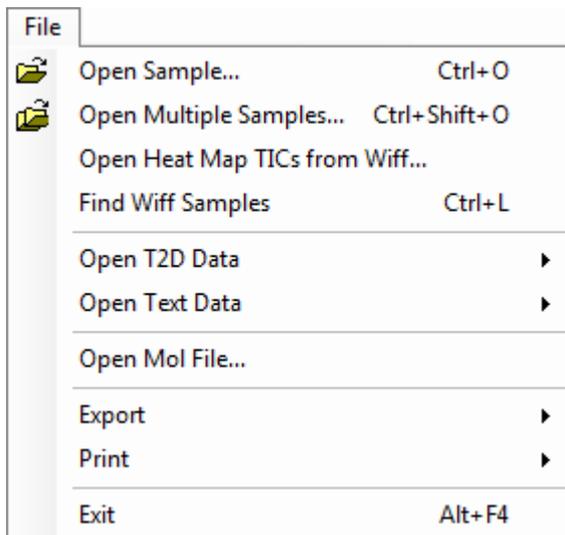
- Fare clic sul cerchio colorato accanto al titolo
- Fare clic sul titolo stesso
- Fare clic su un punto dati nella traccia (non sulla traccia stessa)

Facendo clic con il pulsante destro del mouse su un grafico con sovrapposizioni è mostrato un menu contestuale contenente comandi che è possibile utilizzare per modificare visivamente le tracce mostrate. Le opzioni **Remove Active Trace** e **Remove All Traces Except Active** funzionano come previsto.

## Aprire i file

Come mostrato nella [Figura 1-12](#), il software può aprire diversi tipi di file di dati e possiede comandi per aprire campioni singoli o multipli.

**Figura 1-12 Menu File**

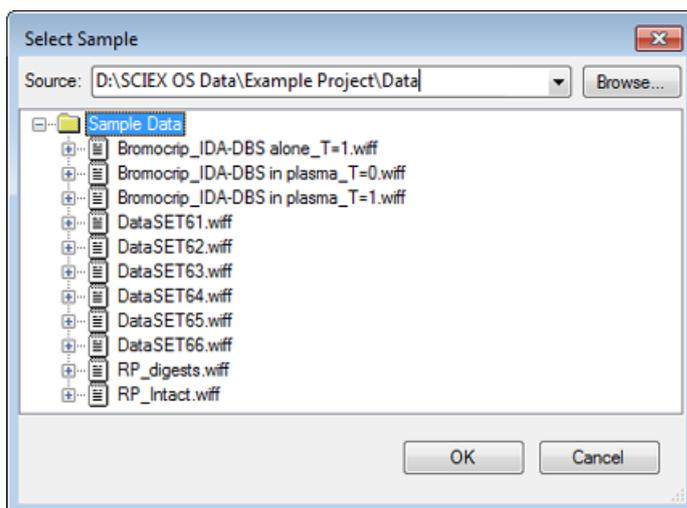


## Aprire un file campione

L'opzione **Open Sample** apre la finestra di dialogo **Select Sample**. Fare riferimento alla [Figura 1-13](#).

Questa finestra di dialogo permette di selezionare un file singolo. La visualizzazione che appare dipende dal comando selezionato, con un file singolo .scan che mostra uno spettro o un cromatogramma a corrente ionica totale (TIC) e più file di scansione .wiff che mostrano un TIC (la somma di tutti gli esperimenti, se ce n'è più di uno).

**Figura 1-13 Finestra di dialogo Select Sample**



Fare clic sull'icona a sinistra del file .wiff per mostrare tutti i campioni all'interno del file e quindi selezionare il nome del file richiesto. Se c'è un solo campione all'interno del file, selezionare il nome del file e fare clic su **OK**.

## Aprire più file campioni

Le opzioni **Open Multiple Samples** e **Open Heat Map TICs from Wiff** aprono la finestra di dialogo **Select Samples**. Fare riferimento alla [Figura 1-14](#).

Il pannello sinistro corrisponde alla finestra di dialogo **Open** che consente di navigare nelle cartelle e di specificare i file, mentre il pannello destro indica i file che saranno aperti quando si fa clic su **OK**. I campioni possono essere trasferiti da sinistra a destra come segue:

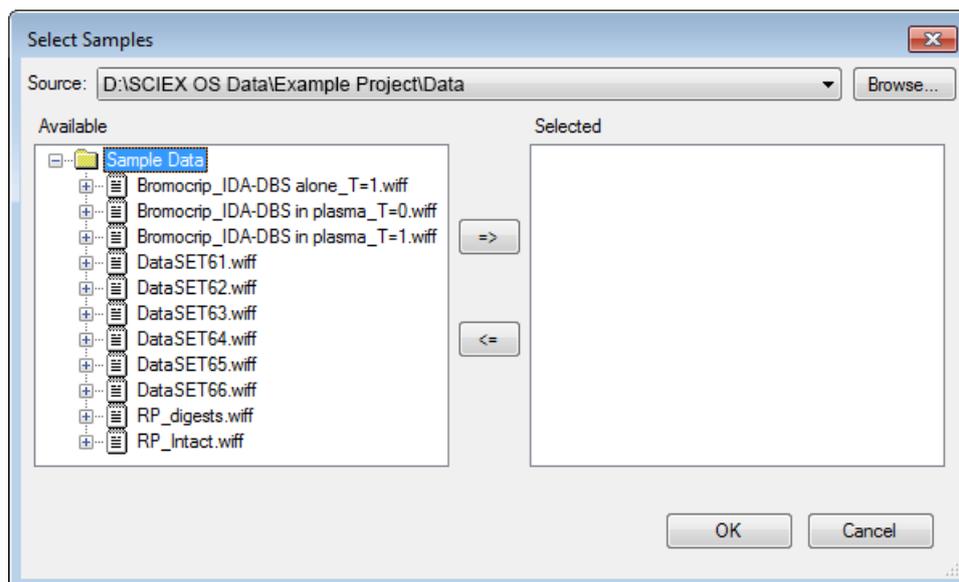
- Espandere il file wiff, selezionare il campione, quindi fare clic sulla freccia che punta a destra.
- Espandere il file wiff, selezionare il campione, quindi trascinarlo sul pannello di destra.
- Espandere il file wiff e quindi fare doppio clic sul campione.

Se il file contiene più campioni, possono essere tutti trasferiti selezionando il file wiff e facendo clic sulla freccia che punta a destra, oppure selezionando il file .wiff e quindi trascinandolo sul pannello di destra.

I campioni possono essere trasferiti da destra a sinistra come segue:

- Espandere il file wiff, selezionare il campione, quindi fare clic sulla freccia che punta a sinistra.
- Espandere il file wiff, selezionare il campione, quindi trascinarlo sul pannello di sinistra.
- Fare doppio clic sul campione.

**Figura 1-14 Finestra di dialogo Select Samples**



## Cromatogrammi e spettri

Total Ion Chromatogram (Cromatogramma corrente ionica totale) (TIC), gli spettri ed Extracted Ion Chromatogram (Cromatogramma ioni estratti) (XIC) sono le visualizzazioni dati più ampiamente utilizzate quando si esplorano e rivedono dati. Il software fornisce collegamenti tra queste visualizzazioni dati, in modo

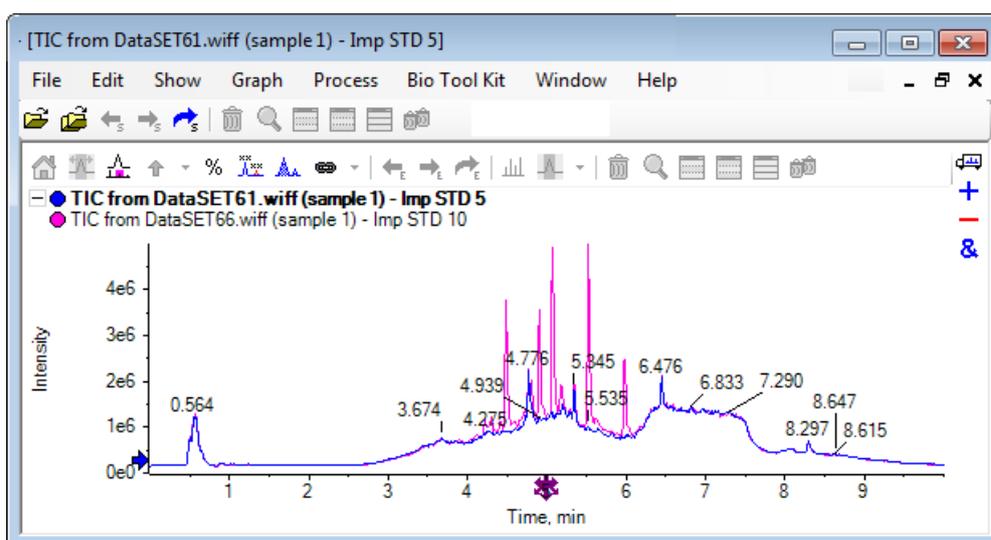
che gli utenti possano rapidamente generare spettri e quindi XIC per determinare se i picchi negli spettri provengano da uno o più picchi cromatografici.

## Cromatogramma a corrente ionica totale (TIC)

È la visualizzazione predefinita mostrata quando un file wiff di scansione o multi-scansione è aperto. Il TIC mostrato corrisponde a un cromatogramma creato sommando le intensità di tutti gli ioni in ogni spettro e quindi riportando la somma in funzione del tempo di ritenzione.

Se il campione è stato acquisito utilizzando gli esperimenti con loop, il TIC mostrato corrisponde alla somma delle intensità di entrambi gli esperimenti e viene disegnato un indicatore speciale a freccia nell'asse x per indicarla. Fare riferimento alla [Figura 1-15](#). Se si fa clic due volte sull'indicatore, viene aperto un nuovo riquadro che mostra i TIC sovrapposti individuali per ogni esperimento.

**Figura 1-15 TIC**



Se il campione contiene dati IDA, selezionare qualunque IDA Explorer, che è un modo grafico di mostrare i tempi di massa e ritenzione dei precursori selezionati o di un TIC convenzionale. Se si seleziona l'opzione TIC convenzionale, vengono visualizzati i TIC separati per la misurazione IDA e la somma dipendente dell'IDA.

Mostrare il TIC in qualsiasi momento facendo clic su **Show > Total Ion Chromatogram (TIC)** per aprire una finestra di dialogo che permette la selezione di qualsiasi esperimento. Selezionare Period 1 per mostrare il TIC per tutti gli esperimenti, mentre le altre voci corrispondono ai singoli TIC. Usare **Maiusc+** o **Ctrl+clic** per selezionarne più di uno.

## Spettri

Se un file contiene solo un singolo spettro, lo spettro viene visualizzato quando il file viene aperto.

Per i dati con scansioni multiple, gli spettri sono derivati da cromatogrammi effettuando una selezione nel cromatogramma e facendo doppio clic al suo interno o facendo clic sull'icona **Visualizza uno spettro per la selezione**. Trascinare la selezione rettangolare del cromatogramma per aggiornare lo spettro per mostrare la nuova area.

Selezionare aree multiple premendo il tasto **Maiusc** dopo aver completato la prima selezione. Fare doppio clic su una di queste scelte o fare clic sull'icona **Visualizza uno spettro per la selezione** per creare un nuovo riquadro dello spettro con gli spettri sovrapposti.

Per l'IDA, si apre una richiesta di sovrapporre tutti gli spettri dipendenti o semplicemente di mostrare il primo spettro. In quest'ultimo caso, utilizzare i tasti freccia sinistra e destra per mostrare gli spettri.

---

**Nota:** Questa finestra di dialogo ha una casella di controllo Only show again if the shift key is down.

---

Creare gli spettri di fondo sottratti in due modi:

- Creare gli spettri separati per le aree di picco e di fondo e poi trascinare l'icona sottratta a due pannelli dallo spettro del fondo allo spettro del picco.
- Definire un'area di fondo facendo una o due selezioni nel cromatogramma e facendo clic sull'icona **Impostare l'intervallo di sottrazione del fondo**. Gli spettri creati quando viene definita un'area di fondo vengono sottratti automaticamente dal fondo. L'area di fondo è mostrata nel cromatogramma come una selezione rettangolare di colore rosso chiaro e sia questa sia le selezioni dello spettro possono essere spostate per modificare i dati visualizzati. Quando viene definita un'area di fondo, può essere rimossa facendo clic sulla freccia accanto all'icona e quindi selezionando **Clear Subtraction Range**.

---

**Nota:** I marcatori a freccia sono utili negli spettri perché le etichette dei picchi possono essere relative al picco più vicino contrassegnato da una freccia e questo fornisce un modo rapido per determinare le masse di perdite o addotti. Se esistono sovrapposizioni multiple e l'icona Etichettare tutte le tracce sovrapposte è selezionata, ogni sovrapposizione verrà etichettata rispetto alla freccia.

---

## Cromatogramma ioni estratti (XIC)

I XIC possono essere generati in due modi:

- Facendo clic su **Show > Extracted Ion Chromatogram (XIC)**.

Questa azione apre una finestra di dialogo in cui è possibile digitare le masse iniziale e finale o il centro e i valori di larghezza, a seconda della modalità. Ciò può essere modificato nel menu contestuale, aperto facendo clic con il pulsante destro del mouse all'interno della finestra di dialogo. Il menu contestuale fornisce inoltre accesso ad altri utili comandi, come l'impostazione di una larghezza predefinita e l'importazione o esportazione dell'elenco delle masse. Gli utenti possono anche rendere i valori di massa persistenti, in modo che siano utilizzati automaticamente fino alla rimozione.

- Eseguendo una o più selezioni in uno spettro e quindi facendo doppio clic in una di queste o facendo clic sull'icona **Visualizza un XIC per la selezione**.

Queste azioni generano un XIC corrispondente a ciascuna selezione. Come impostazione predefinita, il programma determina il picco massimo in ciascun intervallo di selezione e imposta automaticamente il XIC in modo che corrisponda ai valori di massa alti e bassi a metà altezza per il picco. Se si preme il tasto **Ctrl**, si utilizza l'intera larghezza della selezione.

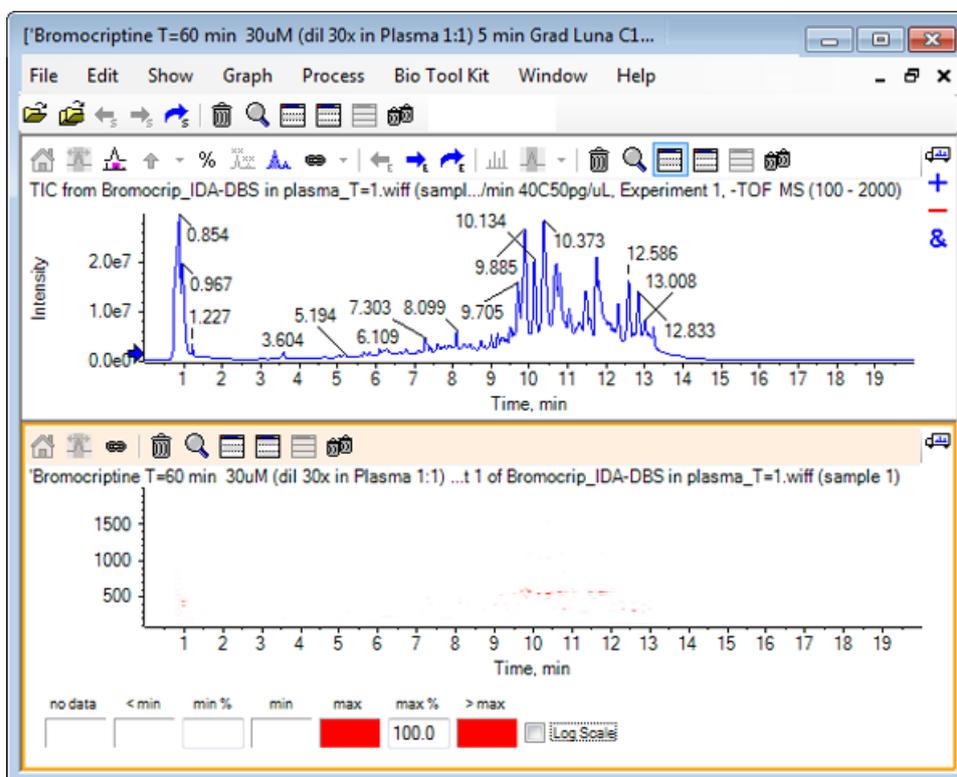
In entrambi i casi, è mostrato un grafico contenente una sovrapposizione per ciascuna selezione. Le selezioni si trasformano in collegamenti. Il trascinamento dei collegamenti aggiorna i XIC.

**Nota:** I XIC sono normalmente calcolati e mostrati per l'intero intervallo cromatografico, che può essere lento specialmente se esistono più selezioni e i dati derivano da uno strumento ad alta risoluzione e contengono molte scansioni. Una funzionalità utile è di limitare gli intervalli XIC a una finestra più piccola attorno al tempo di ritenzione dello spettro utilizzato per generarli. Ciò può essere impostato dalla scheda XIC della finestra di dialogo mostrata dopo aver fatto clic sulla scheda **Edit > Options > XIC**.

## Contour Plot e mappe termiche

Un Contour Plot LC/MS (**Show > LC/MS Contour Pane**) mostra tutti i dati di un campione LC/MS in un riquadro singolo. L'esempio nella [Figura 1-16](#) mostra un TIC e la corrispondente mappa di contorno, che mostra i dati come mappa del rapporto  $m/z$  rispetto al tempo di ritenzione con il colore di intensità codificato. In questo caso, sono anche mostrati i controlli di colore ma possono essere nascosti facendo clic con il pulsante destro del mouse nella visualizzazione e cancellando l'opzione **Show Appearance Controls**. Poiché i tracciati di colore e i cromatogrammi hanno lo stesso asse x, possono essere collegati insieme in modo tale che l'ingrandimento e lo scorrimento influenzino entrambe le visualizzazioni similmente a fini di confronto.

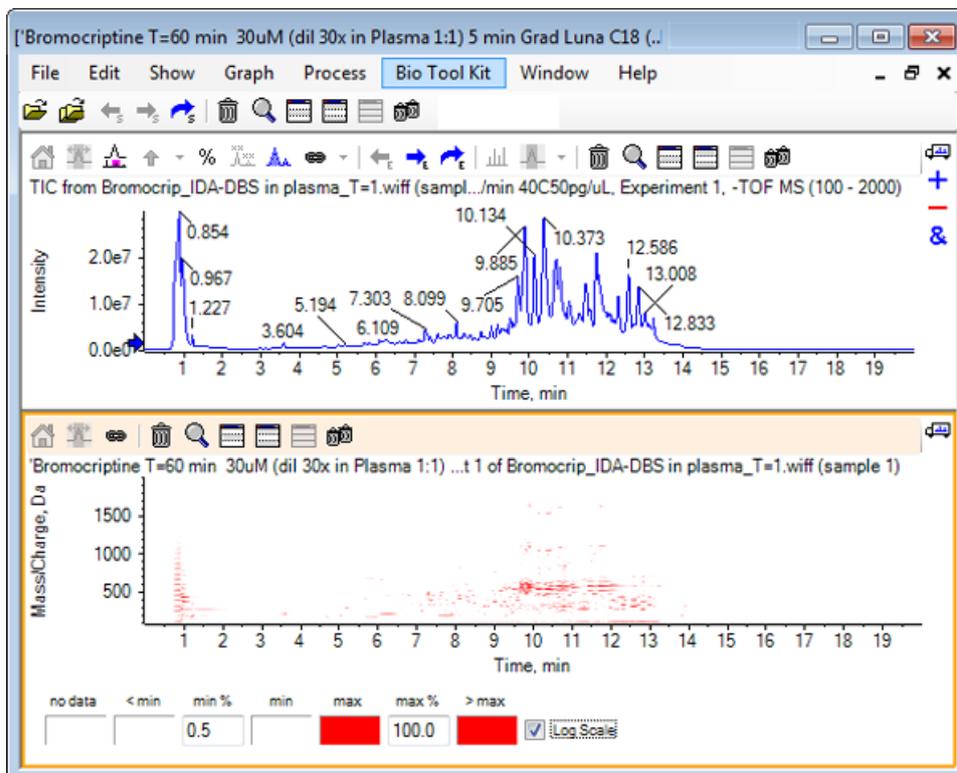
**Figura 1-16** TIC e mappa di contorno corrispondente



Il controllo di colore utilizza una tavolozza di 256 colori per mostrare le intensità nell'intervallo definito da **min %** e **max %**. Le intensità inferiori a **min %** sono disegnate utilizzando **< min** e quelle superiori a **max %** sono disegnate utilizzando **> max**. Se i colori utilizzati per **< min** e nessun dato è uguale (come qui), qualsiasi punto di dati inferiore a **min %** scompare. Questa è una forma di gestione della soglia visiva che può semplificare il tracciato come mostrato nella [Figura 1-17](#), mentre il valore **min %** è stato aumentato

a 0,5%. Per maggiori informazioni sui controlli di colore, fare riferimento alla *Guida per l'Utente del Sistema*.

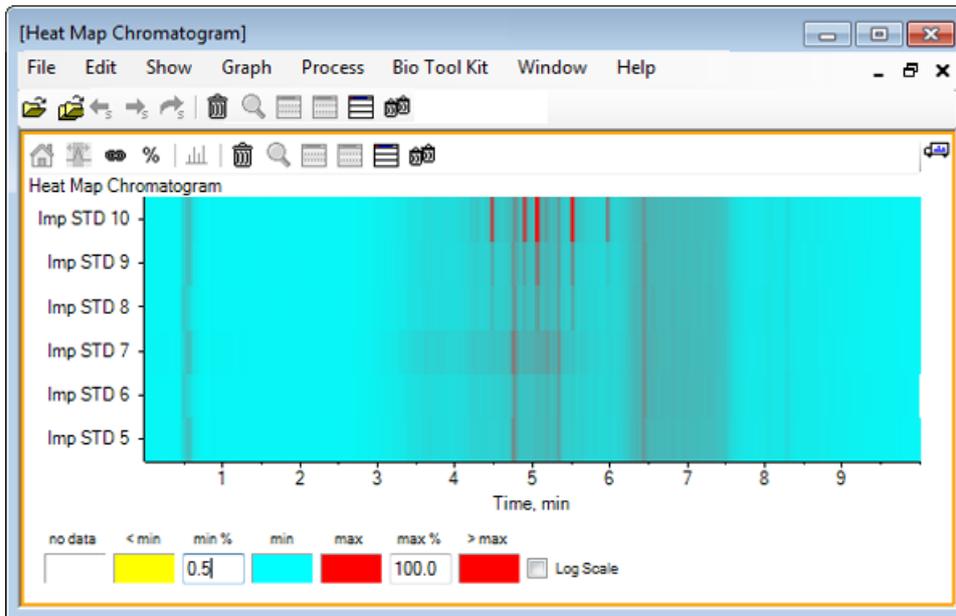
**Figura 1-17** Mappa di colore con valore min% aumentato a 0,5%



I picchi a bassa intensità possono essere messi in risalto riducendo **max %** in modo tale che la tavolozza dei colori copra un intervallo di intensità minore, ma tutti i picchi maggiori di questo valore hanno lo stesso colore. Questo può essere evidenziato anche selezionando la casella di controllo **Log Scale**. L'attivazione di **Log Scale** richiede un valore diverso da zero di **min %** (ad esempio 1 o 0,1) e quindi mappa i colori al logaritmo dell'intensità percentuale.

Gli strumenti di visualizzazione per più campioni nel software includono la capacità di mostrare TIC, XIC e spettri di più campioni come serie di singole mappe termiche, il che può assistere nel confronto di campioni. La [Figura 1-18](#) è per una serie di cromatogrammi TOF di sei analiti. Fare riferimento a [Lavorare con campioni multipli](#).

Figura 1-18 Heat Map Chromatogram



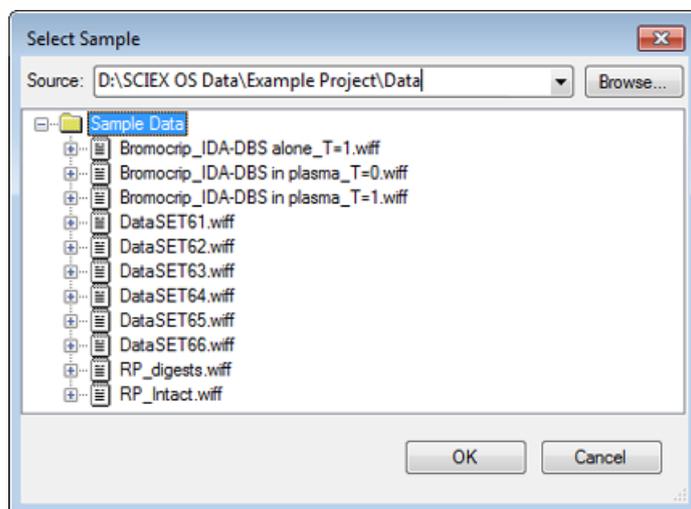
Questa sezione descrive alcune delle più comuni opzioni di elaborazione. Il file utilizzato è un file IDA con una serie di esperimenti con loop, ma in questo esempio viene utilizzato il primo esperimento di indagine che simula una semplice analisi LC/MS. Nella sezione seguente viene esplorata la funzionalità IDA.

## Aprire un file di dati

1. Fare clic sull'icona **Apri campione** nella barra degli strumenti principale.

Si aprirà la finestra di dialogo **Select Sample**.

**Figura 2-1 Finestra di dialogo Select Sample**



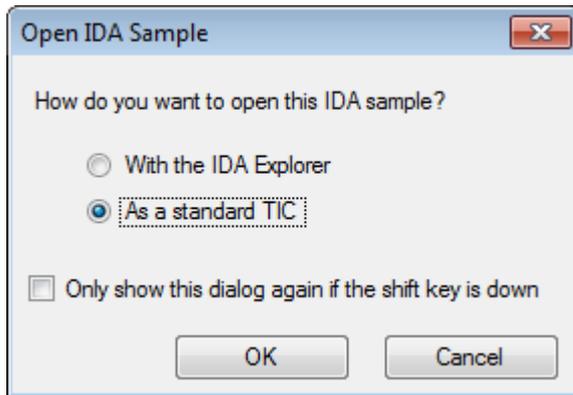
2. Se la cartella **Sample Data** non è già selezionata, fare clic su **Browse** e spostarsi sulla cartella **Sample Data**. Per informazioni sui percorsi dei file dati installati, fare riferimento a [Organizzazione](#).
3. Per visualizzare tutti i campioni nel file, fare clic sull'icona a sinistra del file **Bromocrip\_IDA-DBS alone\_T=1.wiff**.

C'è solo un campione nel file **Bromocrip\_IDA-DBS alone\_T=1.wiff**.

4. Selezionare il nome del campione e fare clic su **OK**.

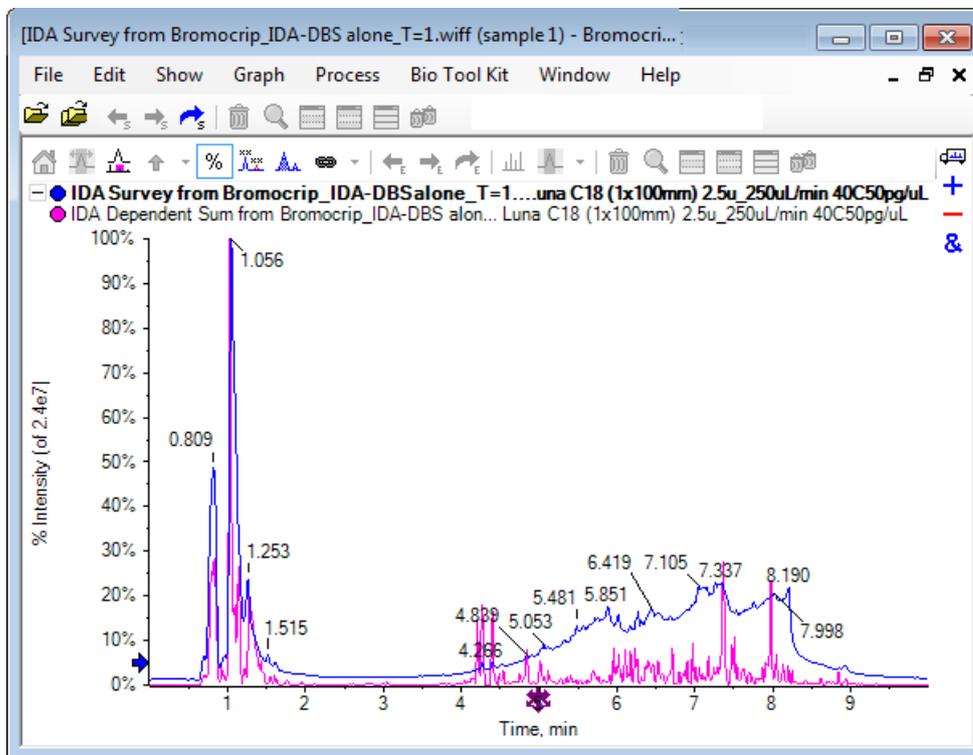
Poiché si tratta di un file IDA, il software suggerisce di specificare come aprire il campione selezionato.

Figura 2-2 Open IDA Sample



5. Fare clic su **As a standard TIC** se non è già selezionato e quindi fare clic su **OK** per creare il cromatogramma a corrente ionica totale (TIC) mostrato nella [Figura 2-3](#).

Figura 2-3 TIC



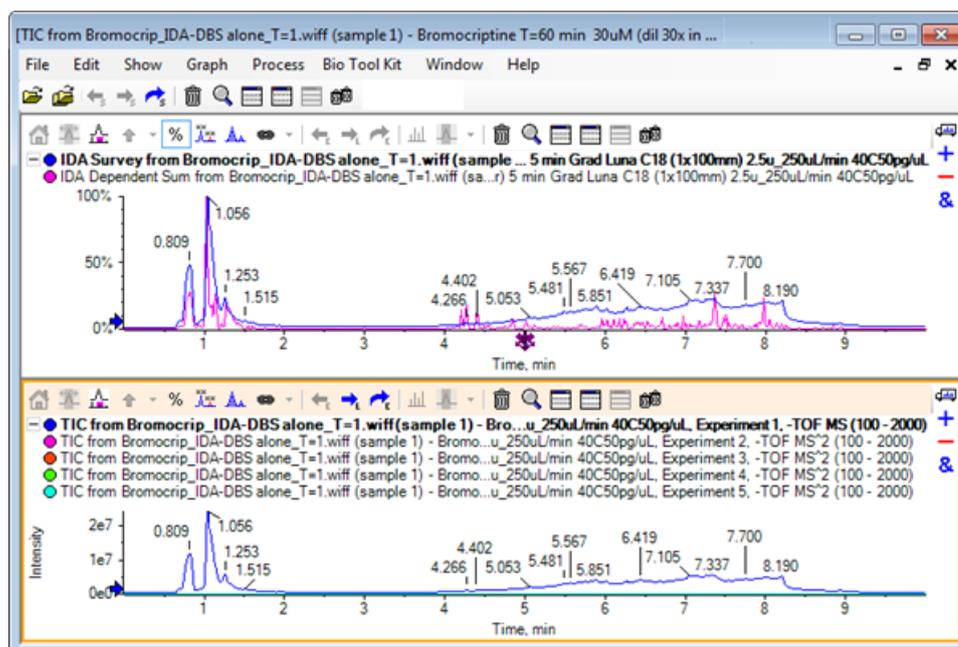
Il riquadro mostra una sovrascrittura della misurazione esaminata con il TIC (blu) e l'altra delle scansioni dipendenti sommate (ione prodotto). In questo caso, vogliamo elaborare i dati dell'indagine per mostrare solo il TIC dell'indagine.

## Mostrare il TIC per One Experiment

1. Fare doppio clic sull'icona **Fare doppio clic per sovrapporre i singoli TIC per tutti gli esperimenti** al centro dell'asse X per generare TIC sovrapposti per tutti gli esperimenti.

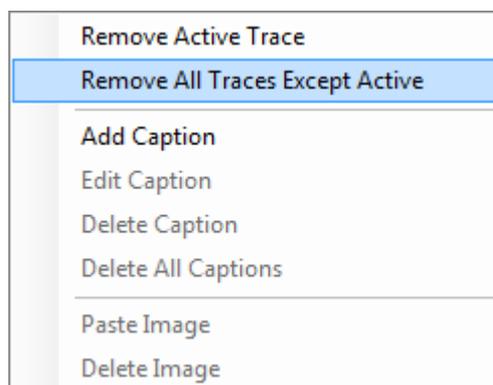
Il nuovo cromatogramma è il riquadro attivo. Inoltre, poiché la verifica è il primo esperimento, è la traccia attiva come indicato dal titolo in grassetto nell'intestazione.

Figura 2-4 TIC sovrapposti



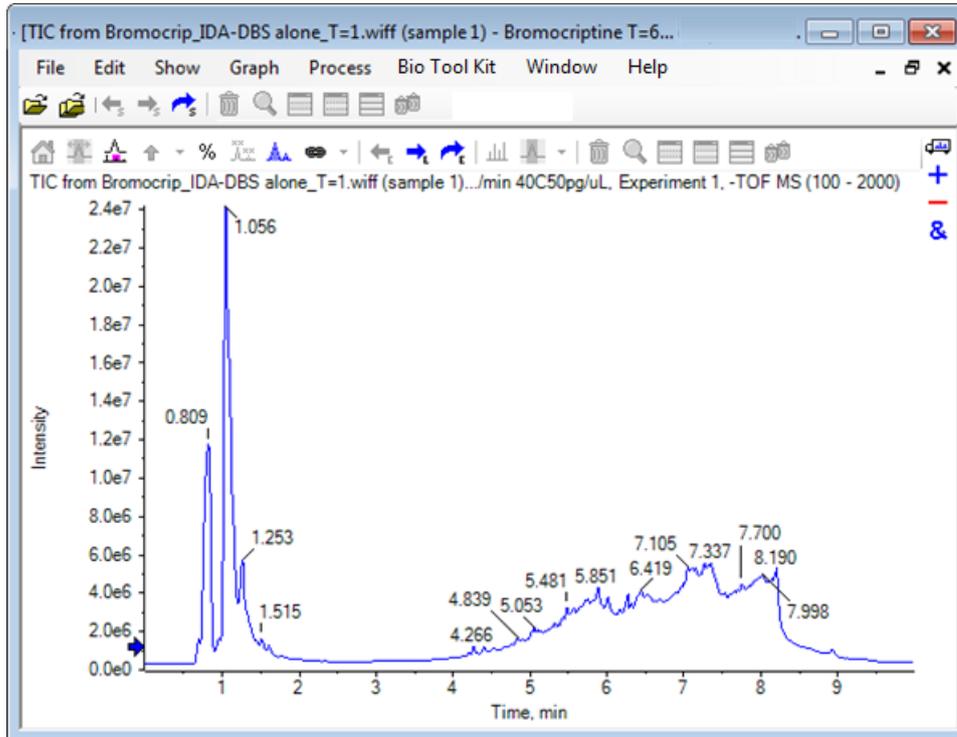
2. Fare clic con il pulsante destro del mouse all'interno del riquadro del cromatogramma attivo e quindi fare clic su **Remove All Traces Except Active** in modo tale che resti solo il TIC della verifica.

Figura 2-5 Menu pulsante destro del mouse



3. Nello stesso riquadro, fare clic sull'icona **Elimina tutti gli altri riquadri** per lasciare solo il TIC dell'analisi.

Figura 2-6 TIC dell'analisi



## Mostrare un XIC per una formula molecolare nota

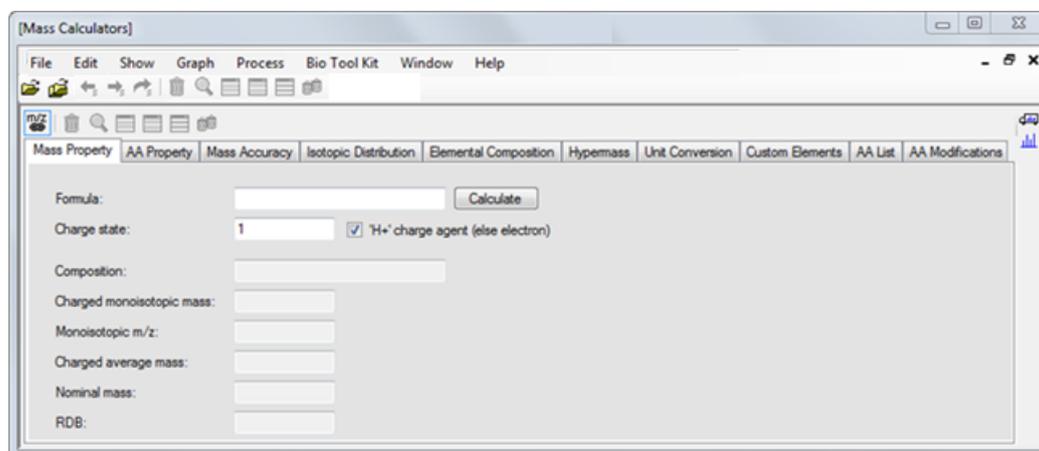
Mentre alcuni picchi apparentemente piccoli sono ovvi nell'intervallo da 4 min e 7 min, è possibile che molti siano oscurati dal segnale di fondo che è piuttosto intenso in questi dati. Poiché questo campione corrisponde a un'incubazione microsomiale di bromocriptina, utilizzare il rapporto  $m/z$  dello ione molecolare previsto come guida iniziale alla posizione del picco. La formula molecolare della bromocriptina è  $C_{32}H_{40}N_5O_5Br$  e poiché questi sono dati in modalità negativa ci aspettiamo di vedere uno ione  $(M - H)^-$ .

1. Fare clic su **Show > Mass Calculators**.
2. Fare clic sulla scheda **Mass Property** nel riquadro **Mass Calculators**.
3. Digitare la formula molecolare nel campo **Formula**.
4. Digitare **-1** nel campo **Charge state**.
5. Selezionare **'H+' charge agent (else electron)**.
6. Fare clic su **Calculate**.

**Nota:** È anche possibile rimuovere manualmente un idrogeno dalla formula molecolare e non selezionare la casella di controllo 'H+' charge agent (else electron).

La finestra di dialogo si aggiorna per mostrare un numero di valori di massa: monoisotopici, valore medio, e così via.

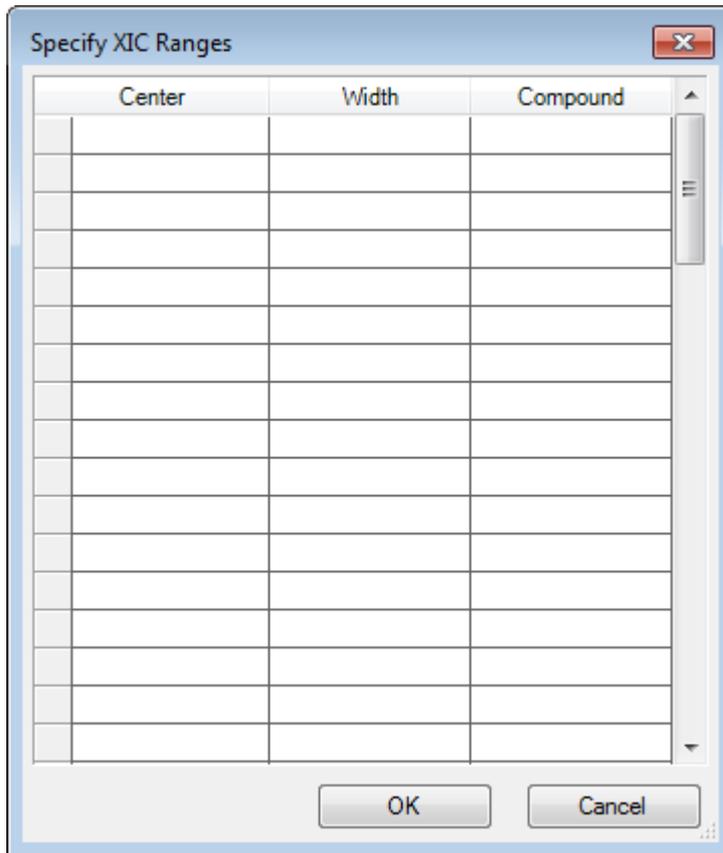
**Figura 2-7 Riquadro Mass Calculators**



**Nota:** A questi valori di massa, gli isotopi sono facilmente risolti. Per questo motivo, il valore m/z monoisotopico è il valore più appropriato.

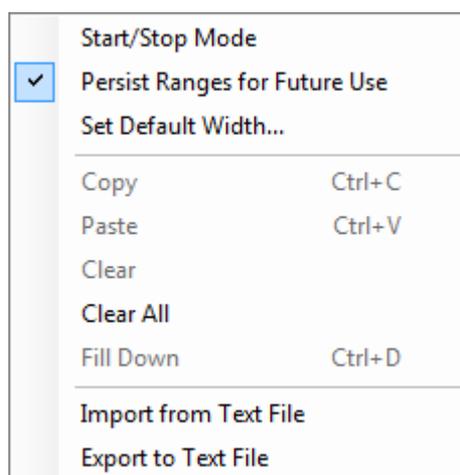
7. Selezionare il valore **Monoisotopic m/z** e quindi premere **Ctrl+C** per copiare il valore negli appunti.
8. Fare clic sull'icona **Elimina questo riquadro** per eliminare il riquadro **Mass Calculators** o fare clic sull'icona **Nasconde questo riquadro** per nascondere il riquadro.
9. Fare clic su **Show > Extracted Ion Chromatogram (XIC)** per aprire la finestra di dialogo **Specify XIC Ranges**.

Figura 2-8 Finestra di dialogo Specify XIC Ranges



10. Fare clic con il pulsante destro del mouse nella finestra di dialogo **Specify XIC Ranges** per aprire il menu contestuale.
11. Nel menu contestuale, eseguire quanto segue:
  - a. Accertarsi che l'opzione **Start/Stop Mode** non sia selezionata, in modo che i valori XIC siano inseriti come valore centrale e una larghezza.
  - b. Fare clic su **Set Default Width**, digitare **0.05**, quindi fare clic su **OK**.
  - c. Fare clic su **Persist Ranges for Future Use** in modo che i valori siano ricordati la volta successiva che la finestra di dialogo è utilizzata.

Figura 2-9 Menu contestuale



12. Ritornare alla finestra di dialogo **Specify XIC Ranges**.

La finestra di dialogo è ora impostata in modo che debba essere digitata solo una massa per ciascun XIC di interesse e si utilizzi una larghezza predefinita.

13. Selezionare la prima cella sotto **Center** e quindi premere **Ctrl+V** per incollare il valore della massa dal passaggio 7.

14. Fare clic su **OK**.

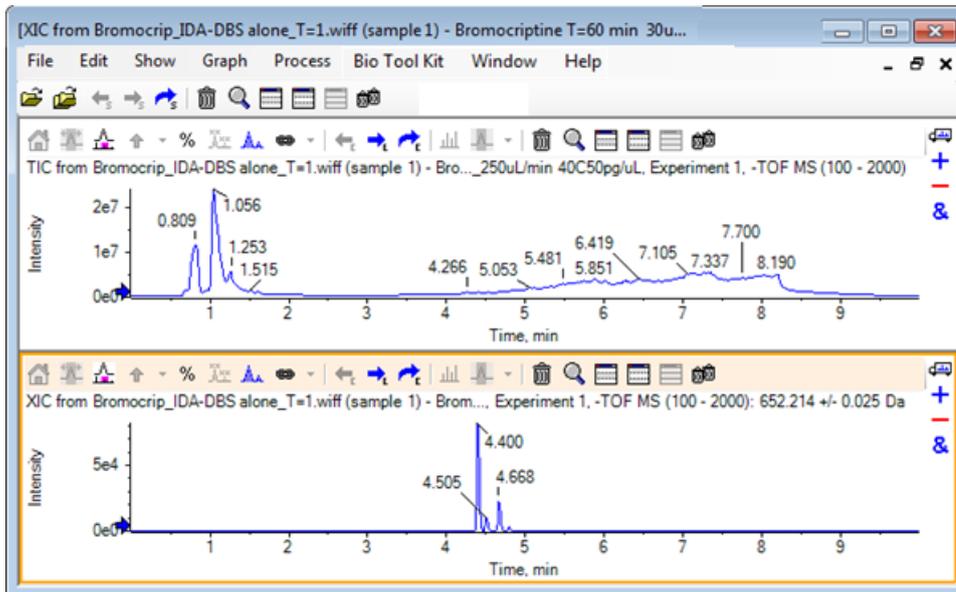
---

**Nota:** Poiché è stata impostata una larghezza predefinita, non è necessario digitare un valore individuale.

---

Il riquadro ora contiene il TIC e il XIC per lo ione molecolare atteso della bromocriptina, che mostra diversi picchi.

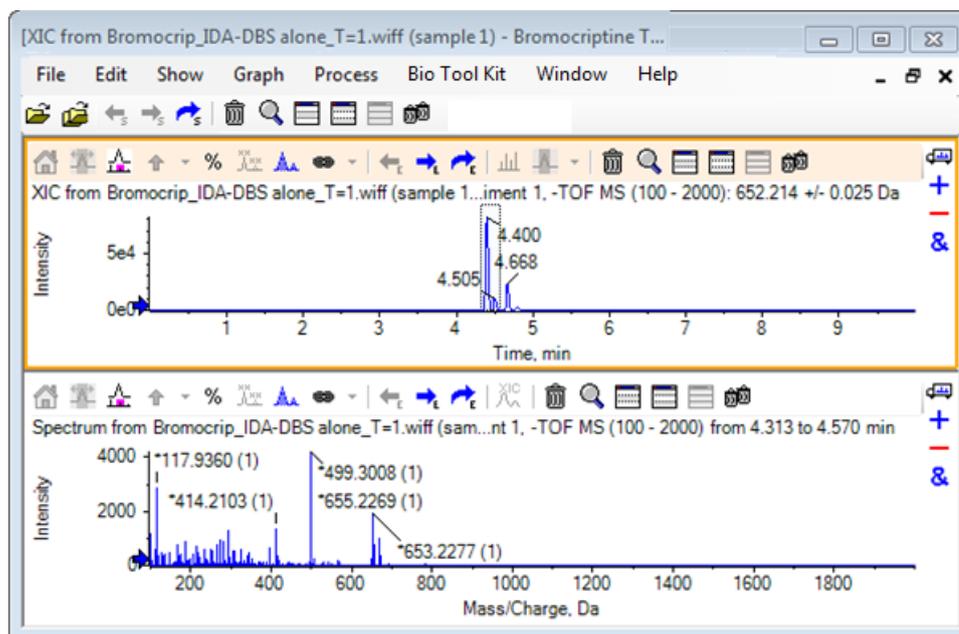
Figura 2-10 TIC e XIC per lo ione molecolare previsto di bromocriptina



## Creare e interagire con uno spettro

1. Nascondere il riquadro TIC, effettuare una selezione intorno al picco più alto nel XIC (Cromatogramma a ioni estratti) e quindi fare clic sull'icona **Visualizza uno spettro per la selezione** per generare lo spettro medio per questa area.

Figura 2-11 Spettro dal picco più alto nel XIC



**Nota:** In [Figura 2-11](#), il campo **Label** nella scheda **Peak Labeling & Finding** della finestra di dialogo **Options** (disponibile attraverso **Edit > Options**) è impostata su **Mass (Charge)**.

- Trascinare l'asse x da circa 630 Da a 700 Da per ingrandire lo spettro di questa area.

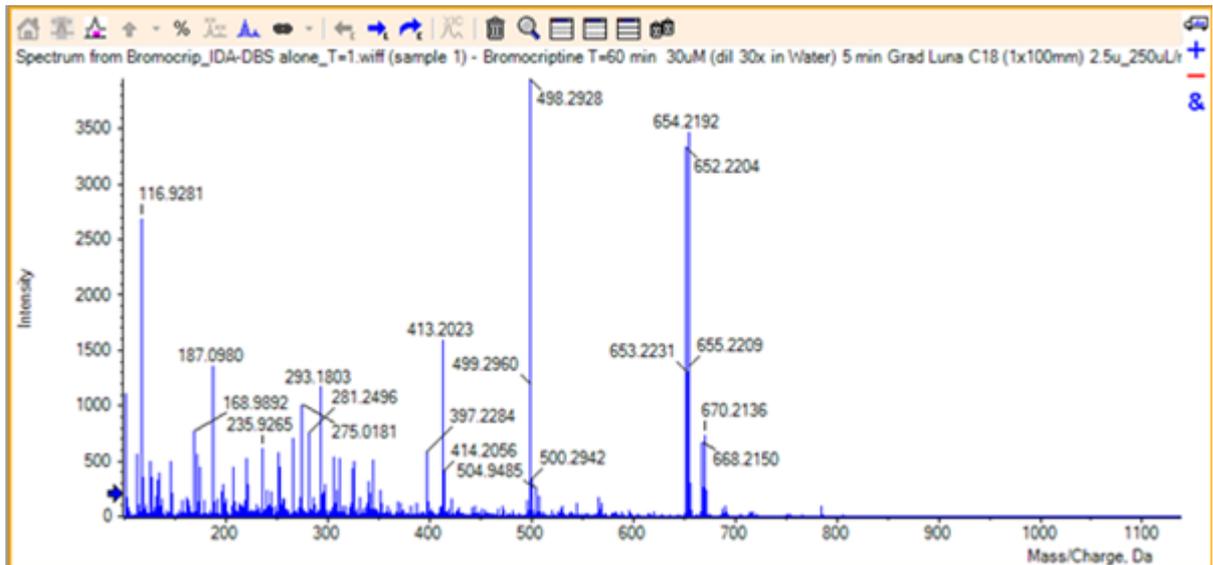
**Nota:** Potrebbe essere necessario effettuare tale procedimento in due fasi.

C'è un picco a 652.2199, molto vicino al valore atteso di 652.2140, il quale mostra anche un modello di isotopo di bromo, ma c'è un secondo cluster di isotopo di bromo a partire da 668.2158. Il rapporto esatto dei valori  $m/z$  differisce a seconda della finestra di tempo di ritenzione esatto selezionata nel XIC.

**Nota:** Lo stile di etichettatura utilizzato qui mostra un rapporto  $m/z$  e una stima dello stato di carica tra parentesi (basato sulla distanza tra i picchi). I picchi che sembrano essere monoisotopici sono anche contrassegnati con un asterisco. L'algoritmo di etichettatura non è a conoscenza di isotopi diversi da  $^{13}\text{C}$  e quindi etichetta l'isotopo  $^{81}\text{Br}$  come caricato singolarmente, ma lo contrassegna erroneamente come monoisotopico.

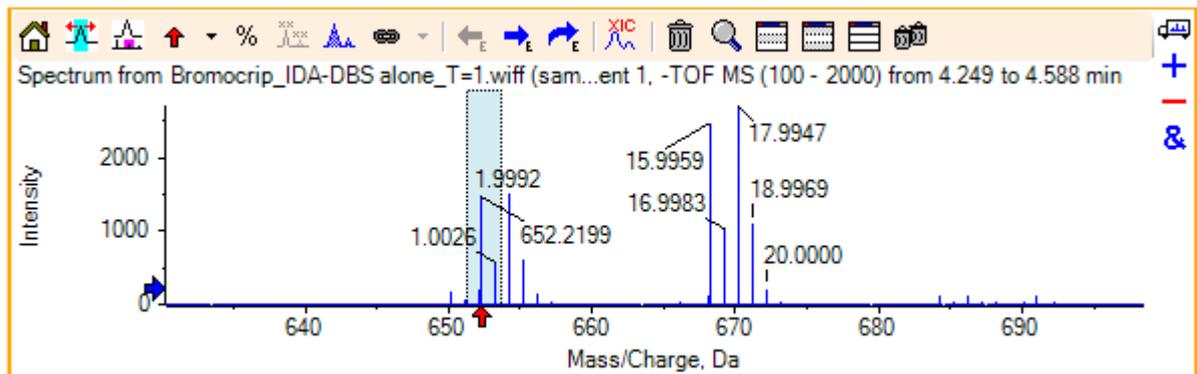
- Modificare lo stile di etichettatura allo stile predefinito facendo clic su **Edit > Options**, accedere alla scheda **Peak Labeling & Finding** e quindi modificare l'impostazione a **Mass / Charge** nel campo **Label**.
- Fare clic su **OK**.

Figura 2-12 Spettro con stile diverso di etichettatura



5. Nello spettro ingrandito, effettuare una selezione intorno al picco a 652.2199 e quindi fare clic sull'icona **Aggiunge i marcatori a freccia ai picchi selezionati**.

Figura 2-13 Mostrare uno spettro **↑** sul picco selezionato



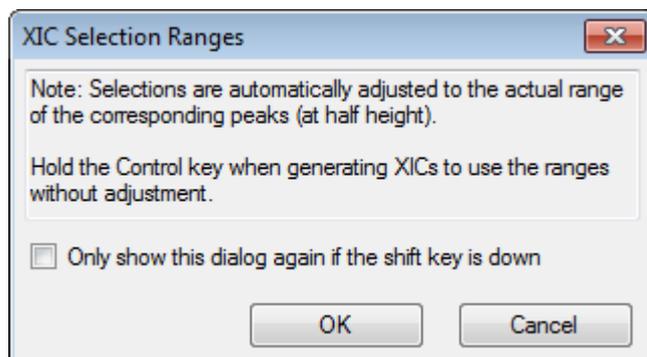
L'etichettatura della massa è ora relativa al picco selezionato, così vengono illustrate le differenze tra i picchi di massa. L'etichetta per il picco a 668.2158 riporta ora 15.9959, corrispondente alla massa di ossigeno, e suggerisce che questo picco è il metabolita idrossi-bromocriptina.

**Suggerimento!** Le frecce possono essere spostate trascinandole in un altro picco e rimuovendole selezionando **Remove All Arrows** dall'elenco accanto all'icona della freccia.

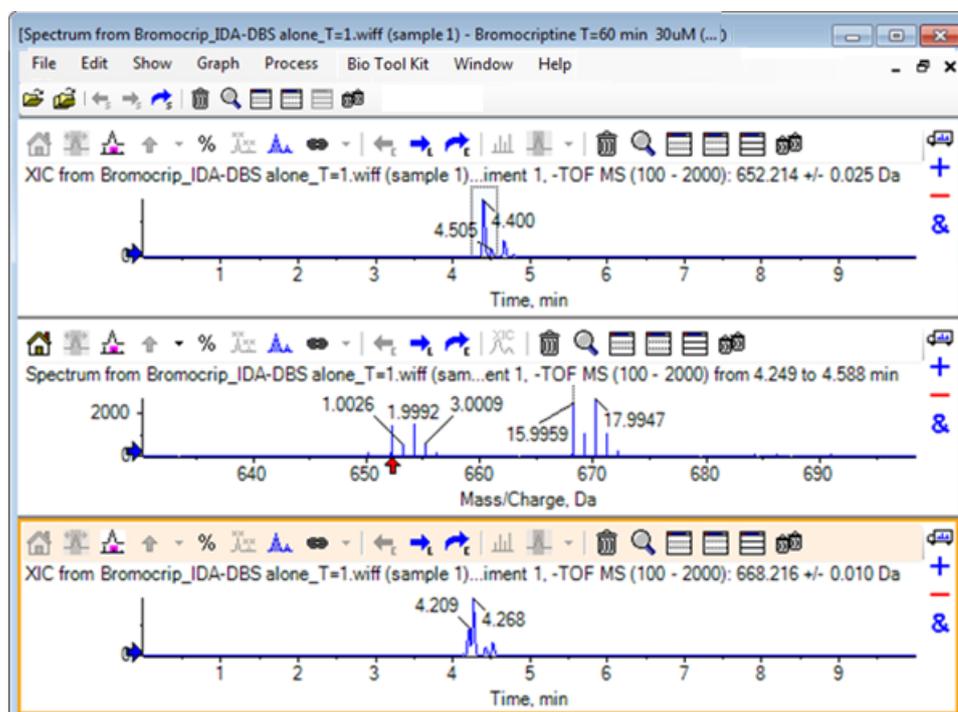
6. Effettuare una selezione intorno al picco etichettato 15.9959 e poi fare clic sull'icona **Visualizza un XIC per la selezione**.

- Nella finestra di dialogo **XIC Selection Ranges**, fare clic su **OK**.

**Figura 2-14** Finestra di dialogo XIC Selection Ranges



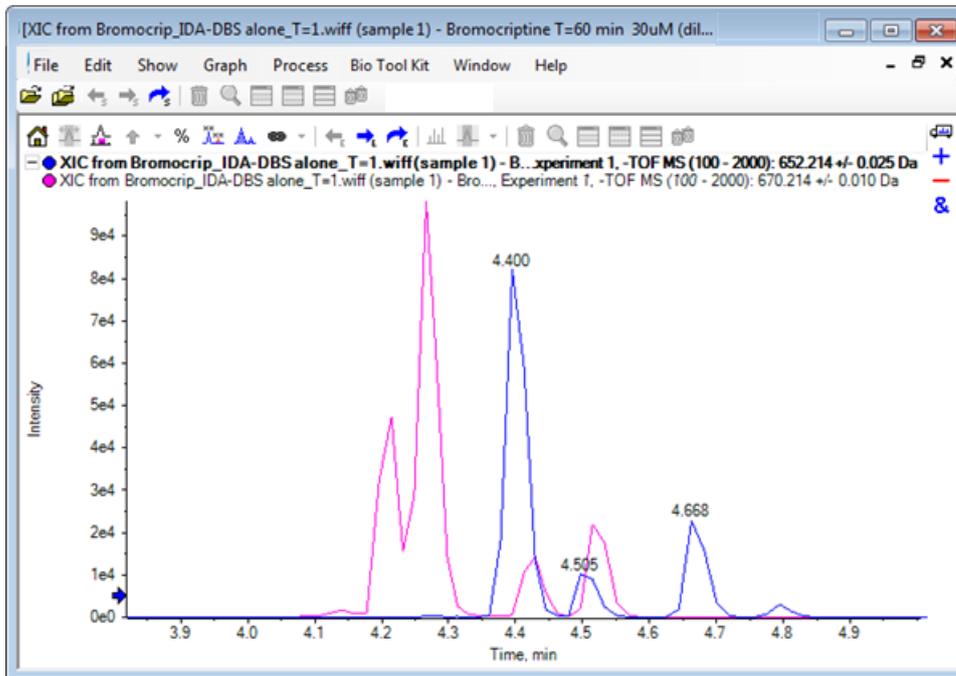
**Figura 2-15** XIC



È una soluzione utile per creare in modo interattivo XIC. Come impostazione predefinita, la larghezza utilizzata per il XIC è la larghezza del picco di massa a metà altezza e viene visualizzato un collegamento di selezione nello spettro.

- Trascinare il collegamento di selezione per aggiornare il XIC visualizzato e aggiungerne un altro ripetendo il passaggio.
- Fare clic sull'icona **Trascinare in un altro grafico per sovrapporre i dati attivi nel grafico di destinazione** in questo nuovo cromatogramma e quindi trascinare il cromatogramma nel riquadro XIC originale in modo che vengano sovrapposti.

Figura 2-16 XIC sovrapposti

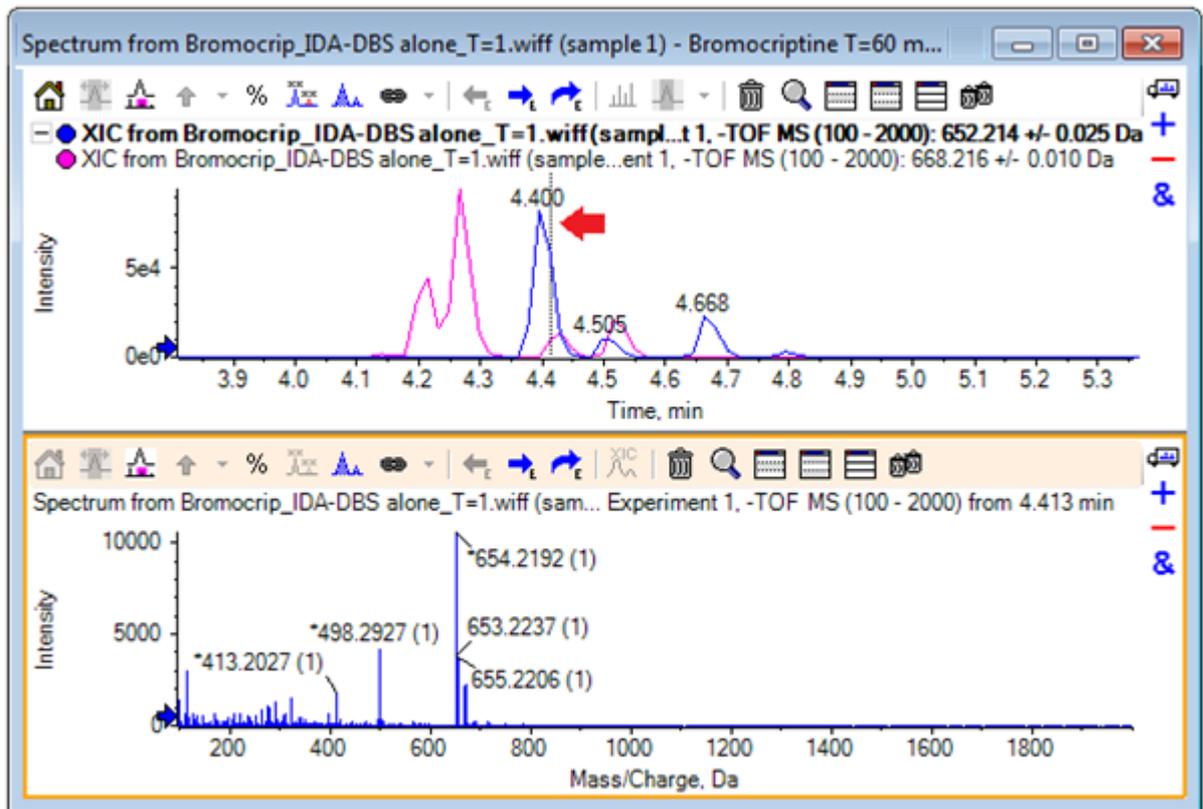


10. Nascondere o eliminare il secondo riquadro del cromatogramma e lo spettro e poi ingrandire i cromatogrammi sovrapposti per visualizzare l'area intorno a 4 min fino a 5 min.

Esistono due picchi a circa 4,4 min, uno da ogni XIC, che eluiscono circa allo stesso tempo di ritenzione, ma non esattamente. Esistono anche alcuni picchi nel cromatogramma 668.216 che indicano presumibilmente la presenza di altri metaboliti idrossilati.

11. Fare doppio clic nel riquadro del cromatogramma a 4,40 min per creare lo spettro da una singola scansione.

Figura 2-17 Spettro da una singola scansione



Una linea tratteggiata nel XIC indica la scansione visualizzata (indicata con una freccia nella Figura 2-17). Se la linea viene trascinata, lo spettro si aggiorna in modo tale da potere esplorare l'area intorno a 4,40 min. Utilizzare i tasti freccia in avanti e indietro per spostarsi di una scansione alla volta. È possibile acquisire uno spettro pulito del picco per il rapporto  $m/z$  di 652.214 spostando la linea in un'area dove il segnale per lo ione 668.215 è zero (sebbene anche qui il fondo sia abbastanza alto), ma non può essere ottenuto in questo modo uno spettro pulito per quest'ultimo.

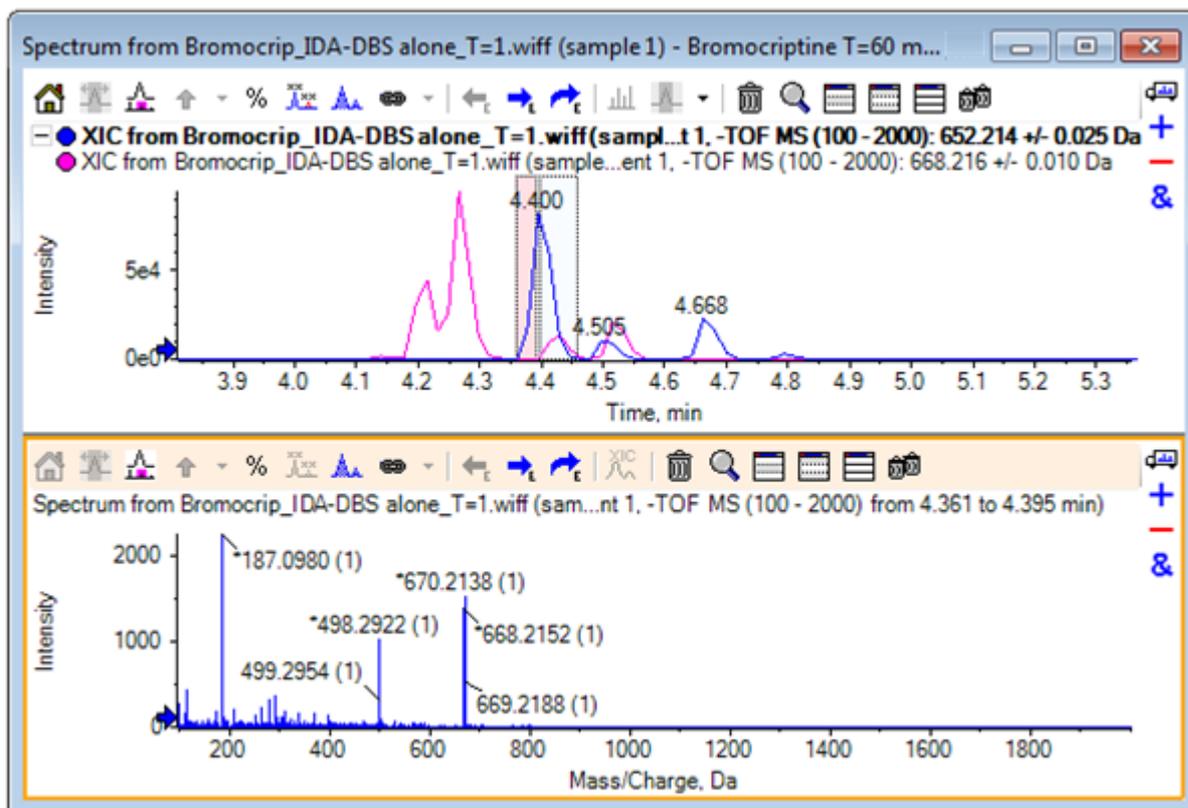
12. Eliminare il riquadro dello spettro.
13. Nel riquadro del cromatogramma, effettuare una selezione ristretta che comprenda il lato sinistro del picco 652, ma che eviti il picco 668, e fare clic sull'icona **Impostare l'intervallo di sottrazione del fondo**.

La selezione diventa rosa.

Quando un intervallo di sottrazione è stato definito, viene automaticamente sottratto da qualsiasi spettro creato successivamente. L'intervallo può essere cancellato selezionando **Clear Subtraction Range** dalla lista a cui si accede tramite la freccia piccola a destra dell'icona **Imposta intervallo di sottrazione**.

14. Effettuare un'altra selezione nel cromatogramma che includa l'apice del picco 668, ma il meno possibile del picco 652 e fare clic sull'icona **Visualizza uno spettro per la selezione**.

Figura 2-18 Spettro con fondo sottratto per il picco 668



Il risultato è uno spettro col fondo sottratto per il picco 668 che contiene una piccola parte del picco 652. Entrambe le selezioni nel cromatogramma rimangono collegate ai rispettivi spettri, anche se il fondo non è visibile, e possono essere spostate in altre parti del cromatogramma. Spostando la selezione dello spettro, si aggiorna automaticamente lo spettro visualizzato, ma se l'area di fondo viene modificata, questo sarà applicato solo agli spettri creati successivamente.

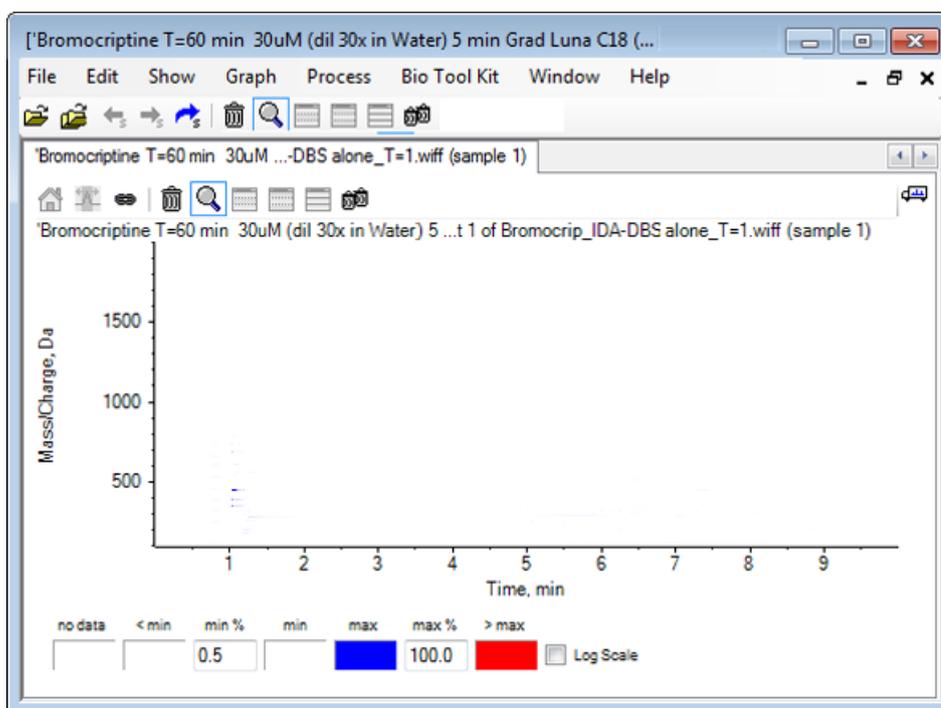
15. Fare clic sull'icona **Nasconde tutti gli altri riquadri**, fare clic sullo spettro singolo TIC e quindi fare clic sull'icona **Elimina tutti gli altri riquadri** per mostrare solo il TIC.
16. Se il riquadro TIC è stato eliminato, fare clic su **Show > Total Ion Chromatogram (TIC)**, selezionare **Period 1, Experiment 1** e poi fare clic su **OK**.

## Utilizzo di un Contour Plot

Un'alternativa alla visualizzazione di parti di un set di dati (cromatogrammi o spettri) è di utilizzare un Contour Plot per ottenere una panoramica completa di un esperimento. I Contour Plot possono essere molto informativi, ma di solito è necessario adattare i parametri di visualizzazione per ottenere i risultati migliori. In questo caso, il composto precursore è brominato e il Contour Plot fornisce un modo di localizzare i picchi con lo schema di isotopi del bromo.

1. Col TIC di esperimento singolo attivo, fare clic su **Show > LC/MS Contour Pane**, e quindi fare clic sull'icona **Espande il riquadro attivo per riempire la finestra** nella barra degli strumenti del Contour Plot risultante in modo che sia l'unico riquadro visibile.
2. Se i controlli di aspetto (caselle di colore nell'angolo inferiore sinistro) non sono visibili, fare clic con il pulsante destro del mouse nel riquadro e fare clic su **Show Appearance Control**. Fare riferimento a [Contour Plot e mappe termiche](#) e alla *Guida di riferimento*.

Figura 2-19 Contour Plot

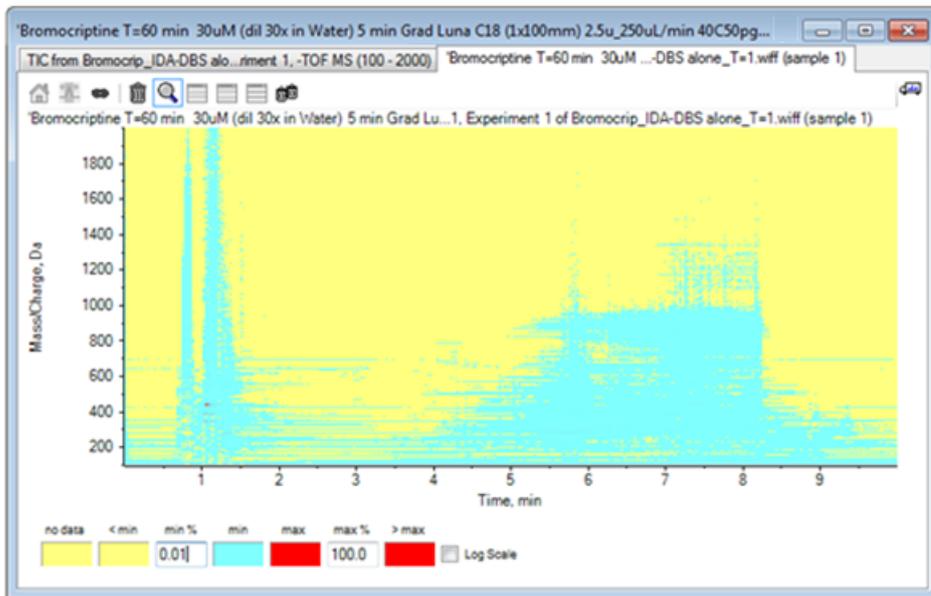


**Suggerimento!** Con i parametri predefiniti, la visualizzazione non è molto utile in quanto è dominata da picchi di basso livello e rumore che oscurano i picchi reali. È possibile generare una visualizzazione migliore in questo modo:

- Modificando l'intensità minima da mostrare. Ciò modifica tutti i punti dati sotto questo livello per disegnarli nello stesso colore dei punti in cui non esistono dati; in altri termini, diventano invisibili.
- Modificando la mappatura dei colori in modo tale che i colori disponibili coprano un intervallo di intensità più stretto che migliora la visibilità di piccoli picchi.

3. Modificare il valore **min %** a **0.01**. Ciò causa la scomparsa di tutti i punti dati con intensità minori di 0,01% del picco base.

Figura 2-20 Contour Plot



È mostrata una parte molto maggiore della struttura dei dati. Il volume vuoto e l'area di lavaggio della colonna sono trasparenti, ed esistono alcuni picchi di fondo che sono presenti in tutti i tempi di ritenzione e che sono mostrati come linee orizzontali.

4. Selezionare la casella di controllo **Log scale**.

I colori selezionati sono mappati al logaritmo dell'intensità (in percentuale dell'intensità del picco di base) che ha l'effetto di aumentare i picchi di intensità minore, ad esempio il cluster attorno a 4 min fino a 4,5 min con masse nell'intervallo da 600 a 700.

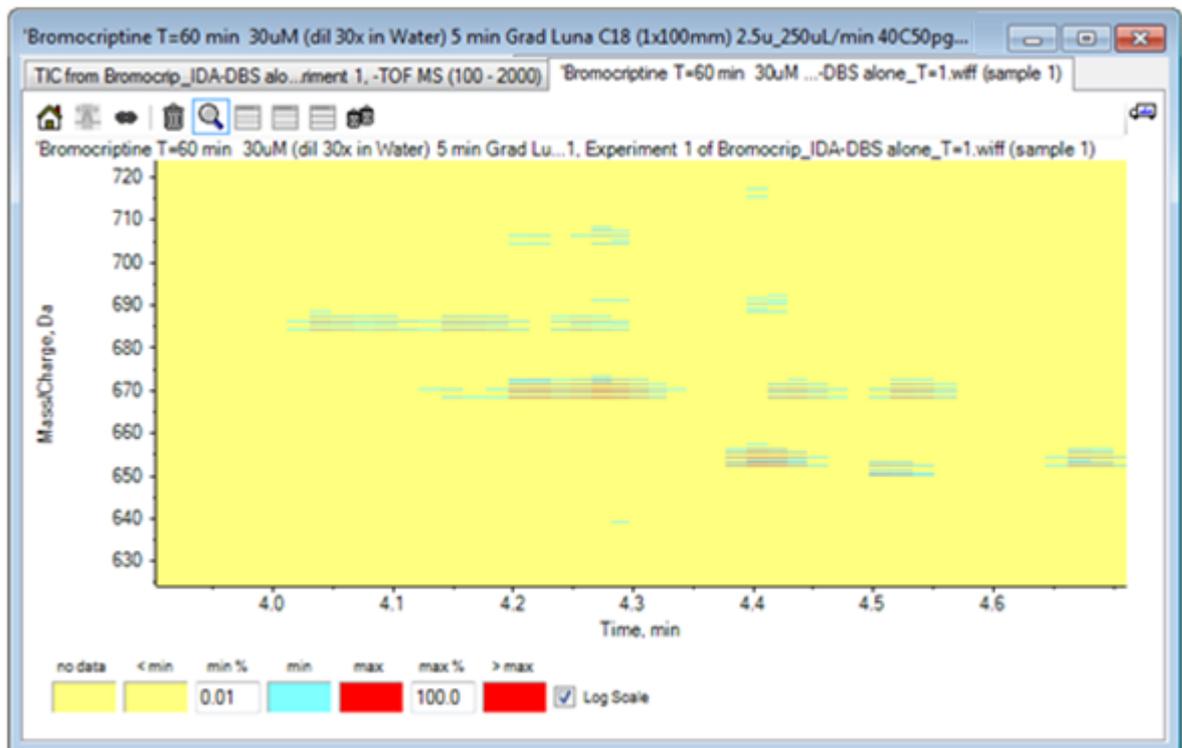
5. Selezionare questa regione e quindi fare clic sull'icona **Esegue l'ingrandimento della selezione a visualizzazione a schermo intero**.

---

**Suggerimento!** È anche possibile ingrandire gli assi x e y indipendentemente nella maniera consueta.

---

Figura 2-21 Contour Plot



La visualizzazione ora mostra che in questa regione esistono alcuni picchi brominati che è possibile distinguere per i set di quattro linee parallele che corrispondono agli isotopi  $^{79}\text{Br}$  e  $^{81}\text{Br}$  e ai relativi isotopi  $^{13}\text{C}$ .

6. Sperimentare con le impostazioni di controllo dei colori e osservare gli effetti sulla visualizzazione.
7. Al termine, chiudere la finestra.

Ciò chiude anche il file dei dati.

## Riepilogo

In questa sezione sono state trattate le seguenti attività:

- Sfogliare e aprire un file di dati per mostrare un TIC.
- Modifica della visualizzazione in modo che sia utilizzato un solo esperimento.
- Utilizzo del calcolatore di massa per determinare la massa di uno ione da una composizione elementare e utilizzo della massa per generare un XIC.
- Generazione interattiva di spettri e cromatogrammi e utilizzo di marcatori a freccia su spettri per mostrare la differenza di massa tra picchi.
- Generazione di spettri sottratti dal fondo.

## Lavorare con cromatogrammi e spettri

---

- Utilizzo di un Contour Plot per generare una panoramica di un set di dati.

Queste operazioni sono la base di tutta l'elaborazione dei dati interattivi, indipendentemente dal tipo di dati mostrato.

In un esperimento IDA, i dati degli spettri MS/MS (e forse MS3) sono raccolti automaticamente quando i dati in uno o più spettri di analisi soddisfano determinati criteri. È comune impostare i parametri in modo da evitare di raccogliere più spettri dallo stesso picco LC escludendo la massa precursore (non consentendole di agire come trigger) per un determinato periodo di tempo. Occasionalmente, è possibile raccogliere spettri ridondanti. Inoltre, poiché IDA è attivato non appena un picco soddisfa i criteri, genera tipicamente uno spettro all'inizio nel picco LC e ciò potrebbe non avere la qualità ottimale.

Il software contiene strumenti per mostrare, filtrare ed elaborare dati IDA. Alcuni di questi sono esplorati in questa sezione.

Chiudere eventuali finestre aperte prima di iniziare.

## Mostrare e unire spettri

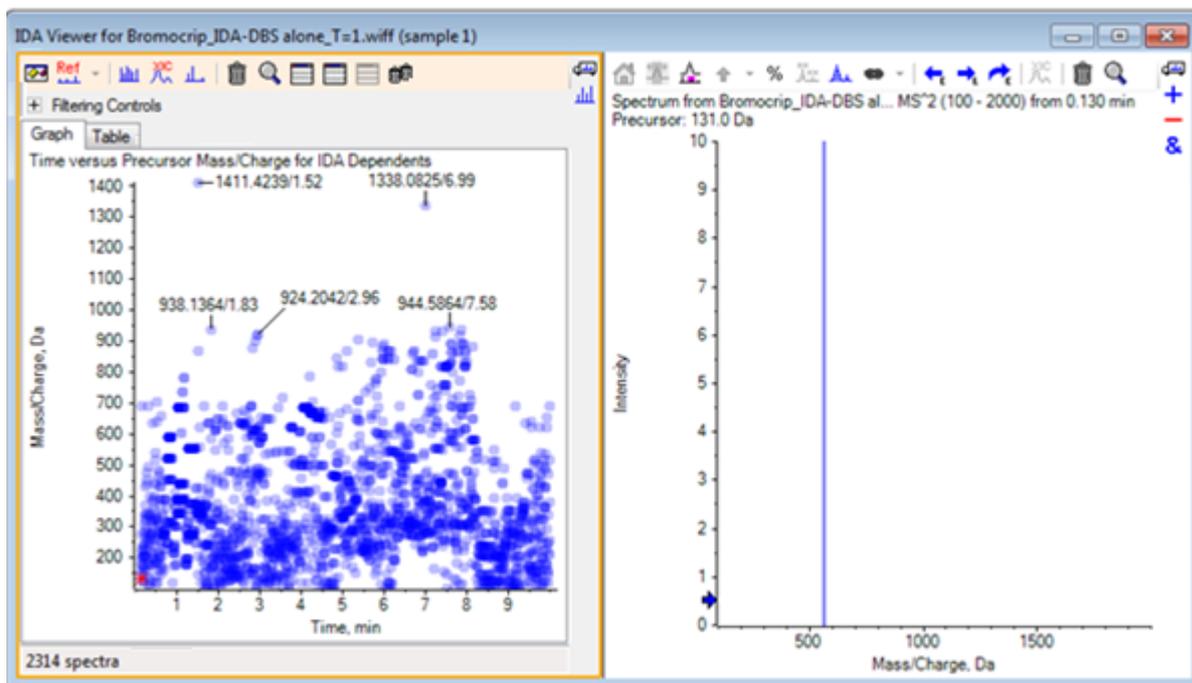
1. Fare clic sull'icona **Apri campione** nella barra degli strumenti principale.

Si aprirà la finestra di dialogo **Select Sample**.

2. Se la cartella **Sample Data** non è già selezionata, fare clic su **Browse** e spostarsi sulla cartella **Sample Data**.
3. Selezionare il file **Bromocrip\_IDA-DBS alone\_T=1.wiff** e quindi fare clic su **OK**.
4. Nella finestra di dialogo **Open IDA Sample**, fare clic su **With the IDA Explorer** e quindi fare clic su **OK**.

Il programma esamina tutti gli spettri nel file di dati e quindi genera il grafico seguente.

Figura 3-1 Visualizzatore IDA



Il pannello di sinistra contiene una scheda **Graph** e una scheda **Table**. La scheda **Graph** mostra una rappresentazione virtuale del Contour Plot in cui ogni punto dati rappresenta il tempo di ritenzione e il rapporto  $m/z$  di uno ione che è stato selezionato come ione precursore. La scheda **Table** mostra una visualizzazione tabellare dei punti dati nel Contour Plot virtuale. Il pannello destro mostra lo spettro per i punti dati selezionati. Inizialmente è mostrato il primo spettro MS/MS.

Il Contour Plot utilizza l'intensità di colore per rispecchiare l'intensità di picco. Colori più scuri indicano picchi più intensi. Le etichette sono disegnate laddove possibile, accertandosi che non si sovrappongano a punti dati o a vicende. Ingrandire il Contour Plot per esaminare un'area con maggiori dettagli e mostrare più etichette.

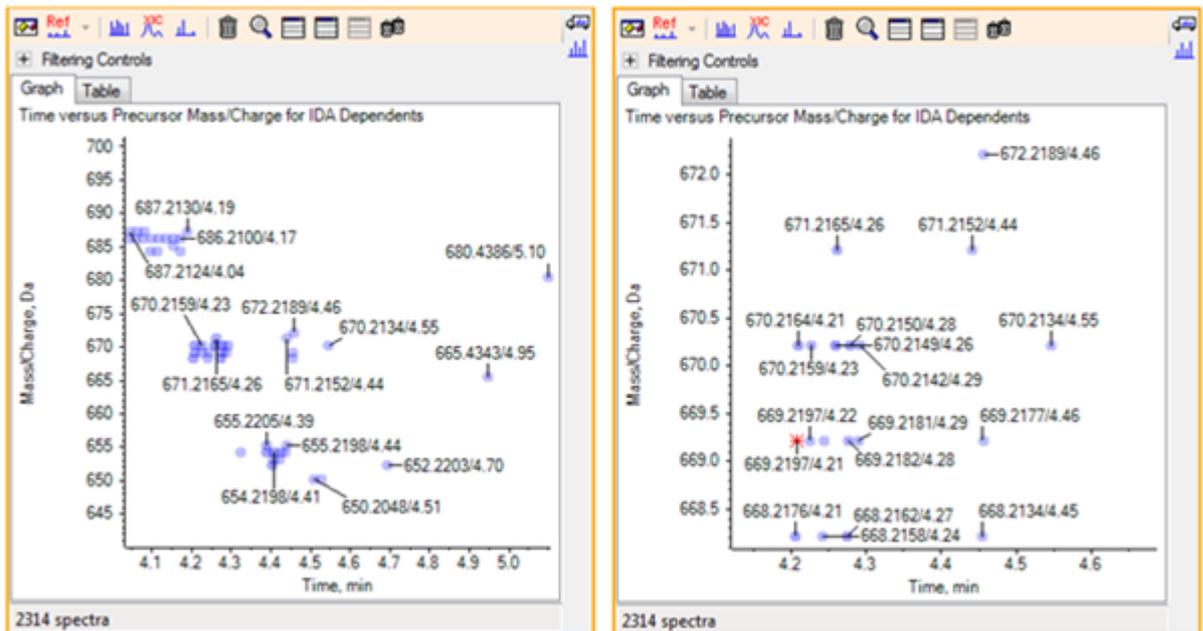
5. Nel pannello a sinistra, ingrandire la regione da 4 min a 5 min e da 640 Da a 700 Da in cui sono stati precedentemente trovati i picchi correlati alla bromocriptina.

La figura a sinistra (Figura 3-2) mostra solo il pannello sinistro. Se la visualizzazione attuale è diversa, fare clic sull'icona **Mostra opzioni** e cancellare la casella di controllo **Merge spectra with similar precursor masses** nella scheda **General** della finestra di dialogo **Options**.

Un grande numero di spettri MS/MS è stato raccolto in questa regione e, sebbene i picchi cromatografici siano molto stretti, diversi di questi sono probabilmente dagli stessi picchi. Inoltre, per ciascun picco nel cluster di isotopo sono stati raccolti degli spettri MS/MS.

6. Ingrandire ulteriormente il grafico per concentrarsi sul cluster di picchi a un rapporto  $m/z$  di 668 Da - 672 Da. Fare riferimento al pannello di destra nella Figura 3-2.

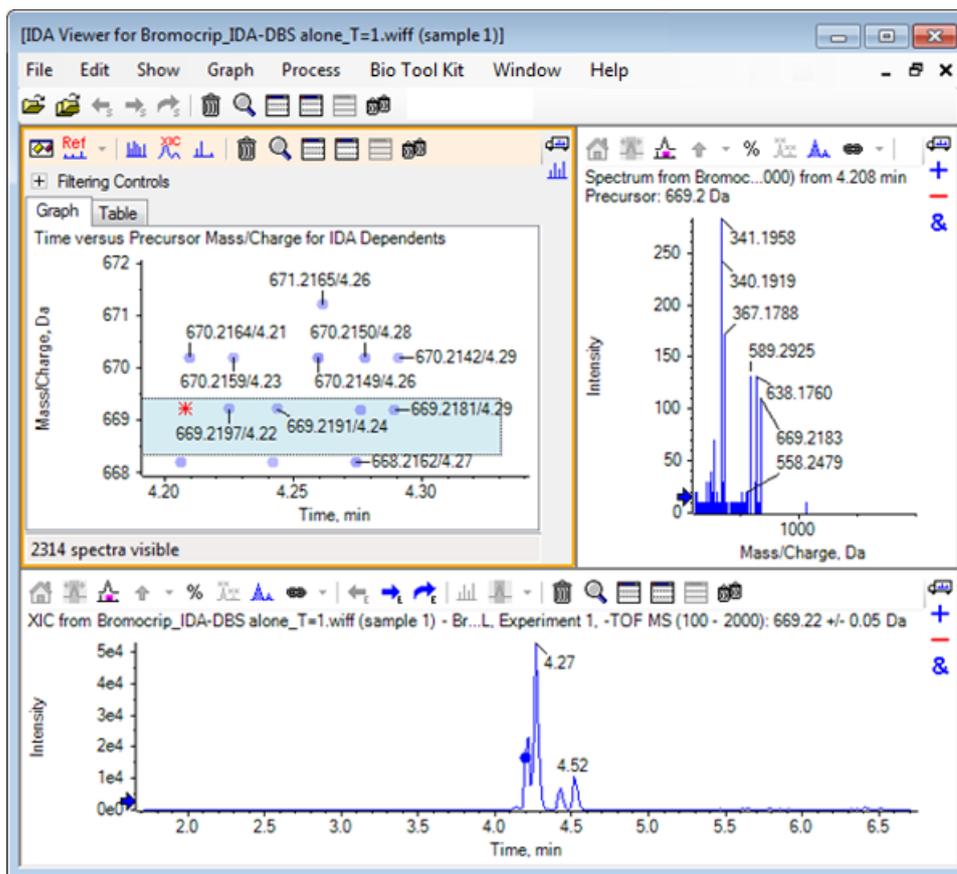
Figura 3-2 Visualizzatore IDA



7. Selezionare il primo dei picchi 669.2197 (mostrato come asterisco nel pannello di destra precedente) e quindi fare clic sull'icona **Visualizza un XIC per la selezione** per mostrare il XIC per questa massa precursore nella scansione di analisi.

La selezione iniziale del picco fa sì che sia mostrato lo spettro MS/MS corrispondente.

Figura 3-3 XIC per massa precursore nella scansione di analisi



Se esiste un punto dati non etichettato in Contour Plot, spostarvi il cursore sopra per mostrare il rapporto  $m/z$  e l'etichetta del tempo di ritenzione in modo che i tempi delle scansioni ioniche del prodotto siano relativi al cromatogramma dell'analisi.

Per il picco 669.2, le prime tre scansioni sono correlate al primo picco XIC a 4.21 min, che è anche dove è stata generata una scansione 668.2, le seconde due scansioni sono correlate al picco a 4.27 min, e l'ultima scansione è dal picco a 4.42 min (669.2177/4.46). Nessuna scansione è stata eseguita per il picco 669.2 a 4.52 min, ma una scansione è stata ottenuta per il picco 670.2.

**Nota:** I tempi di scansione sono leggermente diversi in quanto sono ottenuti sequenzialmente, anche se sono stati rilevati nella stessa scansione di analisi. I picchi degli isotopi più piccoli potrebbero non essere rilevati presto quanto quelli più grandi.

- Disegnare un rettangolo di selezione attorno alle prime cinque scansioni 669.2, fare clic con il pulsante destro del mouse, quindi selezionare **Select Points in Graph Selection**.

Ciò fa sì che il riquadro dello spettro si sovrapponga a tutti gli spettri MS/MS.

Il sistema ha acquisito più scansioni del necessario. Riducendo il numero di spettri da elaborare e unendo quelli che sono troppo vicini per essere composti diversi, possiamo ottenere risultati di qualità superiore. L'unione utilizza la massa e il tempo di ritenzione per determinare tali scansioni.

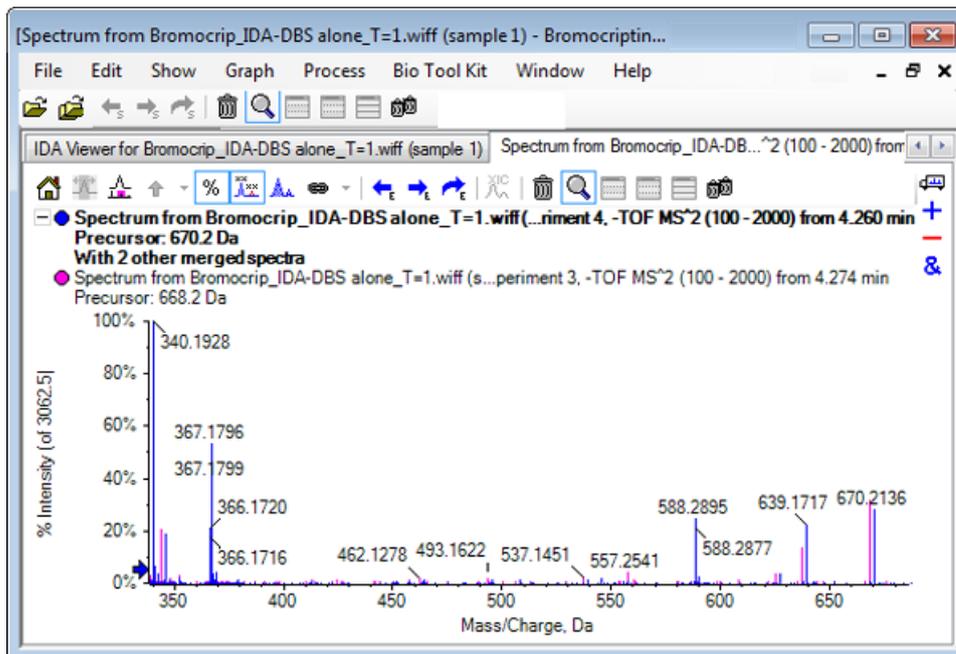
9. Fare clic sull'icona **Mostra opzioni**, selezionare la casella di controllo **Merge spectra with similar precursor masses**, quindi impostare **Mass tolerance** a **10 ppm** e **RT gap tolerance** a **0.03 min.** (i picchi in questa analisi hanno circa 2 secondi di larghezza).
10. Fare clic su **OK**.

**Nota:** Questa parte della finestra di dialogo consente inoltre agli utenti di definire la modalità di estrazione dei XIC. La larghezza di massa dovrà corrispondere alla risoluzione o larghezza di picco dello strumento ed è utile per limitare l'intervallo di tempo utilizzato in quanto ciò velocizza l'elaborazione.

L'unione dei dati in questo modo comporta tre picchi per 669.2 a 4.21, 4.28 e 4.46 min. La barra di stato nella parte inferiore del riquadro IDA Viewer mostra il progresso man mano che i dati sono uniti e quindi mostra il numero totale di spettri dipendenti dopo il completamento dell'unione.

11. Fare clic sul punto dati a 670.2149/4.26 e quindi premere il tasto **Ctrl** e fare clic sul punto a 668.2162/4.27.
12. Nel riquadro dello spettro MS/MS, fare clic sull'icona **Espande il riquadro attivo per riempire la finestra**, sull'icona **Utilizza Percentuale Asse Y**, e sull'icona **Etichettare tutte le tracce sovrapposte**, quindi ingrandire l'asse x per mostrare la regione da 340 a 680.

**Figura 3-4 Spettro: regione da  $m/z$  340 a 680 ingrandita**



Poiché questi due precursori corrispondono agli isotopi Br, gli spettri dovrebbero essere identici tranne gli ioni che conservano l'atomo Br, che sono mostrati come coppia di picchi separati da due Da. In questo esempio i frammenti (traccia 668.2) a 344.0441, 625.1765 e 637.1712 hanno conservato l'atomo Br mentre quelli a 340.1925, 367.1796 e 588.2877 no.

Collocare una freccia al picco 588.2877 e osservare che i picchi a 668 e 670 ora sono etichettati con la massa degli isotopi Br più 1, indicando che 588.2877 corrisponde alla perdita di HBr.

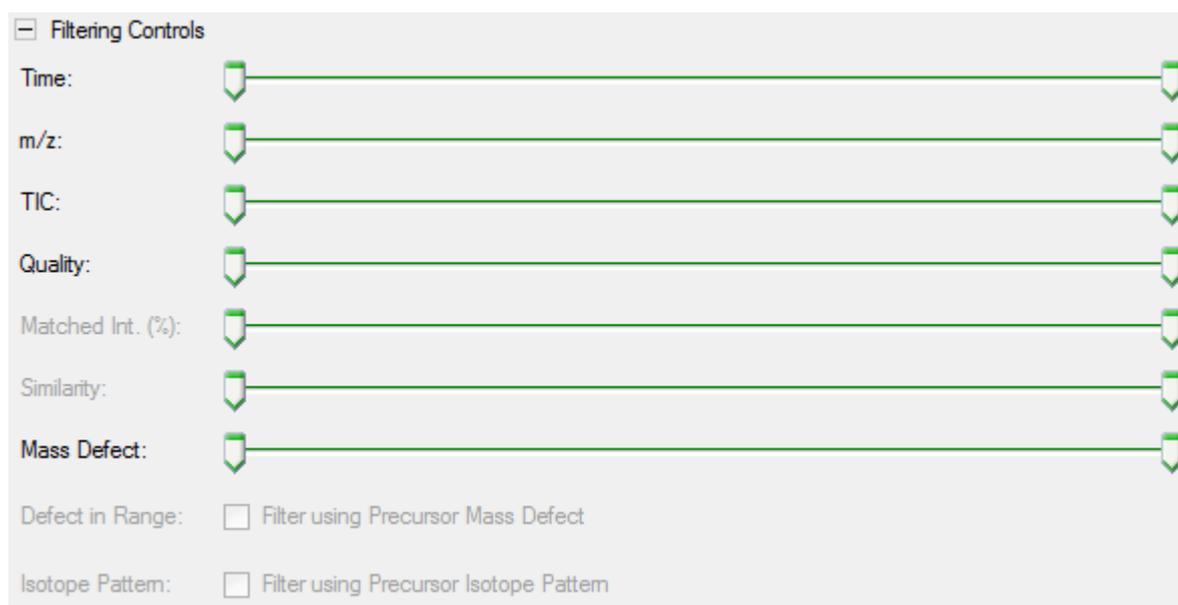
13. Rimuovere la freccia dallo spettro, fare clic sull'icona **Expands active pane to fill window**, quindi ingrandire il Contour Plot per visualizzare tutti i punti dati.

## Filtrare dati IDA

IDA Explorer contiene alcuni filtri che è possibile utilizzare per ridurre la quantità di dati da visualizzare o elaborare. Questi sono descritti in questa sezione.

1. Nel Contour Plot, fare clic sull'icona **Espande il riquadro attivo per riempire la finestra**, quindi fare clic sull'icona accanto a **Filtering Controls** appena sotto la barra degli strumenti.

Figura 3-5 Filtrare dati IDA



Questa finestra mostra diversi cursori e caselle di controllo, ciascuno corrispondente a un diverso criterio di filtro che è possibile utilizzare per adattare la quantità di dati mostrati. Il tempo di ritenzione (**Time**) e il rapporto  $m/z$  (**m/z**) possono essere selezionati qui o ingrandendo la visualizzazione.

Gli altri filtri sono:

- **TIC**: imposta limiti per l'intensità sommata di picchi nello spettro MS/MS. Questo è di solito utilizzato per rimuovere le piccole scansioni rumorose.
- **Quality**: questa è la frazione dell'intensità sommata che è maggiore dell'equivalente di 1 conteggio; in altri termini, è meno probabile che sia dovuto a rumore, ed è una stima della qualità spettrale.
- **Matched Int. (%)**: valuta la frazione dell'intensità sommata spiegata da frammenti noti e perdite neutrali quando si utilizza **Fragment Matching**.
- **Similarity**: disponibile quando è stato impostato uno spettro di riferimento. Questa funzione misura la frazione dell'intensità sommata che corrisponde ai frammenti comuni e alle perdite neutrali nello spettro di riferimento. Fare riferimento a [Utilizzare uno spettro di riferimento](#).

- **Mass Defect:** imposta un intervallo singolo per la parte frazionale di una massa. Questa funzione è utile per trovare metaboliti in quanto le trasformazioni metaboliche comuni (O, O<sub>2</sub> e così via) non cambiano significativamente il difetto dalla molecola precursore, quindi utilizzando un intervallo vicino al suo difetto può rivelare i metaboliti possibili.
- **Defect in Range:** oltre al singolo intervallo di difetto di massa, il software consente agli utenti anche di definire diversi difetti che si applicano a diversi intervalli di massa. Se tali intervalli sono definiti, questa casella di controllo consente agli utenti di determinare se applicare o meno il filtro. Gli intervalli sono impostati nella scheda **Mass Defect** della finestra di dialogo **Options**.
- **Isotope pattern:** questa casella di controllo consente agli utenti di applicare uno o più filtri di schemi di isotopi ai dati dell'analisi MS. In altri termini, un punto dati è mostrato solo se lo ione precursore selezionato ha lo schema desiderato. Questi schemi sono definiti nella scheda **Isotope Pattern** della finestra di dialogo **Options**.

Ciascuno dei semplici filtri ha due cursori, in modo che sia possibile definire un intervallo. Fare doppio clic su qualsiasi cursore e digitare direttamente un valore.

2. Sperimentare con le impostazioni dei cursori e notare in particolare che anche basse impostazioni minime per valori **TIC** (ad esempio 1e3) o **Quality** (1) hanno un effetto drammatico. Impostare il filtro **TIC** inferiore a 2e3 e tutti gli altri a 0.

Il difetto di massa della bromocriptina è di circa 0.22, quindi è improbabile che i metaboliti semplici abbiano valori maggiori di questo o molto minori.

3. Impostare i filtri **Mass Defect** a 0.18 e 0.23 e notare che fra i picchi restanti vi sono quelli nelle vicinanze di 4.5 min e 650 Da e che esiste un solo punto dati da un rapporto *m/z* di 652.2211 in questa regione (4.40 min).
4. Nascondere i controlli del filtro facendo clic sull'icona accanto a **Filtering Controls**.

---

**Suggerimento!** Cambiare i filtri che sono visibili facendo clic con il pulsante destro del mouse nell'area di filtro, selezionando **Filters** e quindi selezionando quelli che sono appropriati.

---

## Utilizzare uno spettro di riferimento

1. Nella planimetria con curve di livello, fare clic sul punto di dati a 652.2211/4.40 (la stessa bromocriptina) e poi fare clic sull'icona **Impostare spettro di riferimento (per punteggio di somiglianza)**.

---

**Nota:** Potrebbe essere necessario ingrandire prima il grafico.

---

2. Fare clic sulla freccia accanto all'icona **Impostare spettro di riferimento (per punteggio di somiglianza)** e assicurarsi che **Overlay Reference Spectrum** sia selezionato.
3. Fare clic sul punto di dati a 654.2185/4.39.

Con uno spettro di riferimento definito e **Overlay Reference Spectrum** selezionato, gli spettri mostrati hanno anche lo spettro di riferimento sovrapposto, così possono essere facilmente confrontati. È utile quando si lavora con metaboliti, perché fornisce un modo rapido di determinare quali picchi siano spostati e quali no.

Abbiamo fatto il riferimento dello spettro MS/MS dello ione precursore per l'isotopo di bromo di massa inferiore e abbiamo sovrapposto lo spettro per l'isotopo di massa superiore, così abbiamo una visualizzazione simile a quella generata in precedenza per il picco di 668.2, vale a dire ioni contenenti bromo che possono essere identificati dalla presenza di picchi separati da due Da.

4. Fare clic sull'icona **Espande il riquadro attivo per riempire la finestra** e poi, nel tracciato con curve di livello, fare clic su **Table** (appena sotto **Filtering Controls**).

---

**Nota:** Se necessario, spostare il riquadro dello spettro sotto la tabella (tramite l'icona Trascinare la selezione per riorganizzare i riquadri) affinché tutte le colonne siano visibili.

---

La tabella mostra le stesse informazioni dell'explorer grafico, ma fornisce ulteriori dettagli. Inoltre, risponde ai controlli di filtro affinché le due visualizzazioni contengano gli stessi spettri. La tabella è collegata alla visualizzazione dello spettro, così la selezione delle righe comporta l'aggiornamento dello spettro e le righe possono essere classificate facendo clic sulle intestazioni della colonna.

Quando viene definito uno spettro di riferimento, vengono mostrate due colonne supplementari: **Delta m/z** mostra la differenza tra la massa precursore di riferimento e lo spettro corrispondente alla riga. **Similarity** mostra la somiglianza fra i due spettri.

5. Fare clic su **Delta m/z** per ordinare la tabella e osservare che contiene svariati picchi che differiscono di circa 15.995 (la massa dell'ossigeno) e uno a 31.990 ( $O_2$ ) che sono probabilmente metaboliti idrossi-bromocriptina.
6. Fare clic su una riga della tabella per mostrare gli spettri associati.

---

**Nota:** Questi spettri hanno valori molto somiglianti alle scansioni con le masse precursori superiori di due Da che sono ottenute dagli ioni contenenti  $^{81}\text{Br}$ .

---

## Riepilogo

In questa sezione sono state trattate le seguenti attività:

- Esaminare un file IDA utilizzando le visualizzazioni IDA Explorer grafiche e tabellari.
- Unione di spettri correlati dopo aver determinato che questo è richiesto.
- Filtrare il numero di spettri mostrati utilizzando TIC e i filtri di difetto di massa.
- Sovrapposizione di spettri in modo che possano essere confrontati.
- Definizione di uno spettro di riferimento e utilizzo della tabella per trovare probabili metaboliti.

Queste operazioni sono fondamentali per l'elaborazione dei dati IDA.

La sezione successiva descrive come utilizzare gli strumenti della struttura utilizzando lo spettro MS/MS della bromocriptina.

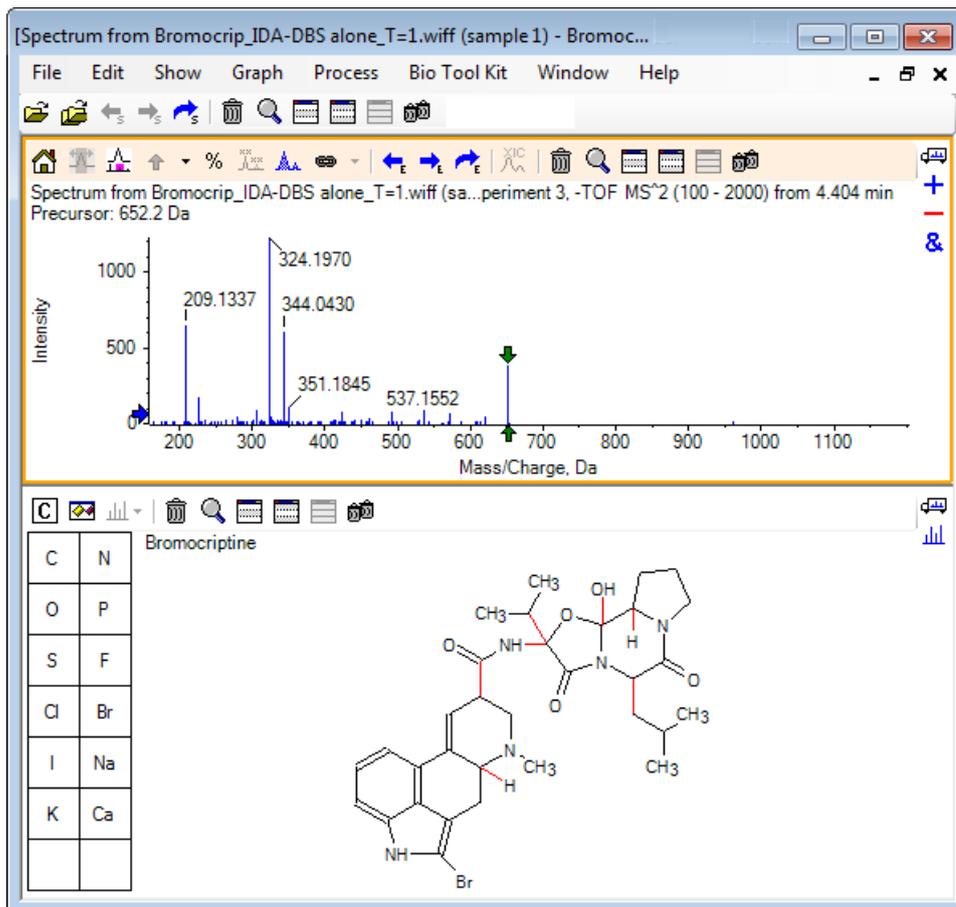
Il software contiene strumenti che permettono di collegare le masse degli ioni alle strutture (salvate come file .mol) e di esplorare possibili siti per biotrasformazioni.

## Collegare una struttura a uno spettro MS/MS

1. Localizzare lo spettro MS/MS della bromocriptina, 652.2211/4.40. Fare riferimento a [Lavorare con IDA Explorer](#).
2. Fare clic sull'icona **Nasconde tutti gli altri riquadri** nel Contour Plot in modo che sia visibile solo lo spettro.
3. Fare clic su **File > Open Mol File**.
4. Nella finestra di dialogo **Select Mol File**, selezionare il file **Bromocriptine.mol** e quindi fare clic su **Open**. Per informazioni sui percorsi dei file dati installati, fare riferimento a [Organizzazione](#).

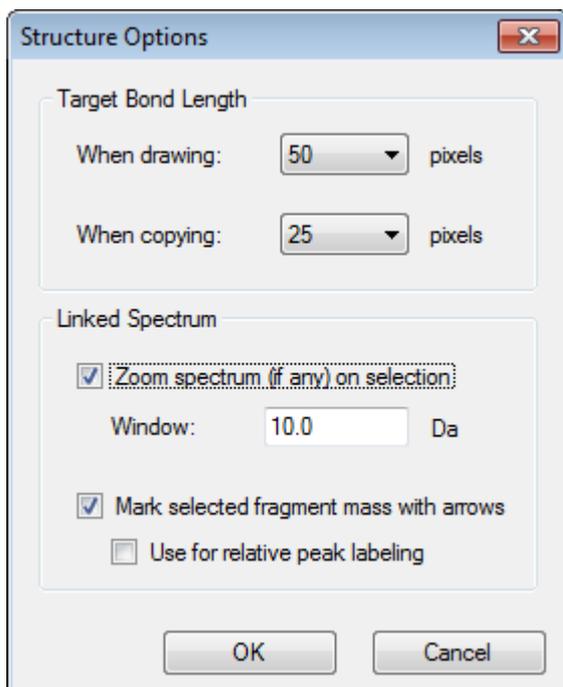
Un nuovo riquadro si apre accanto allo spettro per mostrare la struttura e gli strumenti.

Figura 4-1 Struttura della bromocriptina



5. Fare clic sulla finestra di dialogo **Show options** nel riquadro Structure, accertarsi che siano selezionate le caselle di controllo **Zoom spectrum (if any) on selection** e **Mark selected fragment mass with arrows**, quindi fare clic su **OK**. È possibile lasciare invariati gli altri parametri.

Figura 4-2 Finestra di dialogo Structure Options



Lo spettro e la struttura sono automaticamente collegati in quanto lo spettro era attivo quando era stato creato il riquadro Structure. Collegare manualmente una struttura a uno spettro trascinando l'icona **Displays a spectrum for selection** sullo spettro appropriato.

Il trascinamento nel riquadro Structure fa sì che una linea (un lazo) segua il cursore, consentendo agli utenti di selezionare, in tutto o in parte, la struttura che è quindi disegnata in grassetto. Poiché esiste uno spettro collegato, questo ingrandisce e scorre per mostrare la regione attorno alla massa della sottostruttura selezionata.

- Disegnare un lazo attorno all'intera molecola e la visualizzazione cambia per mostrare il picco a un rapporto  $m/z$  di 652.2177, che corrisponde allo ione  $(M - H)^-$ .

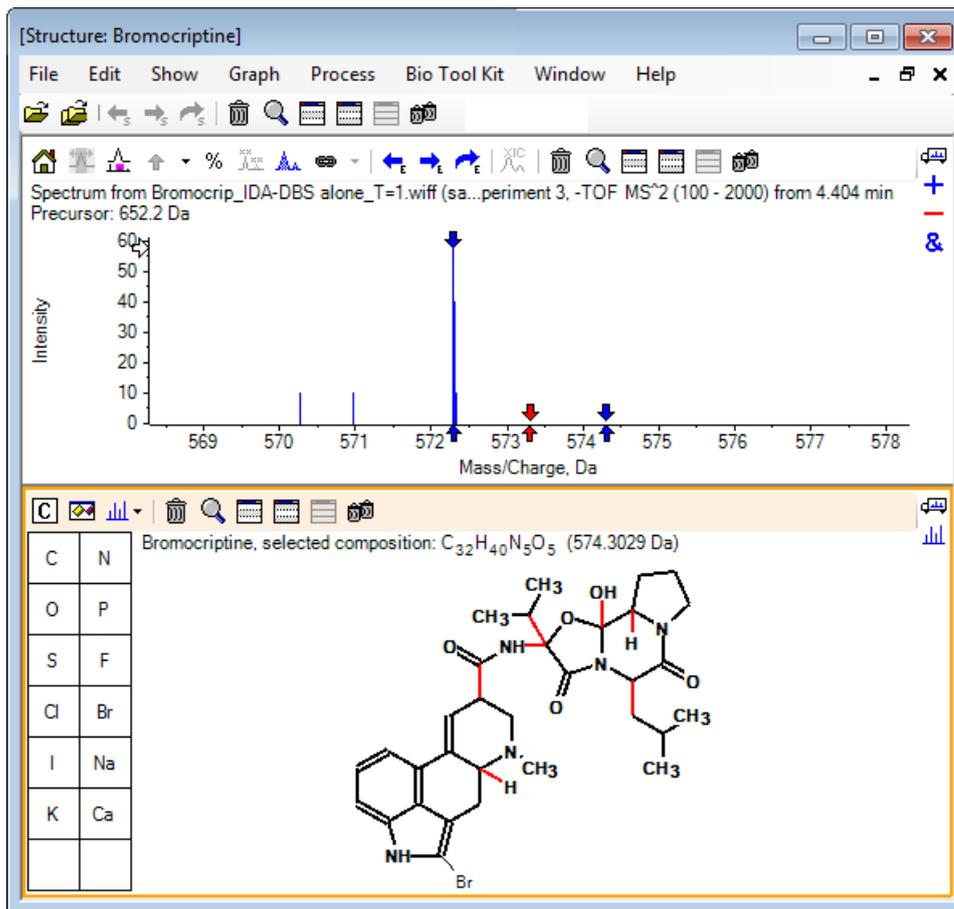
Poiché la casella di controllo **Mark selected fragment mass with arrows** è stata selezionata, una freccia rossa è disegnata sopra e sotto il picco, indicando che questa è la massa prevista di uno ione corrispondente alla regione selezionata (ovvero  $(M - H)^-$  poiché questi dati sono in modalità negativa).

**Nota:** Il titolo del riquadro Structure indica la composizione in termini di elementi e la massa del composto neutrale corrispondente alla selezione (in altri termini,  $C_{32}H_{40}N_5O_5Br$  con una massa di 653.2213 Da).

Se si seleziona **Mark selected fragment mass with arrows**, una freccia verde è disegnata sul picco 652.2177 quando nel riquadro Structure non è selezionato nulla. Ciò perché la freccia verde contrassegna il complemento della selezione attuale e senza alcuna selezione il complemento è l'intera molecola.

- Selezionare l'intera molecola, eccetto l'atomo di bromo. Fare riferimento alla [Figura 4-3](#).

Figura 4-3 Struttura della bromocriptina



**Nota:** L'atomo di bromo è l'unico in caratteri normali e per cui il titolo nel riquadro Structure mostra la composizione C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> con una massa di 574.3029 Da. Nello spettro, la freccia rossa indica la massa prevista della selezione; in altri termini, la massa dello ione molecolare (M – H)<sup>-</sup> meno la massa del bromo, ed esistono frecce a distanza di 1 Da su uno dei lati. Per gli atomi di idrogeno aggiuntivi è comune essere guadagnati o persi durante la frammentazione e il software indica questa possibilità disegnando una coppia di frecce blu a +1 e -1 per ciascun legame rotto. In questo caso è rotto solo un legame, quindi esistono solo due frecce aggiuntive.

Il picco effettivo nello spettro corrisponde a una di queste frecce, indicando che un atomo extra di idrogeno è stato perso, cioè HBr, in modo che la massa dello ione corrisponda a (M – H – HBr)<sup>-</sup>.

## Lavorare con i frammenti

Il software contiene un predittore ione frammentato che può generare la massa delle specie formate rompendo i legami e aggiungendo o rimuovendo gli atomi di idrogeno.

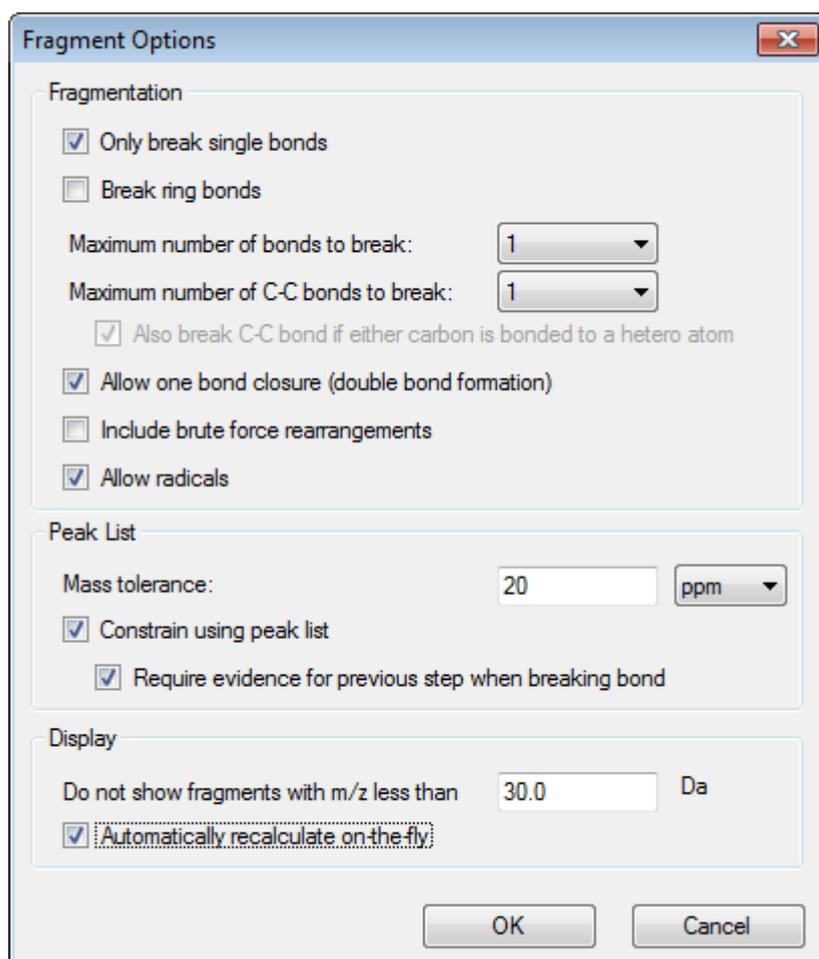
**Nota:** La previsione è puramente aritmetica, non utilizza la logica chimica e tende a sovrastimare i frammenti prodotti, ma è uno strumento utile per analizzare frammenti.

1. Col riquadro Structure attivo, fare clic su **Show > Fragments Pane**.

Può essere mostrata una barra di progressione, a seconda delle impostazioni nella finestra di dialogo **Fragment Options**. Fare riferimento alla [Figura 4-4](#).

2. Fare clic sull'icona **Mostra finestra di dialogo delle opzioni**, impostare i parametri come mostrato nella [Figura 4-4](#), quindi fare clic su **OK**.

**Figura 4-4** Finestra di dialogo **Fragment Options**



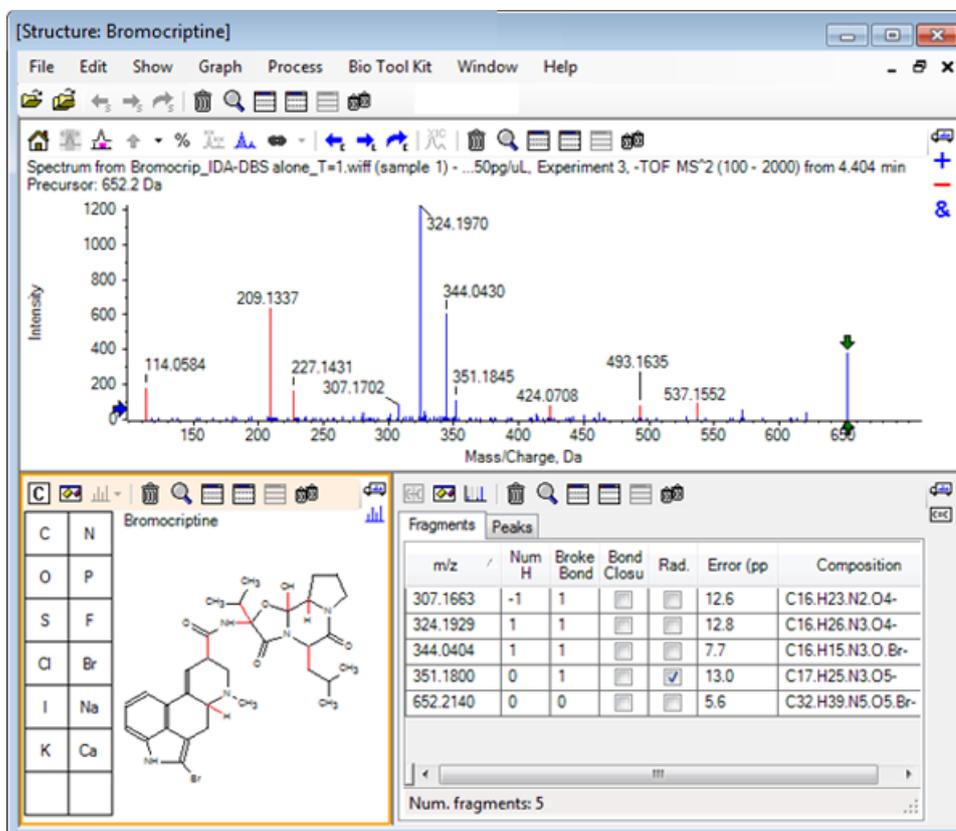
Impostare le opzioni in modo che sia prodotto un piccolo insieme di frammenti semplici e quindi aumentare il numero e il tipo dei legami rotti nella misura necessaria per spiegare gli ioni osservati. Consentire la rottura di molti legami rallenta il programma e genera un grande numero di frammenti improbabili.

La maggior parte dei parametri nella finestra di dialogo **Fragment Options** è descritta nella *Guida di riferimento*, ma va notato quanto segue:

- Se si seleziona la casella di controllo **Automatically recalculate on-the-fly**, qualsiasi modifica allo spettro (passaggio a uno diverso, adattamento dei parametri) o selezione causa il ricalcolo dei frammenti. Questo è di solito il comportamento desiderato, ma può avere un impatto sulla velocità dell'analisi se le opzioni sono impostate in modo da produrre molti frammenti. Se non si utilizza questa opzione, fare clic sull'icona **Frammento**.
- **Constrain using peak list** significa che il software mostra solo frammenti che corrispondono ai picchi nello spettro con la tolleranza appropriata.
- **Require evidence for previous step when breaking bond** è efficace solo quando si rompe più di un legame. Il programma per prima cosa rompe un legame e quindi considera la rottura dei legami nelle parti risultanti. Se si seleziona questa opzione, devono essere presenti ioni corrispondenti alle parti prima che siano ulteriormente rotti.

Con questi parametri, la visualizzazione dovrebbe assomigliare alla [Figura 4-5](#) ma dovrebbe essere leggermente diversa in quanto sono considerati solo i picchi superiori all'impostazione della soglia (anche questa etichettata).

**Figura 4-5** Struttura della bromocriptina



**Nota:** I picchi nello spettro sono colorati per indicare quelli assegnati (blu) e quelli non assegnati (rosso) corrispondenti ai picchi nella scheda Fragments.

Il riquadro Fragments contiene due schede:

- **Fragments:** in questo esempio, l'elenco è breve in quanto non sono generati molti frammenti in queste condizioni e solo alcuni di questi corrispondono ai picchi nello spettro, come richiesto, in quanto è stata selezionata la casella di controllo **Constrain using peak list**.
- **Peaks:** mostra una tabella che elenca i picchi nello spettro che sono superiori alla soglia, le relative intensità, e se siano stati assegnati o meno a un frammento. Per i picchi assegnati è anche mostrato l'errore della massa.

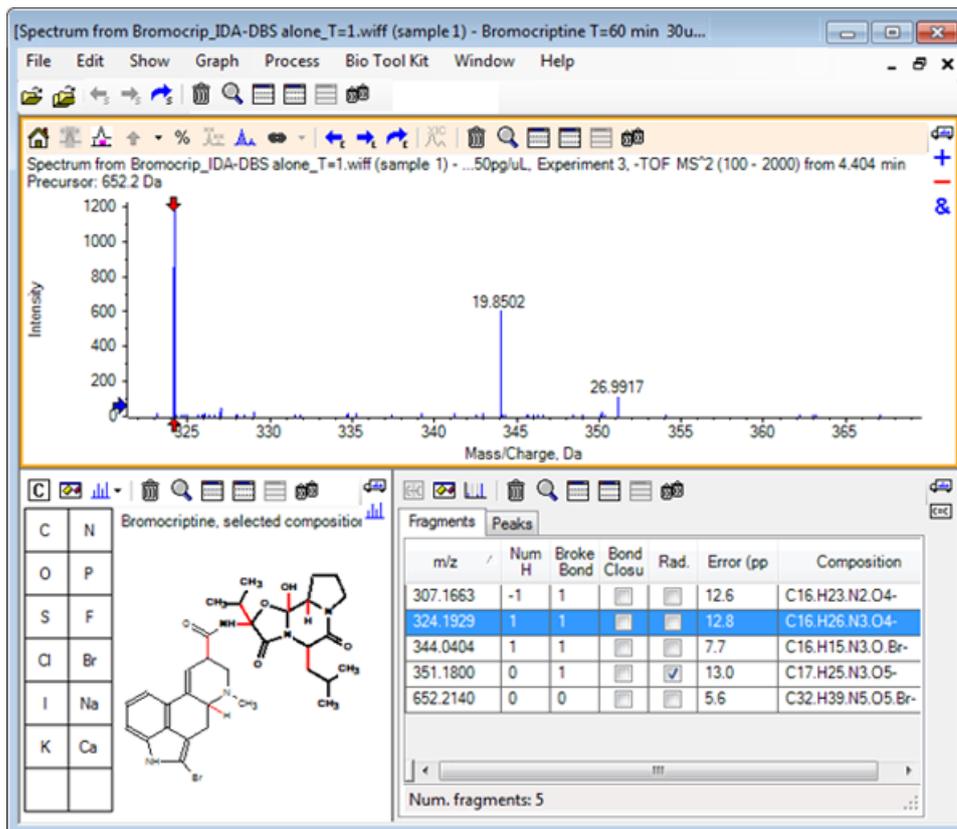
Figura 4-6 Riquadro Fragments

Mass/Charge	Intensity (%)	Assign	Error (ppm)	Radical
114.0584	14.88	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
209.1337	52.33	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
227.1431	13.74	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
307.1702	7.20	<input checked="" type="checkbox"/>	12.6	<input type="checkbox"/>
324.1970	100.00	<input checked="" type="checkbox"/>	12.8	<input type="checkbox"/>
344.0430	49.22	<input checked="" type="checkbox"/>	7.7	<input type="checkbox"/>
351.1845	9.08	<input checked="" type="checkbox"/>	13.0	<input checked="" type="checkbox"/>
424.0708	6.62	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

Matches: 5 of 11 peaks, 66.0% of total intensity

3. Nella scheda **Fragments**, selezionare la riga per un rapporto  $m/z$  di 324.1929. Il picco è contrassegnato con una freccia rossa per mostrare che questa è la massa prevista, e la sottostruttura corrispondente è disegnata in grassetto nel riquadro Structure.

Figura 4-7 Finestra di dialogo Fragmentation



**Nota:** La composizione e la massa nel titolo del riquadro Structure ora rispecchiano la massa dello ione piuttosto che il valore neutro.

- Esaminare le strutture assegnate per gli altri frammenti.

Sono tutte correlate al legame ammidico centrale che separa le due parti cicliche della molecola e sembrano possibili.

**Nota:** Le composizioni elementari assegnate sono coerenti agli spettri sovrapposti che sono stati generati in [Utilizzare uno spettro di riferimento](#) dove la presenza di Br nei frammenti è stata dedotta confrontando gli spettri di  $^{79}\text{Br}$ - e  $^{81}\text{Br}$ - contenenti ioni molecolari.

- Ingrandire lo spettro in modo che sia visibile l'intero intervallo di massa.

Sono assegnati due dei picchi maggiori, un  $m/z$  di 324.1970 e un  $m/z$  di 344.0430, corrispondenti alle due dimensioni della molecola, e sono disegnati in blu. Tuttavia, sono presenti alcuni picchi non ancora assegnati.

- Aprire la finestra di dialogo **Options** e quindi modificare **Maximum number of bonds to break** in **2**.

---

**Nota:** A seconda dell'impostazione della soglia, questa opzione potrebbe fare sì che alcuni piccoli picchi siano assegnati, ma non quelli più abbondanti (rapporti  $m/z$  di 114.0584, 209.1337 e 227.1431 ad esempio). Se lo spettro è etichettato rispetto a una freccia rossa, fare clic nel riquadro Structure per cancellare eventuali selezioni per mostrare i valori di massa assoluti.

---

7. Selezionare la casella di controllo **Break ring bonds** e quindi fare clic su **OK**.

Ora corrispondono diversi ioni aggiuntivi, compresi quelli a rapporti  $m/z$  di 209.1337 e 227.1431. La selezione delle nuove masse nel riquadro **Fragments** per evidenziare le sottostrutture mostra che queste sono correlate a scissioni dell'anello nella parte peptidica ciclica della molecola. È probabile che questi ioni siano utili nella determinazione dei siti di trasformazione metabolica in questa regione.

## Aggiungere sottostrutture a uno spettro

Selezionare parti della struttura e utilizzarle per annotare lo spettro per riferimento futuro. A seconda della dimensione del riquadro dello spettro, utilizzare la finestra di dialogo **Options** nel riquadro della struttura per adattare **Target Bond Length** per la copia.

1. Nella finestra di dialogo **Fragment Options**, cancellare la casella di controllo **Break ring bonds** per semplificare il numero di frammenti.
2. Nel riquadro dei frammenti, selezionare una riga corrispondente a uno degli ioni più abbondanti per evidenziare la sottostruttura corrispondente.
3. Fare clic all'interno del riquadro della struttura.
4. Fare clic su **Edit > Copy**.
5. Fare clic con il pulsante destro del mouse nel riquadro dello spettro attivo e quindi fare clic su **Paste Image**.

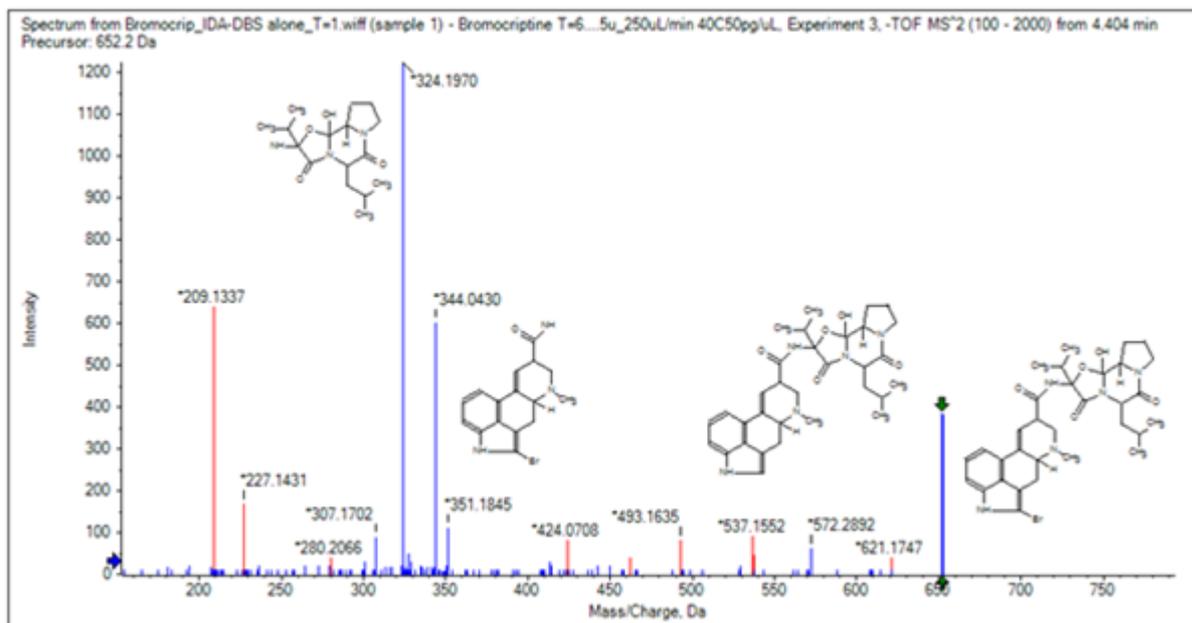
Ciò fa sì che un'immagine della sottostruttura sia incollata nel riquadro dello spettro.

6. Spostare l'immagine trascinandola nella posizione desiderata. È possibile eliminare un'immagine completamente, facendo clic con il pulsante destro del mouse e quindi selezionando **Delete Image**.

Le immagini sono collegate allo spettro, ovvero alle posizioni di intensità di massa, quindi si spostano quando gli utenti scorrono e utilizzano lo zoom.

7. Ripetere i passaggi da 2 a 6 per altri ioni frammentati per generare un'immagine finale simile alla [Figura 4-8](#).

Figura 4-8 Spettro con sottostrutture aggiunte



8. Fare clic su **File > Print > Print Preview Window** per verificare il posizionamento delle sottostrutture.

Poiché gli ioni corrispondenti sono disegnati in blu, sono facili da associare alle strutture corrispondenti.

9. Copiare l'immagine e quindi incollarla in un programma di disegno per aggiungere linee o altre funzionalità.

## Lavorare con spettri MS/MS correlati

In alcune applicazioni, è utile essere in grado di confrontare lo spettro di un composto modificato, ad esempio un metabolita, allo spettro e alla struttura del composto precursore.

1. Utilizzare IDA Explorer per mostrare nuovamente il Contour Plot. Selezionare il picco a 668.2176/4.21 e quindi nascondere il Contour Plot.

Poiché i riquadri Structure e Fragments sono collegati allo spettro, sono stati aggiornati per rispecchiare il nuovo spettro, ma la struttura è ancora quella del composto precursore mentre lo spettro è stato ottenuto da un composto con un atomo di ossigeno aggiuntivo (maggiore di 16 Da in termini di massa). In molti casi esistono ancora alcune corrispondenze, indicando le parti della molecola che non sono modificate, ma in questo caso nessuno degli ioni significativi corrisponde ed è disegnato in rosso.

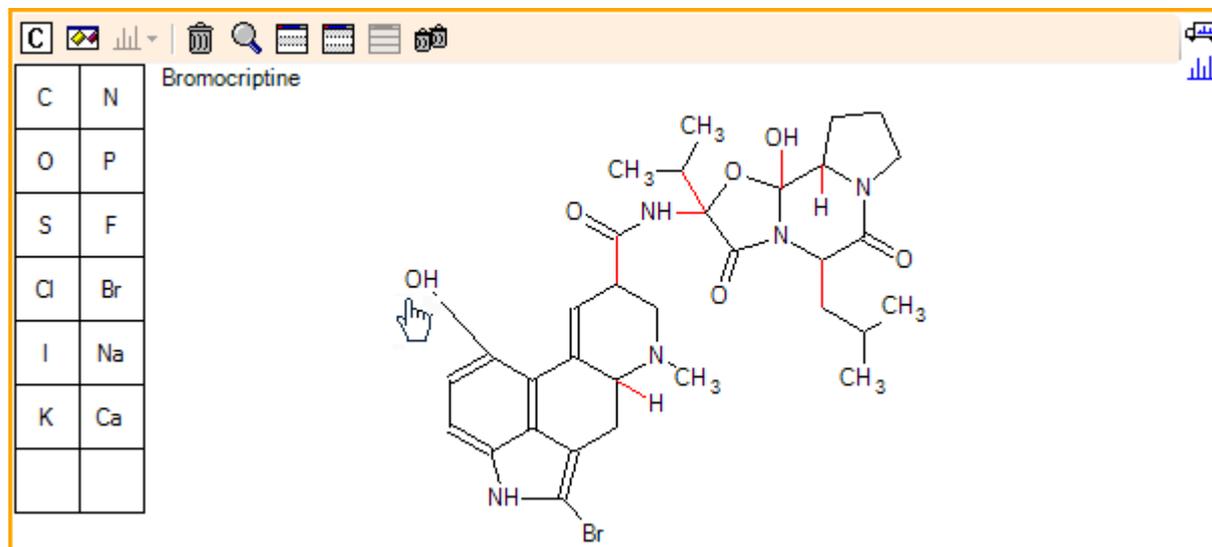
Il riquadro Structure contiene alcuni semplici strumenti di disegno che consentono modifiche alla struttura per vedere se sia possibile trovare corrispondenze.

2. Il lato sinistro del riquadro Structure contiene una griglia con simboli di elementi. Fare clic su **O** e quindi trascinarlo verso la struttura principale.

Quando l'atomo è vicino alla struttura, è unito con un legame che segue il cursore quando è trascinato vicino alla struttura.

- Trascinare il simbolo **O** in modo tale che un legame sia disegnato con la parte minore della struttura (ergolinea) e rilasciare il mouse (ad esempio, collocare il nuovo atomo sull'anello fenilico). La [Figura 4-9](#) mostra il processo.

Figura 4-9 Riquadro Struttura

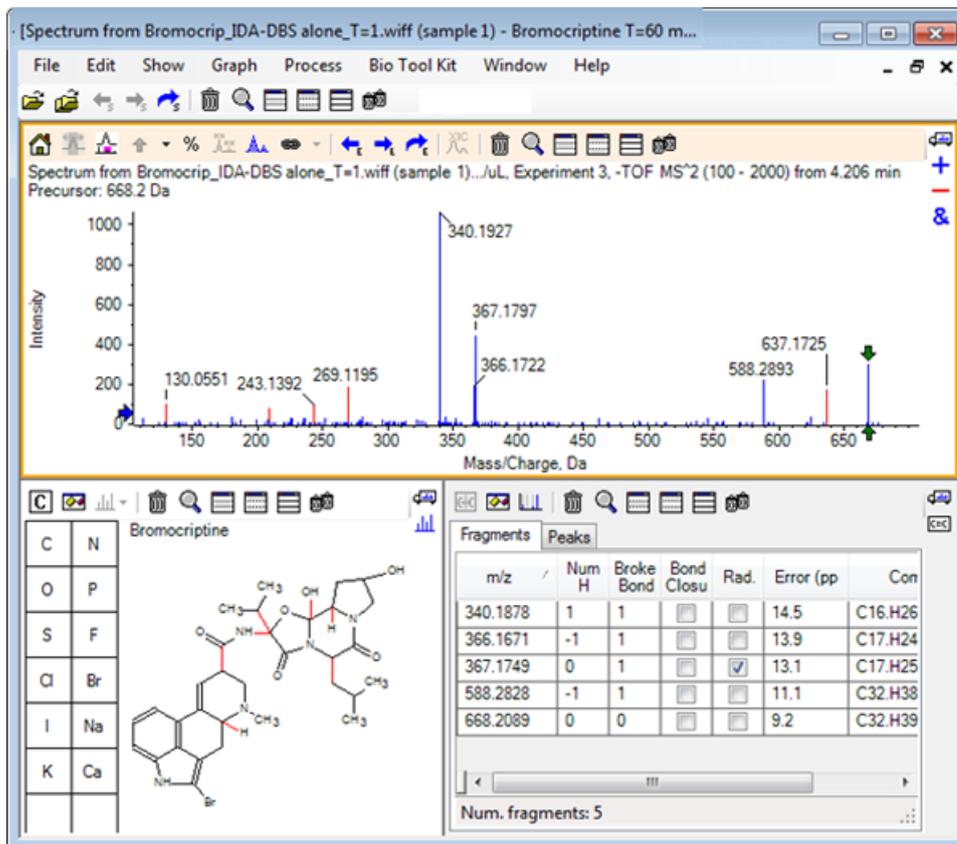


Lo spettro si aggiorna nuovamente e mostra due corrispondenze: lo ione molecolare a 668.2089 e lo ione corrispondente alla perdita di HBr a 588.2828. Ciò suggerisce che la composizione elementare complessiva ora sia corretta, ma il fatto che i principali componenti non corrispondano suggerisce che l'atomo non sia stato aggiunto alla parte destra della molecola.

- Fare clic sul gruppo **OH** appena aggiunto e quindi trascinarlo all'anello pirrolidina nella parte superiore della struttura. Accertarsi che solo l'atomo spostato sia disegnato in grassetto. Altrimenti, è spostata l'intera sottostruttura evidenziata.

Come mostrato in [Figura 4-10](#), ciò fa sì che gli ioni a 340.1927, 366.1722 e 367.1797 siano messi in corrispondenza e le sottostrutture corrispondenti e le forme idrossilate di ioni messi in corrispondenza nello spettro del composto precursore.

Figura 4-10 Spettro da bromocriptina



Molti dei picchi di massa bassa senza corrispondenza erano presenti nello spettro precursore, oppure sono equivalenti agli idrossilati, che erano messi in corrispondenza quando all' algoritmo era consentito rompere legami ad anello, ma esiste uno ione di massa elevata a 637.1725 che è probabilmente dovuto a un passaggio di frammentazione semplice ed è ancora senza corrispondenza.

5. Nella scheda **Fragments**, selezionare la riga per 668.2089 in modo che sia etichettata e che gli altri ioni siano etichettati rispetto a questa.

Ciò mostra che il picco a 637.1725 corrisponde alla perdita di 31.0364 dalla molecola precursore che potrebbe essere  $\text{CH}_3\text{NH}_2$  o  $\text{CH}_3\text{O}$ . Poiché questo ione non era osservato nello spettro della molecola precursore, sembra molto probabile che sia derivato dal verificarsi dell'idrossilazione a uno dei gruppi metilici nella parte peptidica ciclica della struttura.

6. Fare clic due volte nel riquadro Structure per deselegionare la struttura e quindi trascinare il nuovo gruppo **OH** in uno dei gruppi metilici alla destra della struttura.
7. Aprire la finestra di dialogo **Fragment Options**, impostare **Mass tolerance** a 30 ppm, quindi fare clic su **OK**.

Lo ione 637 è ora messo in corrispondenza e la selezione di questa riga nel riquadro Fragments mostra che lo ione potrebbe corrispondere alla perdita di una parte metossi.

8. Aprire la finestra di dialogo **Fragment Options**, selezionare la casella di controllo **Break ring bonds**, quindi fare clic su **OK**.

La maggior parte dei frammenti può ora essere messa in corrispondenza, anche se lo ione a 209 può essere messo in corrispondenza solo se a tre legami è consentito rompersi (i due necessari per la molecola precursore più la perdita dell'atomo di ossigeno aggiuntivo).

---

**Nota:** Il riquadro Fragments ora contiene più righe per alcune delle masse, ad esempio 637.1905. Ciascuna di queste righe corrisponde a un diverso frammento possibile (e ne sono generati anche altri se è consentita la rottura di tre legami). La scheda Peaks nel riquadro Fragments mostra solo la corrispondenza che si ritiene sia la migliore in base a una combinazione dell'accuratezza della massa, al numero di legami rotti, al fatto che il frammento sia un radicale, e così via. In questo caso, la corrispondenza migliore è con un frammento che potrebbe essere stato generato per il composto precursore ma non era stato osservato, quindi le opzioni aggiuntive mostrate nella scheda Fragments possono essere utili per suggerire potenziali percorsi che non sono ovvi.

---

## Riepilogo

In questa sezione sono state trattate le seguenti attività:

- Inserire una struttura come un file .mol e quindi collegarla a uno spettro.
- Selezionare le parti della struttura e determinare se c'è un picco di massa corrispondente.
- Creare un riquadro di frammenti e impostare i parametri per osservare frammenti semplici.
- Lavorare con le schede **Fragments** e **Peaks** per mostrare le composizioni corrispondenti, le sottostrutture e i picchi di massa.
- Modificare le **Fragment Options** per consentire vie di frammentazione più complesse.
- Aggiungere le sottostrutture in un riquadro dello spettro.
- Modificare la struttura per esplorare la frammentazione di molecole correlate come i metaboliti.

In generale, è buona norma iniziare consentendo processi di frammentazione semplice e opzioni aggiuntive di frammentazione (legami aggiuntivi, legami ad anello) come è necessario per spiegare gli ioni osservati. Ciò è coerente con il fatto che gli ioni frammentano tipicamente un frammento in una serie di passaggi, formando dapprima frammenti più semplici, piuttosto che in un passaggio combinato che rompe i legami multipli. Naturalmente, un semplice frammento potrebbe essere instabile e frammentarsi ulteriormente subito, così da non essere osservato. Inoltre, consentendo un numero elevato di passaggi di frammentazione, serve più tempo per elaborare e per completare.

Quando si confrontano le molecole correlate, può essere utile sovrapporre lo spettro di riferimento (molecola precursore) e la forma modificata, e poi collegare la visualizzazione in un riquadro della struttura o dei frammenti che si aggiorna quando lo spettro attivo viene scambiato. Tuttavia, la colorazione applicata agli ioni abbinati e senza riscontro può risultare difficile da distinguere se esistono sovrapposizioni, quindi è consigliabile che si lavori con singoli spettri fino a quando non si è acquisita una certa familiarità con il programma e le visualizzazioni.

Sebbene sia comune lavorare con un singolo campione, esistono occasioni in cui possono essere ottenute in un momento ulteriori informazioni attraverso il confronto o la visualizzazione di alcuni campioni. Questa sezione illustra alcuni degli strumenti disponibili nel software prima per due campioni e poi per campioni multipli.

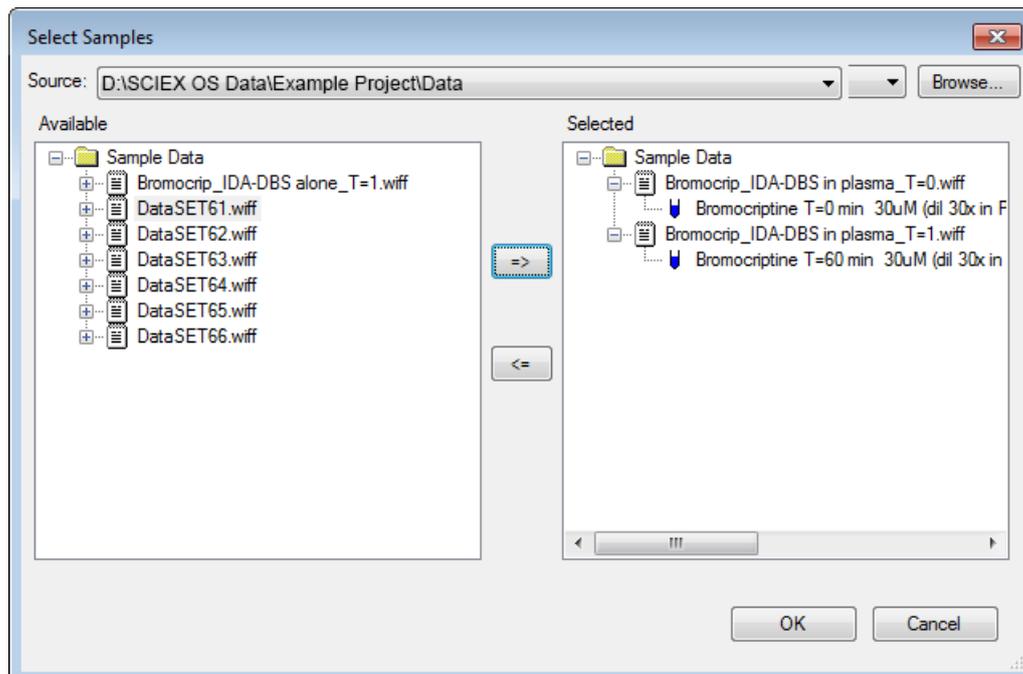
## Lavorare con due campioni

Un flusso di lavoro comune è di confrontare due campioni ottenuti in condizioni diverse per determinare le modifiche. Ad esempio, due diversi punti temporali dopo la somministrazione di un farmaco. I dati confrontati per questo esercizio (T = 0 ore e T = 1 ora) derivano da un'incubazione di bromocriptina con microsomi di fegato di ratto addizionati nel plasma.

Chiudere tutte le finestre aperte prima di iniziare.

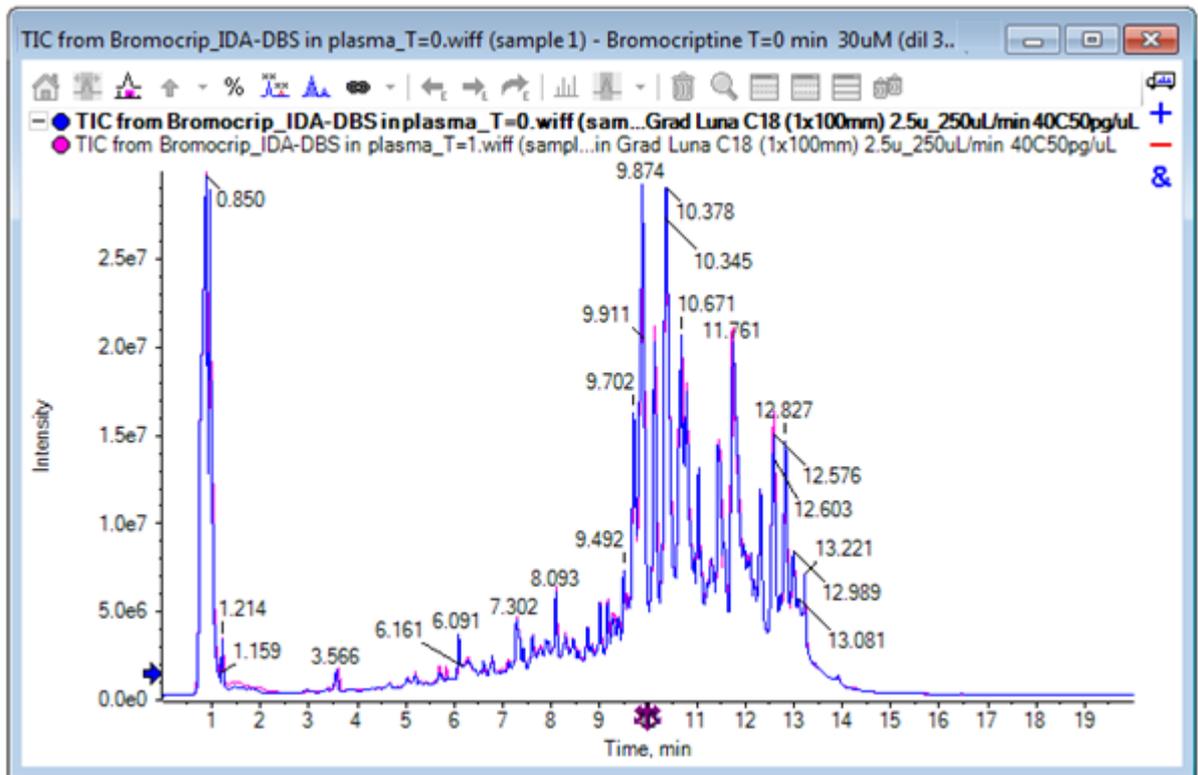
1. Fare clic su **File > Open Multiple Samples**, quindi sfogliare fino alla cartella contenente i dati campione.
2. Selezionare i file **Bromocrip\_IDA-DBS in plasma\_T=0.wiff** e **Bromocrip\_IDA-DBS in plasma\_T=1.wiff** e quindi trascinare i file sul lato destro della finestra.
3. Fare clic su **OK**.

Figura 5-1 Selezionare più campioni



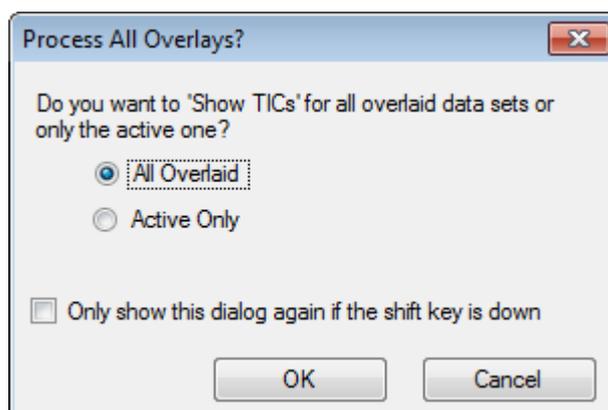
A differenza dell'apertura di un singolo file IDA, in cui sono mostrati TIC differenti per l'analisi e le scansioni dipendenti, con più file IDA è mostrato un singolo TIC di tutti i dati per tutti i campioni. In questo caso, esistono due TIC come mostrato nella [Figura 5-2](#).

**Figura 5-2 TIC**



4. Fare clic su **Show > Total Ion Chromatogram (TIC)** per aprire la finestra di dialogo **Select Experiment**.
5. Selezionare **Period 1, Experiment 1 - TOF MS (100 - 2000)** e quindi fare clic su **OK**.

**Figura 5-3 Finestra di dialogo Process All Overlays**



## Lavorare con campioni multipli

---

La finestra di dialogo **Process All Overlays**, che è mostrata ogni volta che le tracce sovrapposte sono elaborate, consente agli utenti di scegliere se elaborare tutte le tracce o solo quella attiva. L'elaborazione di tutte le tracce è utile in quanto le operazioni successive influenzano tutte le tracce (campioni).

6. Selezionare **All Overlaid**.
7. Selezionare la casella di controllo **Only show the dialog again if the shift key is down** per rendere questa scelta l'azione predefinita.
8. Fare clic su **OK**.

Viene generato un riquadro che contiene sovrapposizioni dei TIC dell'analisi. Il cromatogramma è molto riproducibile e i picchi dei metaboliti sono tanto intensi che alcuni possono essere trovati ingrandendo e confrontando i cromatogrammi (esaminare la regione attorno a 6 min.), ma di solito è richiesto ulteriore lavoro. Esistono diversi modi di generare visualizzazioni che sono confrontati più facilmente. Per questo esempio, si utilizza un cromatogramma con picco base.

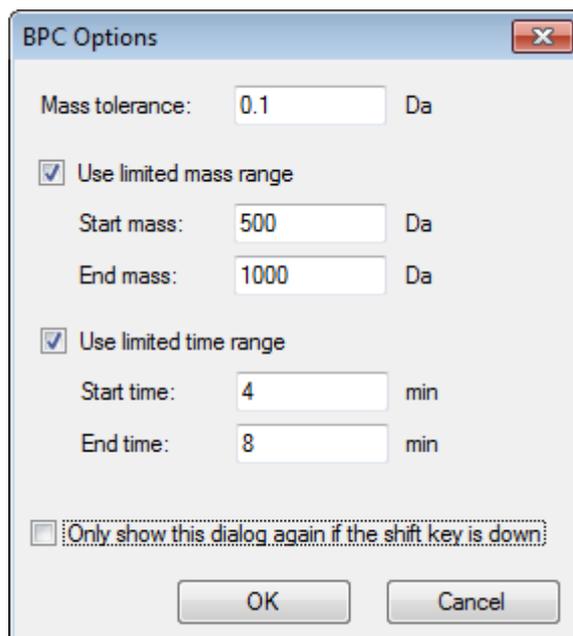
---

**Nota:** Se si fa clic su **File > Open Heat Map TICs from Wiff**, è possibile generare direttamente le visualizzazioni a striscia senza mostrare prima i cromatogrammi sovrapposti.

---

9. Nascondere il riquadro TIC originale e quindi fare clic su **Show > Base Peak Chromatogram (BPC)**.
10. Nella finestra di dialogo **BPC Options**, modificare le impostazioni, come richiesto, per mettere in corrispondenza i valori nella [Figura 5-4](#) e quindi fare clic su **OK**.

**Figura 5-4** Finestra di dialogo **BPC Options**



Un cromatogramma di picco base è costruito tracciando l'intensità del picco più grande in ciascuna scansione in funzione del tempo di ritenzione. Per fornire ulteriori informazioni, ciascuna traccia commuta tra il suo

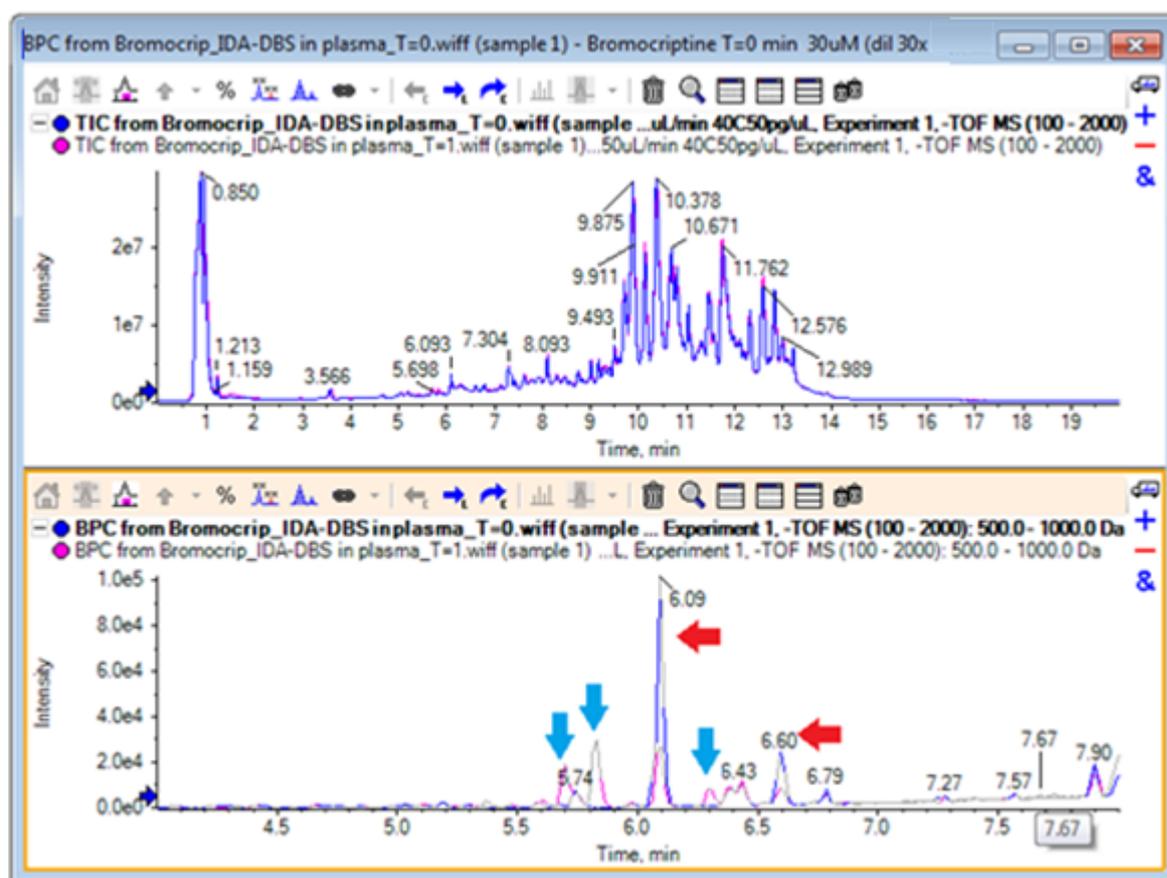
normale colore e grigio quando la massa di picco di base cambia di oltre la tolleranza della massa specificata in questa finestra di dialogo.

Opzionalmente, è possibile limitare l'intervallo di massa considerato, che può evitare artefatti causati da picchi con fondo rumoroso ad esempio, e impostare l'intervallo di tempo di ritenzione per velocizzare l'elaborazione. Poiché sappiamo che la massa della bromocriptina è circa 652, i metaboliti semplici non sono sotto un rapporto  $m/z$  di 500.

11. Nella finestra di dialogo **Process All Overlays**, accertarsi che l'opzione **All Overlaid** sia selezionata e quindi fare clic su **OK**.

Un nuovo riquadro mostra il BPC, che è molto più semplice e facile da confrontare dei TIC originali.

Figura 5-5 BPC



Esistono due picchi (contrassegnati con frecce rosse) che sembrano diminuire nel campione di 1 ora (rosa) confrontato col campione T = 0 (blu). Questi corrispondono alla bromocriptina (6.09 min.) e a un isomero. Esistono anche tre picchi (frecce blu) che sono presenti nel campione T = 1 ma non in quello T = 0. Questi sono potenziali metaboliti.

**Nota:** Il BPC può essere molto utile, ma rispecchia solo il comportamento dello ione più intenso (nell'intervallo di massa scelto). I picchi di massa che non diventano mai il picco di base non possono mai essere mostrati, quindi utilizzare altri strumenti quando si cercano differenze tra i campioni.

## Lavorare con campioni multipli

- Nascondere il riquadro TIC.
- Fare doppio clic nel riquadro BPC a 6.09 min.
- Selezionare **All Overlaid** nella finestra di dialogo **Process All Overlays** e quindi fare clic su **OK**.

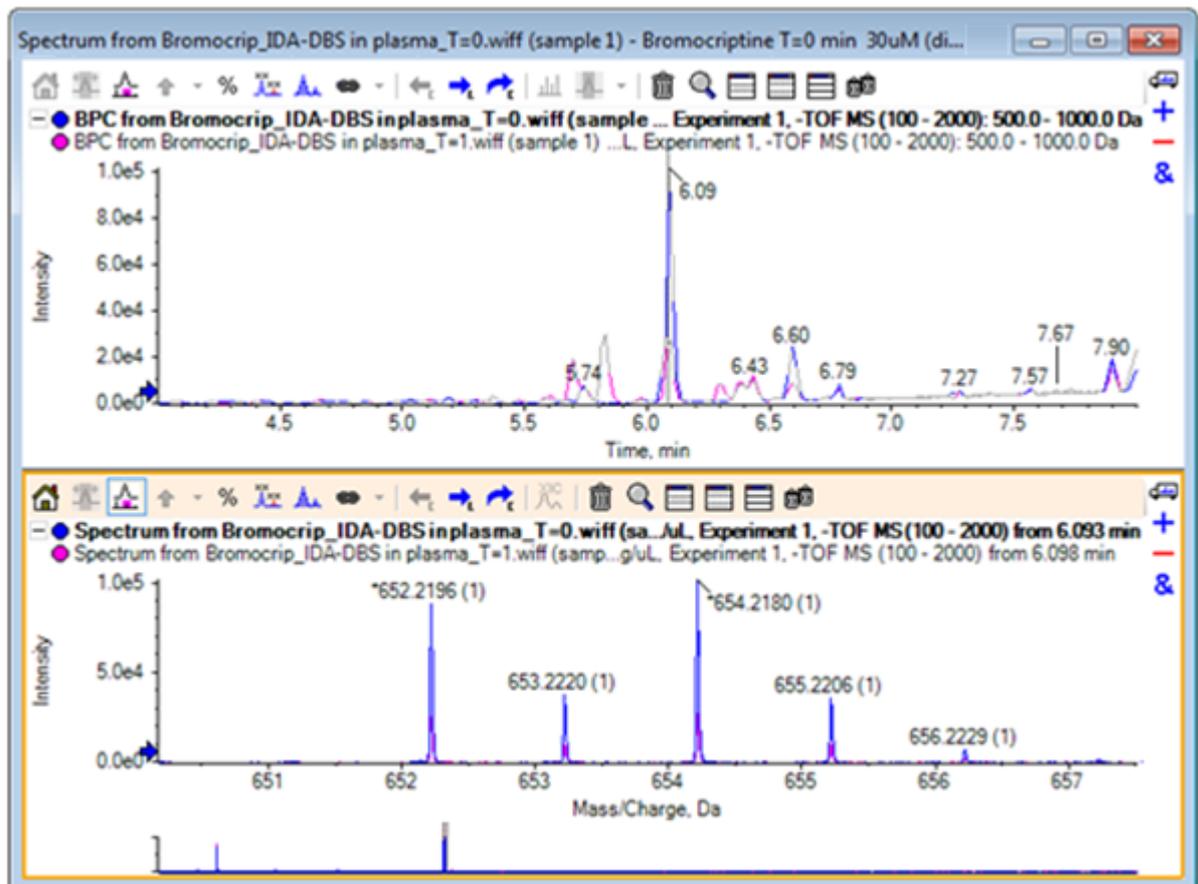
Ciò genera due spettri sovrapposti.

- Nel riquadro Spectrum, fare clic e quindi ingrandire per mostrare il cluster di isotopi a un rapporto  $m/z$  di circa 652. Fare riferimento alla [Figura 5-6](#).

Il riquadro Spectrum contiene spettri sovrapposti dai due campioni, in modo che possano essere facilmente confrontati. In questo esempio, è chiaro che l'intensità nel campione T = 1 h (rosa) è minore che nel campione T = 0.

Il grafico generale è molto prezioso quando si osservano dati ad alta risoluzione come questi, poiché forniscono un modo di osservare i dettagli mantenendo nel contempo visibile l'intero spettro.

**Figura 5-6 Cluster di isotopi attorno a un rapporto  $m/z$  di 652**



- Nel riquadro Chromatogram, spostare il cursore sulla linea che mostra il tempo dello spettro (in precedenza un doppio clic).
- Quando il cursore cambia in una freccia a due estremità, trascinarlo al picco a circa 5.8 min.

Lo spettro continua a mostrare l'intervallo di massa espanso, che ora ha solo rumore e piccoli picchi. Per mostrare i grandi picchi rosa nella finestra principale, trascinare il rettangolo rosa nel grafico generale, indicato da una freccia nera sotto questo. La visualizzazione si rinormalizza quando il mouse è rilasciato. Per la [Figura 5-8](#), è stata selezionata l'icona **Etichettare tutte le tracce sovrapposte**.

Figura 5-7 BPC e spettro

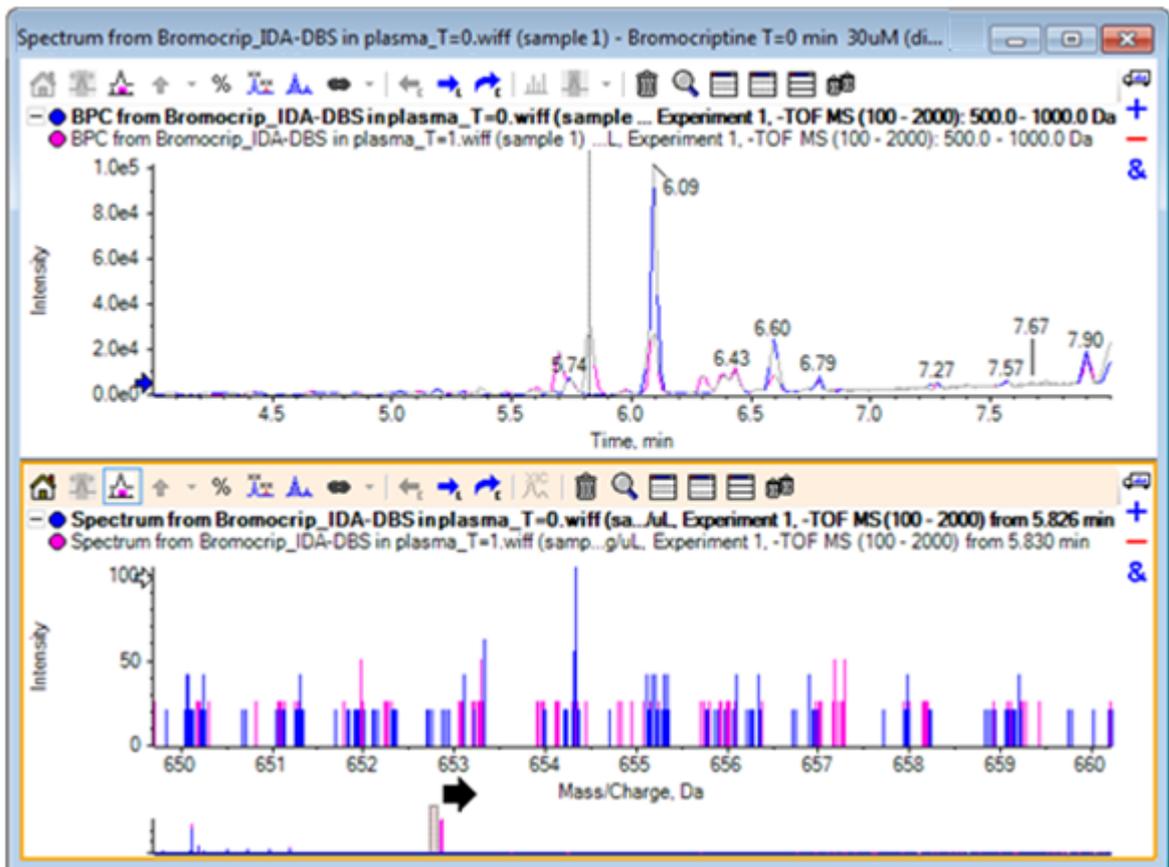
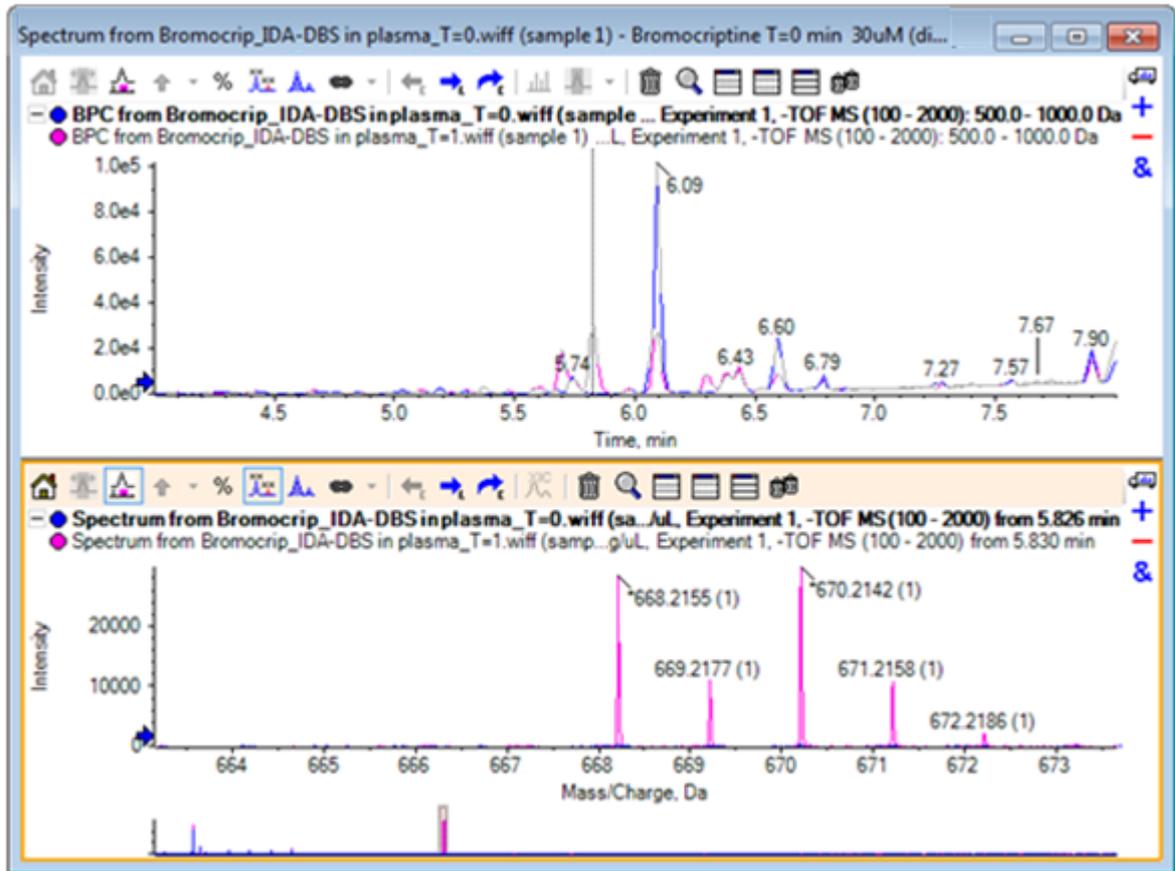


Figura 5-8 BPC e spettro con l'opzione Label All Overlaid Traces applicata



Questi picchi sono assenti dal campione T = 0.

18. Chiudere tutte le finestre prima di continuare.

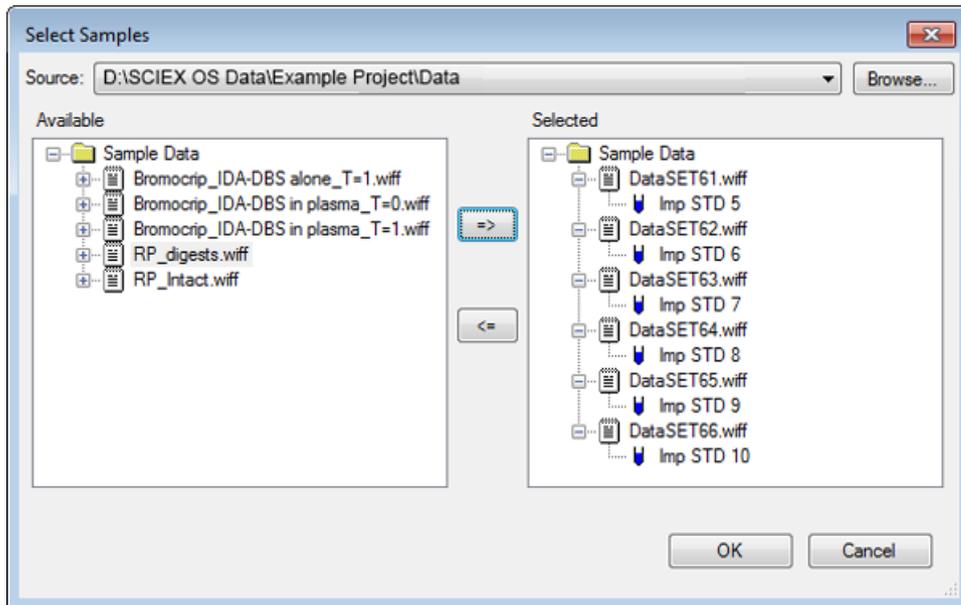
## Lavorare con più di due campioni

Con più di due campioni sovrapposti, le finestre possono risultare confuse e può diventare più difficile associare le differenze con il campione corretto. Il software contiene altri strumenti che consentono di visualizzare i dati da molti campioni.

Il set di dati utilizzato per l'esempio proviene da un'analisi del profilo di impurità da sei diversi set di dati.

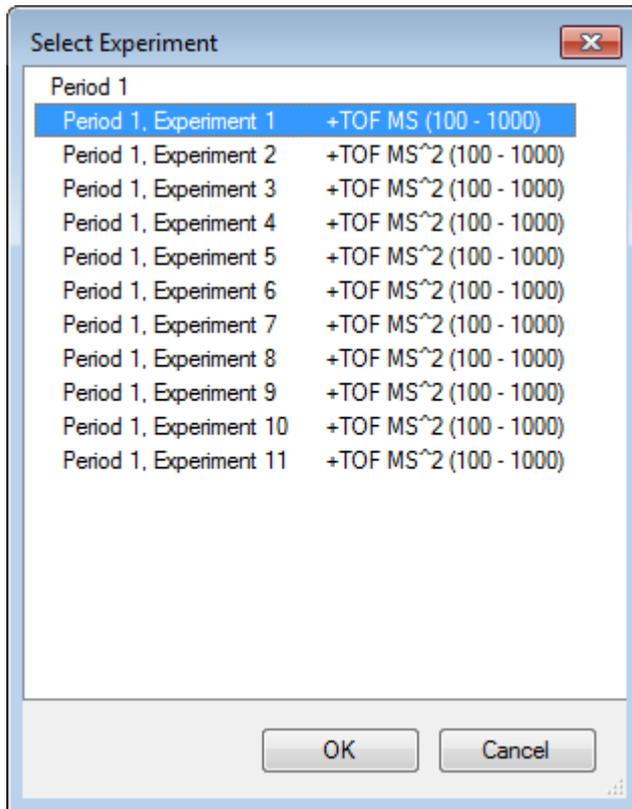
1. Fare clic su **File > Open Multiple Samples**.
2. Selezionare i file da **DataSet61.wiff** a **DataSet66.wiff** e spostarli nel pannello **Selected**.

Figura 5-9 Più campioni selezionati



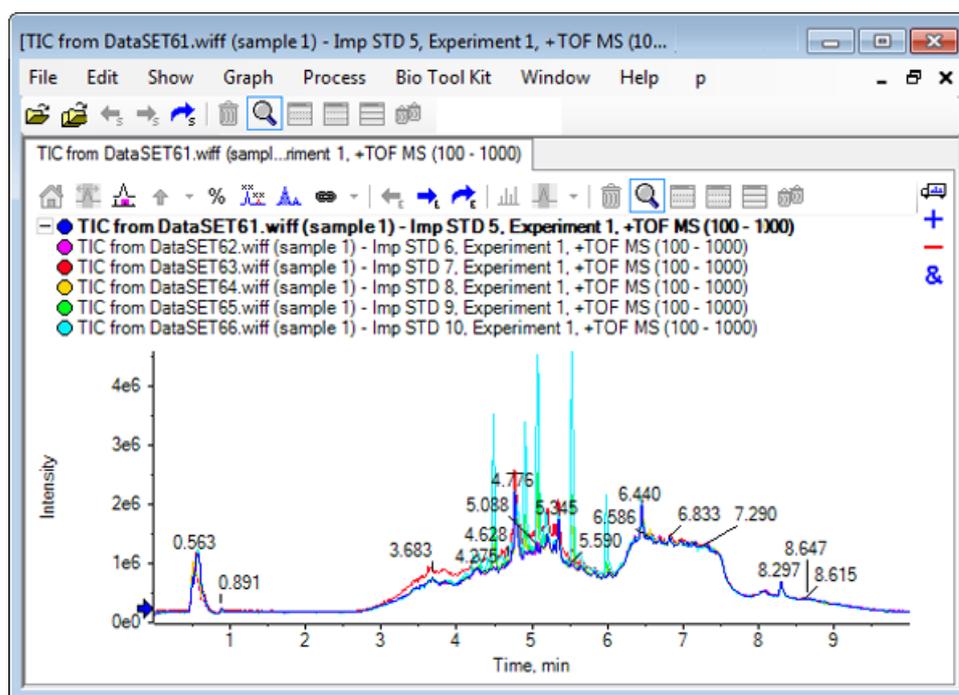
3. Fare clic su **OK**.
4. Fare clic su **Show > Total Ion Chromatogram (TIC)**.
5. Selezionare **Period 1, Experiment 1** dalla finestra di dialogo **Select Experiment**.

Figura 5-10 Finestra di dialogo Select Experiment



6. Fare clic su **OK**.
7. Nella finestra di dialogo **Process All Overlays**, selezionare **All Overlaid** e fare clic su **OK**. Il grafico mostra la sovrapposizione di un cromatogramma TIC per ogni campione nel file.

Figura 5-11 TIC sovrapposti da Experiment 1 di DataSet61.wiff fino a DataSet66.wiff



Il titolo della traccia attiva è mostrato in grassetto. Fare clic sull'icona a sinistra di questo titolo per comprimere le intestazioni in una singola riga, creando più spazio per le informazioni.

8. Fare clic su **Show > Overlaid Traces as Heat Map** e poi, nel riquadro risultante, impostare i colori dei controlli in modo che **min%** sia **0.5** e **max%** sia **100**.

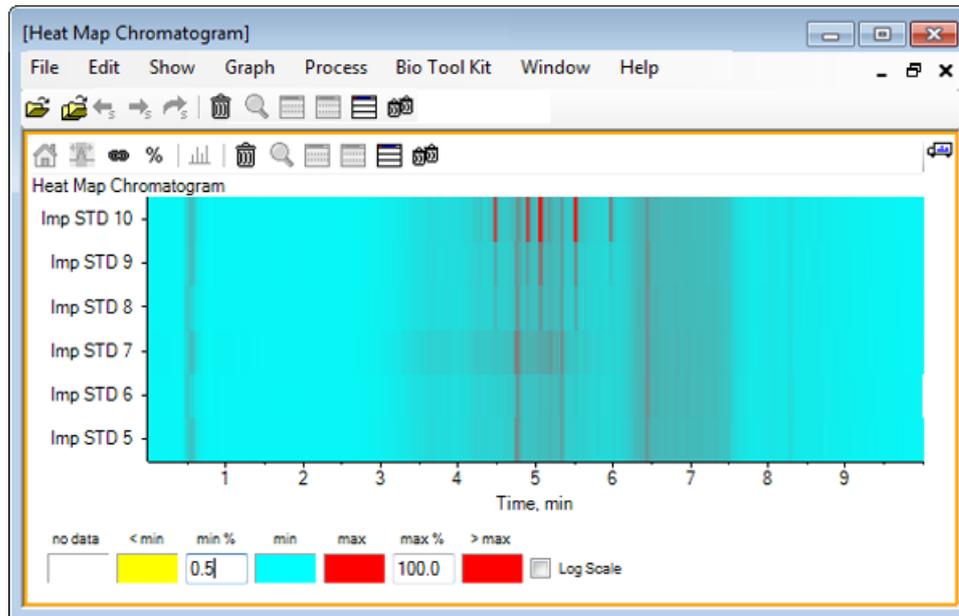
---

**Suggerimento!** Fare clic con il pulsante destro del mouse e selezionare **Show Appearance Control** se i controlli non sono visibili.

---

9. Fare clic all'interno del riquadro del cromatogramma e quindi fare clic sull'icona **Nasconde tutti gli altri riquadri**.

Figura 5-12 Heat Map Chromatogram



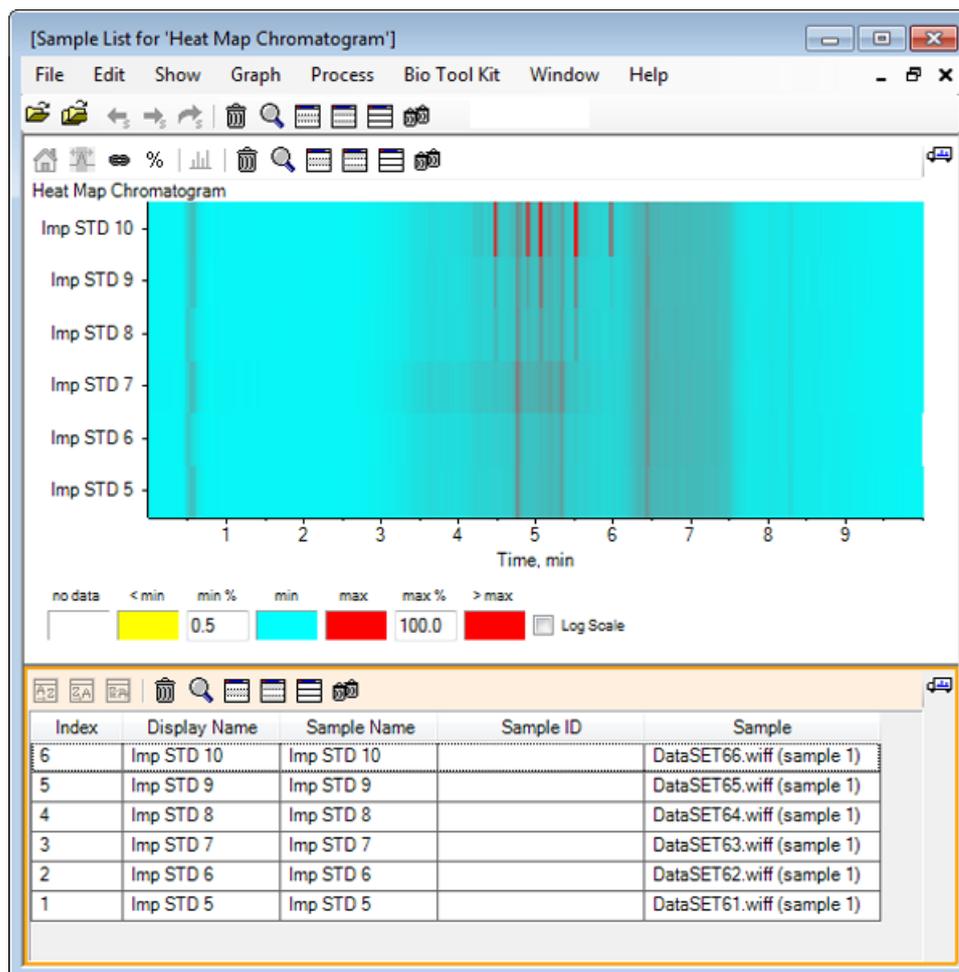
Ogni campione è rappresentato da una singola striscia orizzontale che mostra il suo TIC, identificato secondo un codice di colori basato sull'intensità. Utilizzando la combinazione di colori di cui sopra, il giallo rappresenta i punti dove nessun dato è stato acquisito o l'intensità è inferiore a 0,5% dell'intensità più grande in qualsiasi campione, il blu rappresenta lo 0,5% e il rosso rappresenta il segnale più intenso.

La finestra mostra da sei a sette picchi (tra 4.5 min e 6.5 min) e che le reazioni variano tranne per il picco a 6.5 min.

L'ordine dei picchi è lo stesso dei campioni che sono stati acquisiti e che potrebbero non essere perfetti. In questo esempio, l'ordine va bene.

10. Fare clic con il pulsante destro del mouse nel riquadro e quindi fare clic su **Show Samples Table**. Inizialmente la tabella dei campioni viene visualizzata a destra della mappa termica. L'icona **Trascinare la selezione per riorganizzare i riquadri** nell'angolo superiore destro del riquadro può essere utilizzata per trascinare il riquadro in basso sulla mappa termica per spostare la tabella sotto il riquadro originale.

Figura 5-13 Elenco di campioni per il cromatogramma della mappa termica

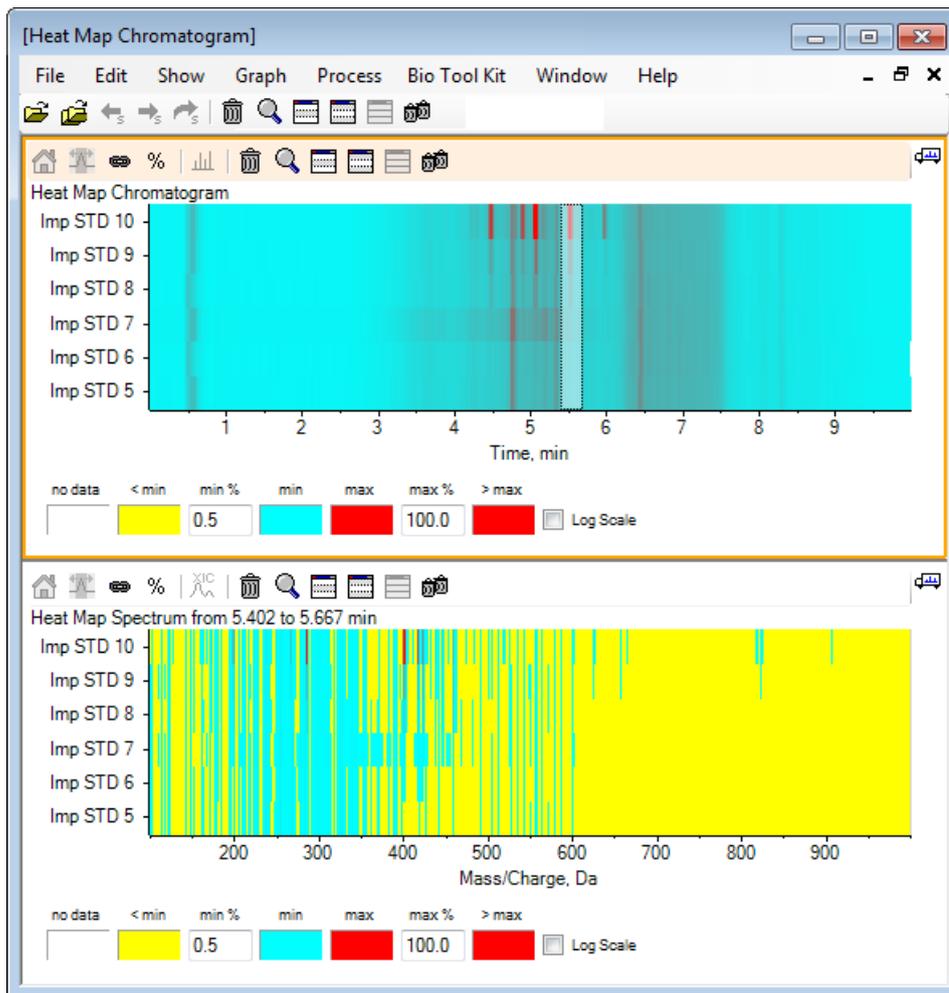


La tabella contiene colonne con vari campi di testo associati a ciascun campione. La colonna **Display Name** è modificabile, le altre sono di sola lettura. Tutte le colonne possono essere utilizzate per ordinare la visualizzazione della tabella e dei campioni.

11. Effettuare una selezione nella Imp STD 10 attorno a 5.5 min e quindi fare doppio clic all'interno di essa.

Viene creato un nuovo riquadro dello spettro della mappa termica e viene indicato l'intervallo di massa completo sull'asse x.

Figura 5-14 Spettro della mappa termica



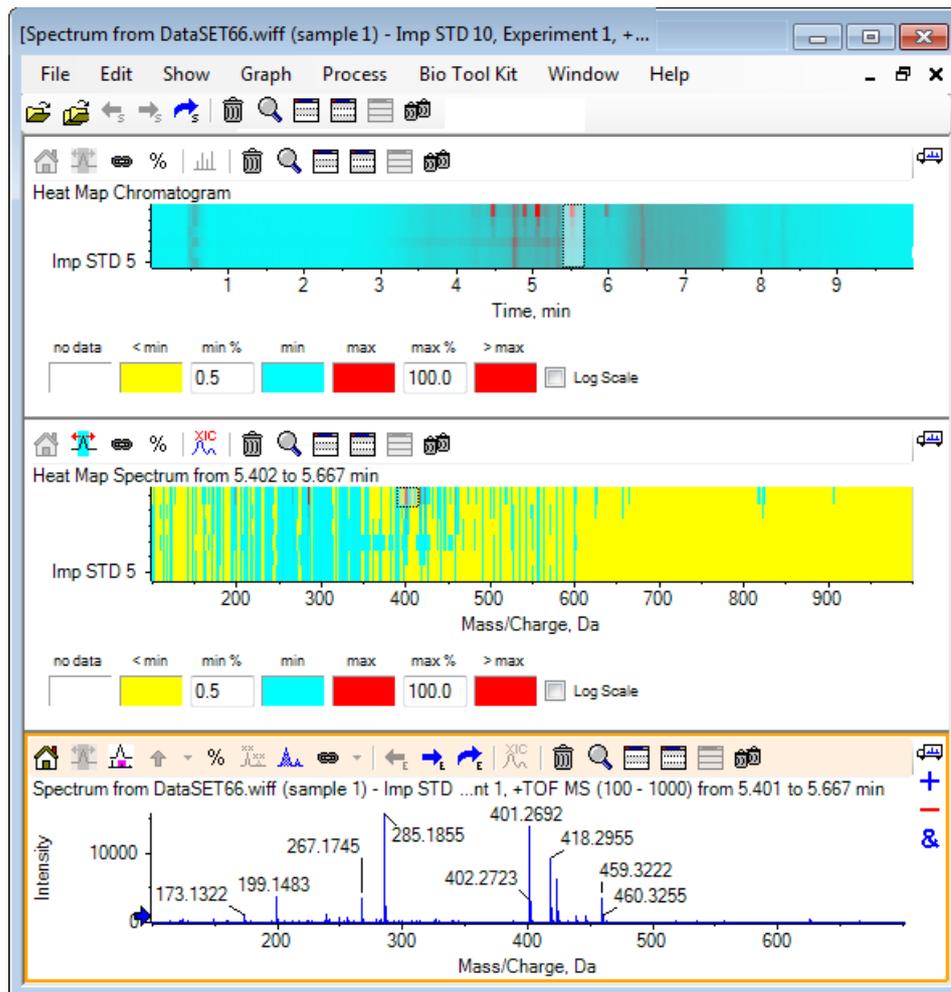
Dallo spettro, si può decidere che un paio di masse (tra un  $m/z$  di 400 e un  $m/z$  di 460) contribuiscano ad una maggiore intensità dell'area di tempo selezionata.

12. Selezionare la massa intorno a Mass/Charge Da 401 per il campione Imp STD 10 e quindi fare clic con il pulsante destro del mouse per selezionare **Show Spectra for Selected Samples**.

Si crea così uno spettro per il campione selezionato. È indicato lo spettro in quel punto temporale. Fare riferimento alla [Figura 5-15](#).

13. Fare doppio clic sulla massa intorno a Mass/Charge Da 401 nello spettro della mappa termica per creare una mappa termica XIC.

Figura 5-15 Spettro



## Riepilogo

In questa sezione sono state trattate le seguenti attività:

- Lavorare con gli strumenti campioni multipli disponibili nel software.
- Confrontare due campioni con cromatogrammi sovrapposti e spettri interattivi.
- Confronto di più campioni con visualizzazioni di mappe termiche.

# Lavorare con la funzione Bio Tool Kit

# 6

In questa sezione vengono illustrate alcune delle opzioni disponibili nell'elemento di menu **Bio Tool Kit** del software.

**Nota:** Deve essere attivata la funzione Bio Tool Kit MicroApp per accedere a questa funzionalità. Fino a quando non viene completata l'attivazione, le uniche opzioni disponibili sono Peptide Fragments, Add Manual Reconstruct Highlights e Remove Manual Reconstruct Highlights. Fare riferimento alla funzione Activate Bio Tool Kit MicroApp nel documento *Note di rilascio*.

## Sequenza manuale

Utilizzare questa opzione per ordinare manualmente dati spettrali MS/MS da un campione di proteine digerito.

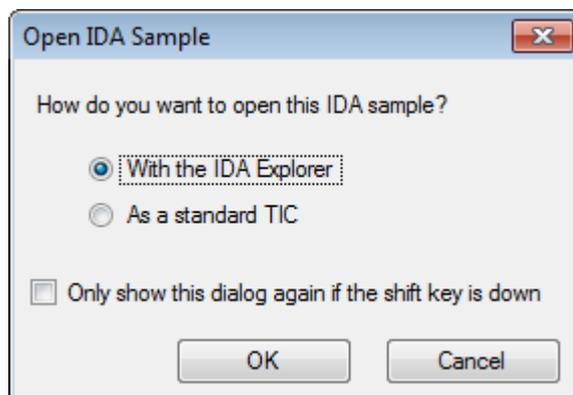
1. Fare clic sull'icona **Apri campione** nella barra degli strumenti principale.

Si aprirà la finestra di dialogo **Select Sample**.

2. Se la cartella **Sample Data** non è già selezionata, fare clic su **Browse** e spostarsi sulla cartella **Sample Data**.
3. Selezionare il file **RP\_digests.wiff** e fare clic su **OK**.

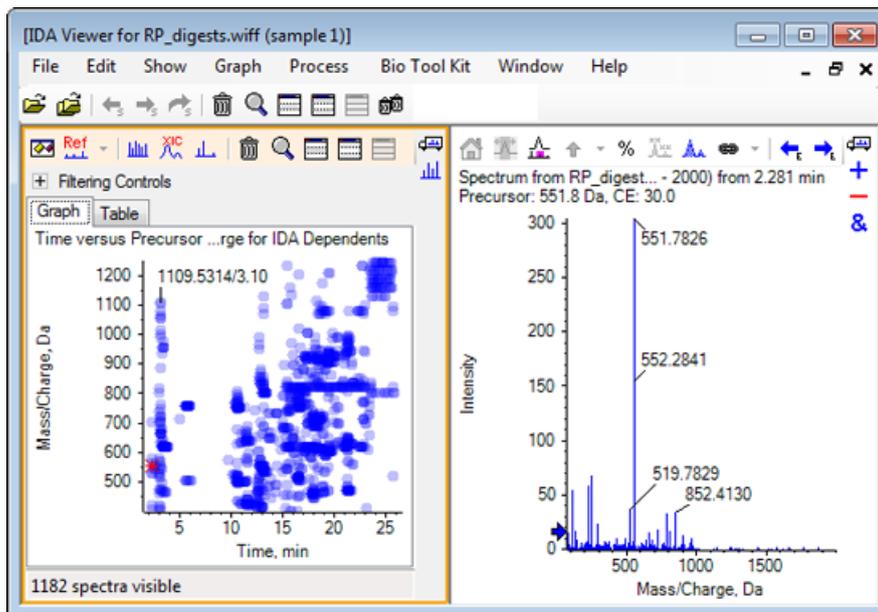
Si aprirà la finestra di dialogo **Open IDA Sample**.

**Figura 6-1** Finestra di dialogo Open IDA Sample



4. Assicurarsi che l'opzione **With the IDA Explorer** sia selezionata e quindi fare clic su **OK**.

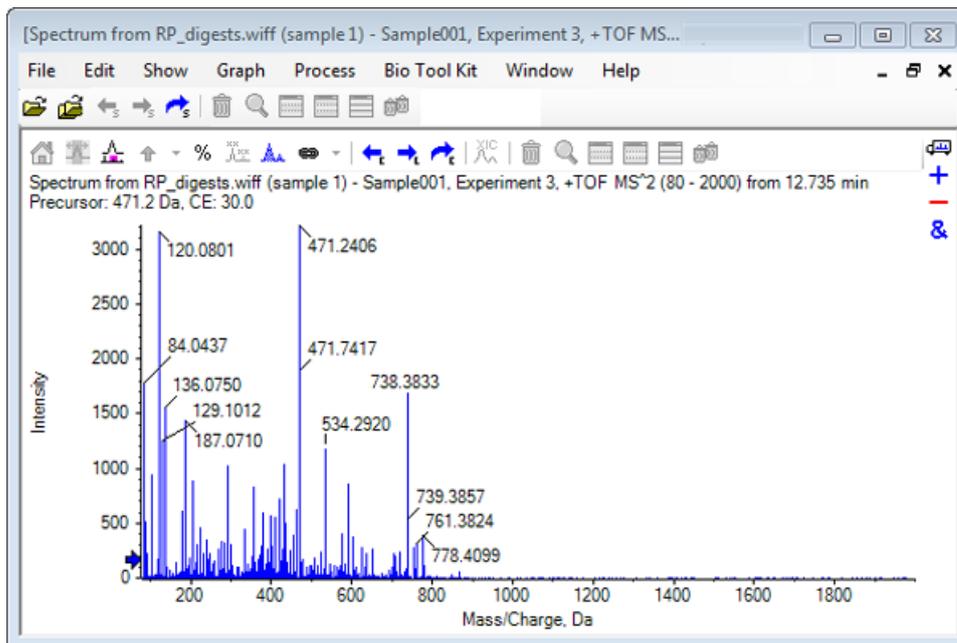
Figura 6-2 Spettro da RP\_digests.wiff



5. Fare clic sulla scheda **Table**.
6. Selezionare *m/z* 471.2398 al **Time** 12.73.
7. Col riquadro Spectrum attivo, fare clic su **Graph > Duplicate Graph**.

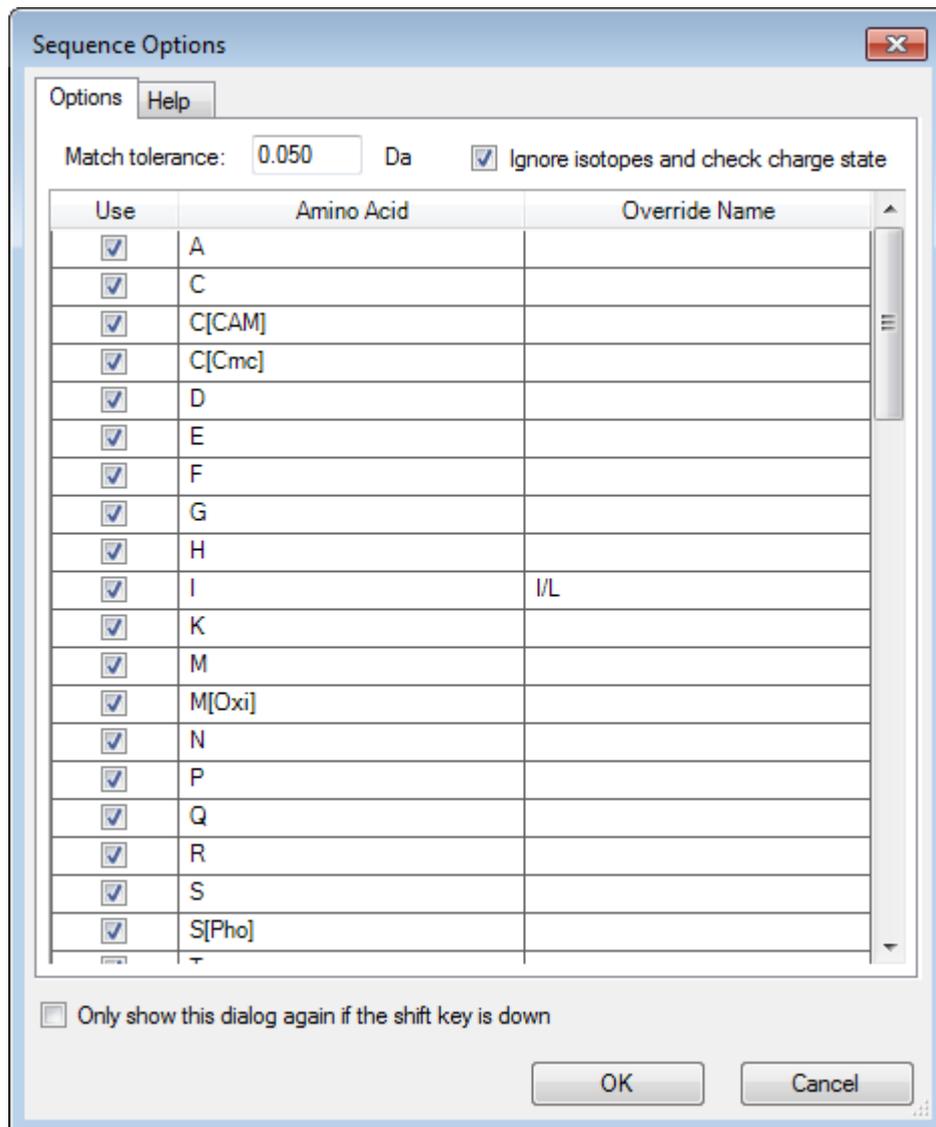
Si apre un nuovo riquadro Spectrum per il precursore selezionato (471.2). È possibile eliminare il riquadro IDA Explorer e il suo riquadro associato Spectrum.

**Figura 6-3 Spettro per precursore 471.2398 al tempo di ritenzione 12.73**



8. Selezionare il picco etichettato con **738.3833**.
9. Fare clic su **Bio Tool Kit > Manual Sequence**.  
Si apre la finestra di dialogo **Sequence Options**.

Figura 6-4 Finestra di dialogo Sequence Options

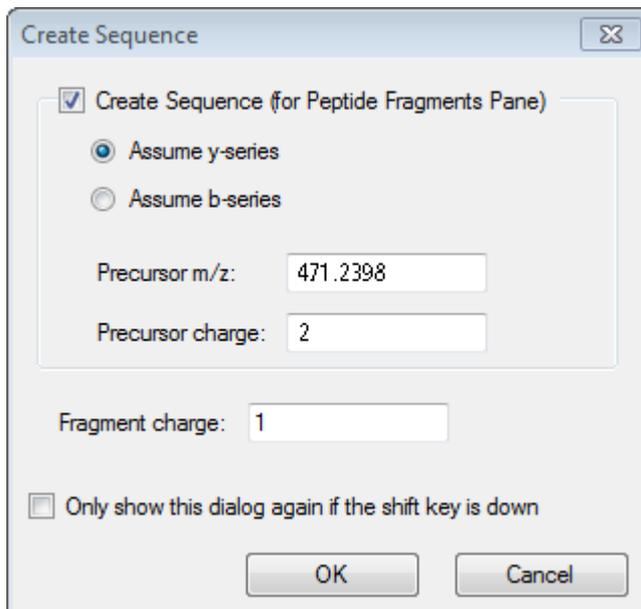


**Nota:** Quando si seleziona la casella di controllo per Ignore isotopes and check charge state, gli isotopi ed eventuali picchi con stato di carica errato sono ignorati dal software quando si propone l'amminoacido successivo.

10. Fare clic su **OK**.

Si apre la finestra di dialogo **Create Sequence**.

Figura 6-5 Finestra di dialogo Create Sequence



---

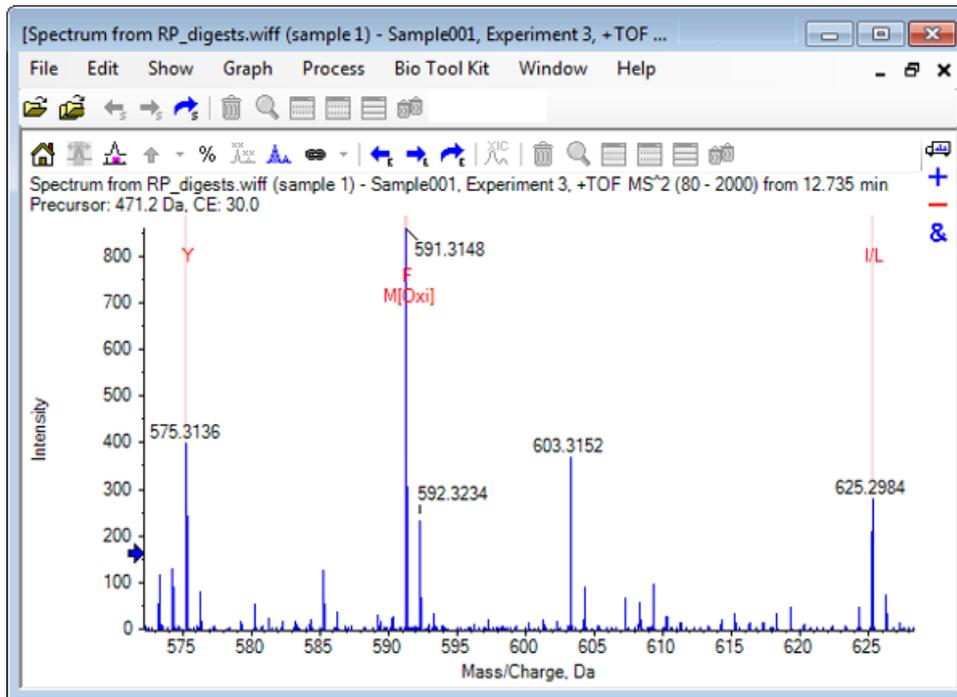
**Nota:** Questa finestra di dialogo consente all'utente di modificare le ipotesi fatte per gli ioni delle serie y e b e lo stato di carica dopo che il file è ordinato manualmente, e di vedere quale ipotesi fornisce la corrispondenza migliore per i dati.

---

11. Assicurarsi che la casella di controllo **Create Sequence (for Peptide Fragments Pane)** sia selezionata.
12. Digitare **2** nel campo **Precursor charge**.
13. Digitare il valore di carica del picco selezionato per proseguire l'albero di sequenza manuale nel campo **Fragment charge**.
14. Fare clic su **OK**.

Il software si aggiorna, mostrando un riquadro aggiornato Spectrum con linee verticali rosse che indicano il primo set di possibili amminoacidi guadagnati o persi sui dati spettrali.

Figura 6-6 Spettro ordinato manualmente — Possibilità iniziali

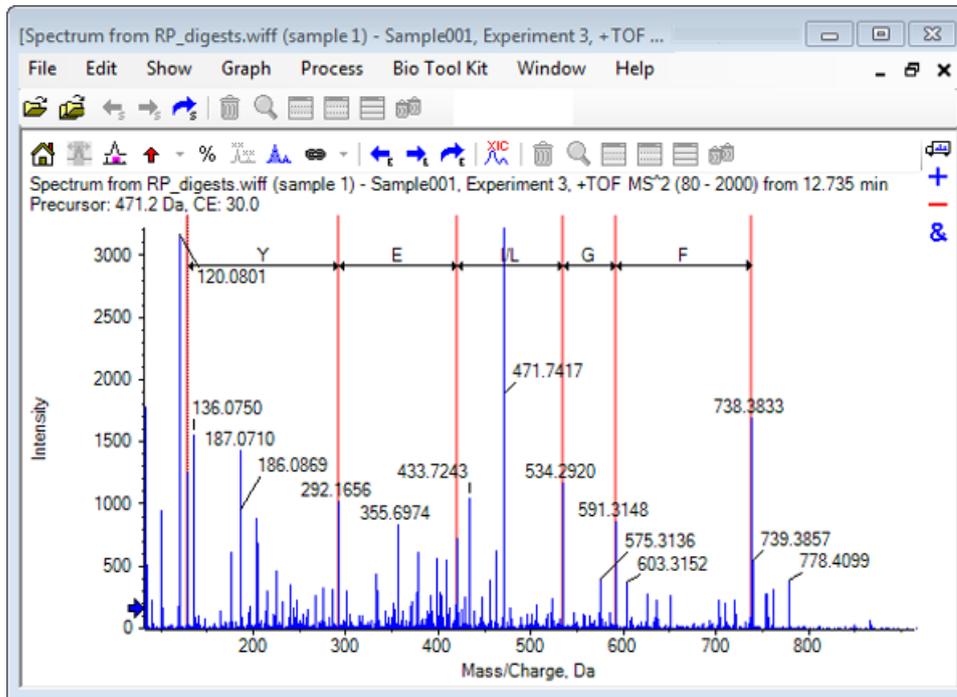


15. Fare doppio clic sulla didascalia della linea verticale rossa da ordinare ulteriormente.

Il software si aggiorna, indicando il set successivo di amminoacidi sui dati spettrali.

16. Ripetere il passaggio 15 fino a quando siano stati suggeriti tutti i possibili amminoacidi.

Figura 6-7 Spettro ordinato manualmente



---

**Nota:** In [Figura 6-7](#), si fa clic sulle didascalie nel seguente ordine: **F > G > I/L > E > Y**.

---

**Suggerimento!** Se il software suggerisce più di una possibilità e si desidera seguire un ramo diverso da quello suggerito inizialmente, riportare il grafico alla visualizzazione iniziale e ripetere questa procedura selezionando un'etichetta di amminoacido corrispondente alternativa.

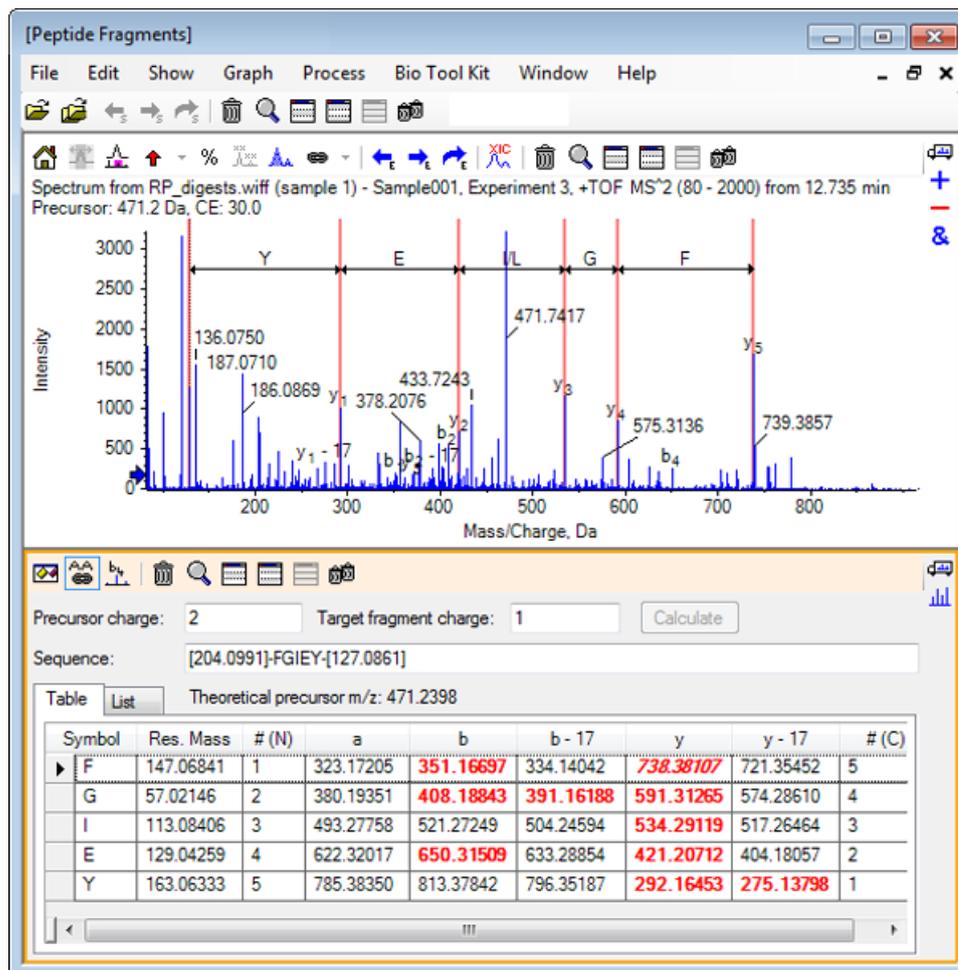
---

## Ordine manuale collegato con frammenti peptidi

1. Fare clic su **Bio Tool Kit > Peptide Fragments**.

Si apre il riquadro Peptide Fragments collegato con lo spettro ordinato manualmente.

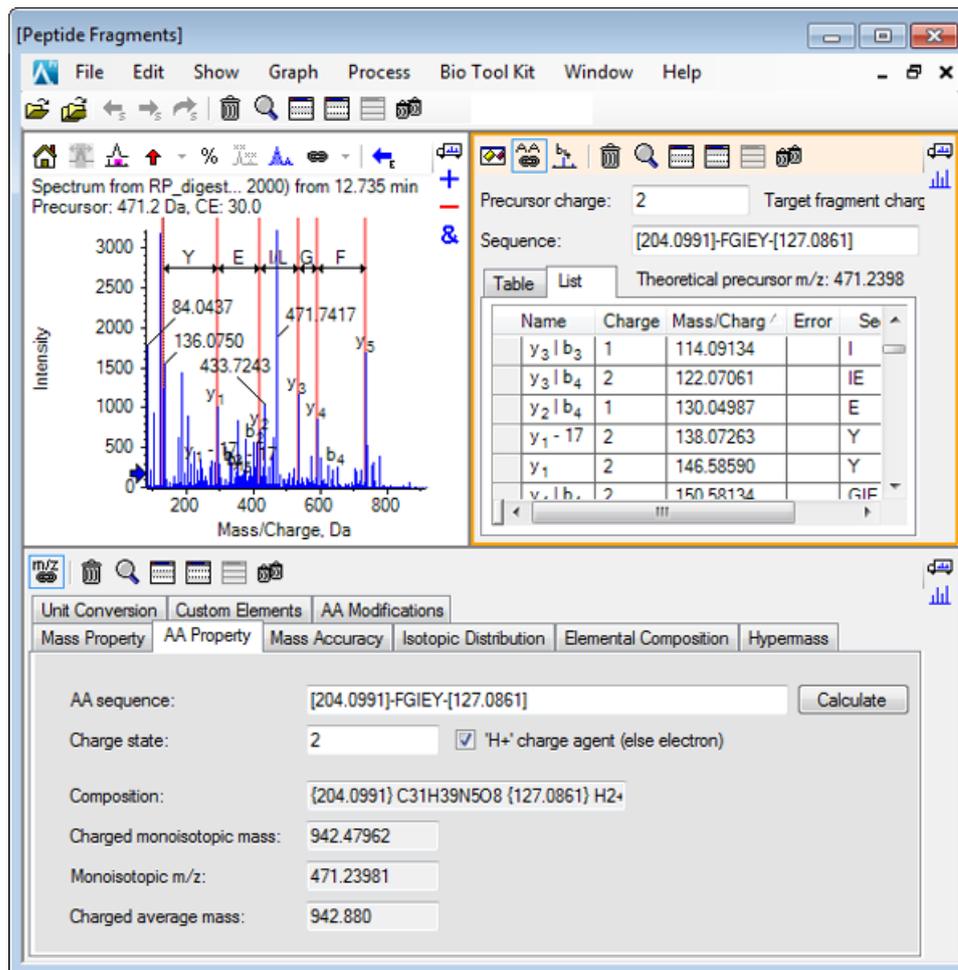
Figura 6-8 Riquadro Peptide Fragments collegato con lo spettro ordinato manualmente



**Nota:** Gli amminoacidi che corrispondono ai dati sperimentali sono mostrati in grassetto in rosso nelle colonne della scheda Table. Gli amminoacidi che corrispondono ai dati sperimentali, ma che hanno una differente destinazione di carica del frammento, sono mostrati in corsivo in rosso nelle colonne della scheda Table.

2. Fare clic sulla scheda **List**.
3. Fare clic su **Show > Mass Calculators**.
4. Fare clic sulla scheda **AA Property**.

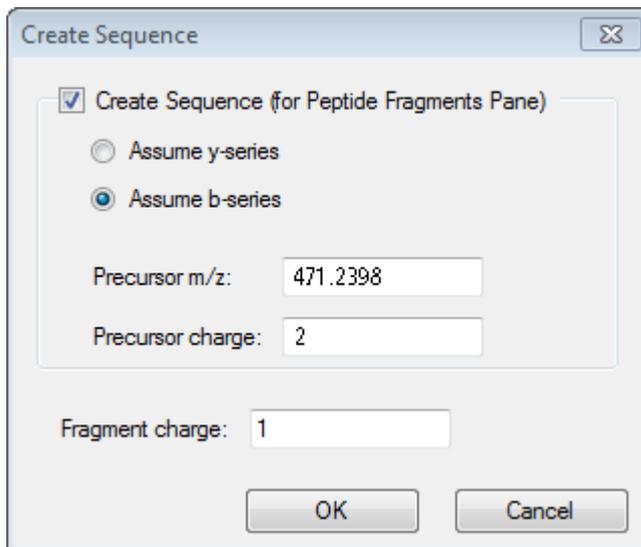
Figura 6-9 Calcolatori di massa - Scheda AA Property



**Nota:** I calcolatori di massa vengono automaticamente collegati allo spettro ordinato manualmente come da impostazione predefinita. La sequenza degli amminoacidi dallo spettro è mostrato nel campo **AA sequence**.

5. Con il riquadro Spectrum attivo, fare clic su **Bio Tool Kit > Set Sequence Creation Parameters**.  
Si apre la finestra di dialogo **Create Sequence**.

Figura 6-10 Finestra di dialogo Create Sequence



The image shows a dialog box titled "Create Sequence". It contains the following elements:

- A checked checkbox labeled "Create Sequence (for Peptide Fragments Pane)".
- Two radio buttons: "Assume y-series" (unselected) and "Assume b-series" (selected).
- An input field for "Precursor m/z" with the value "471.2398".
- An input field for "Precursor charge" with the value "2".
- An input field for "Fragment charge" with the value "1".
- "OK" and "Cancel" buttons at the bottom.

6. Completare la finestra di dialogo **Create Sequence** come segue:

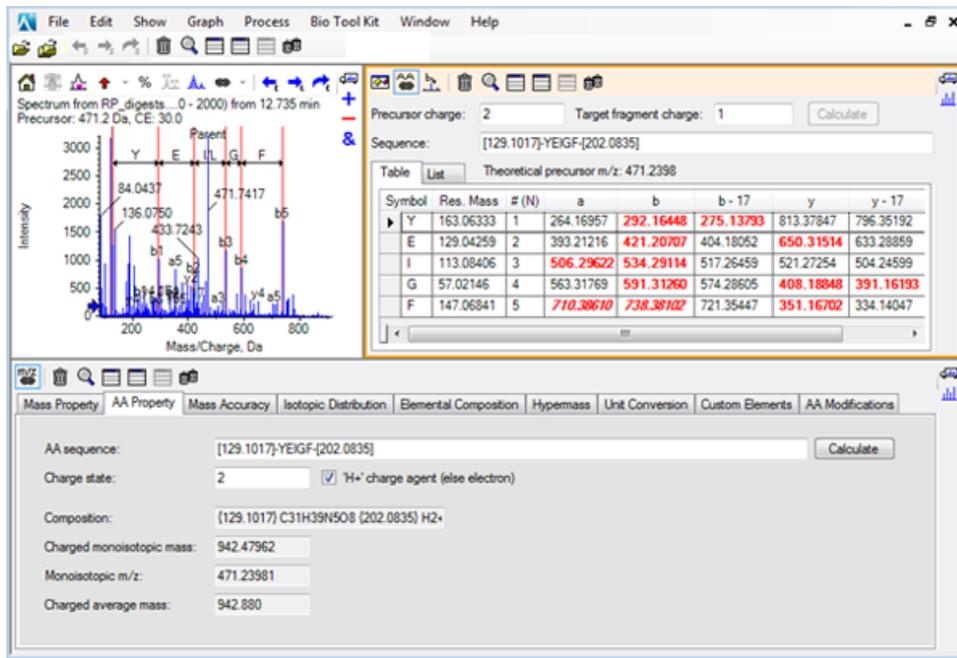
- Assicurarsi che la casella di controllo **Create Sequence (for Peptide Fragments Pane)** sia selezionata.
- Selezionare l'opzione **Assume b-series**.
- Digitare **471.2398** nel campo **Precursor m/z**.
- Digitare **2** nel campo **Precursor charge**.
- Digitare **1** nel campo **Fragment charge**.

7. Fare clic su **OK**.

Il riquadro Peptide Fragments e il riquadro Mass Calculators si aggiornano con i dati di sequenza aggiornati.

8. Fare clic sulla scheda **Table** nel riquadro **Peptide Fragments**.

Figura 6-11 Aggiornamento del riquadro Refreshed Peptide collegato con lo spettro ordinato manualmente



9. Con il riquadro Spectrum attivo, fare clic su **Bio Tool Kit > Clear Manual Sequencing**.

Tutti i segni di sequenza manuale vengono rimossi.

## Aggiungere e rimuovere i punti chiave ricostruiti manualmente

Utilizzare l'opzione **Add Manual Reconstruct Highlights** per aggiungere i marcatori che indicano le posizioni teoriche di  $m/z$  tra una data massa e uno spettro. Questa funzione è utile per confermare o meno se picchi particolari in uno spettro corrispondono allo stesso componente quando gli spettri contengono componenti multicarica. Utilizzare l'opzione **Remove Manual Reconstruct Highlights** per rimuovere i marcatori.

---

**Suggerimento!** Trascinare la linea verticale del marcatore su un nuovo valore di  $m/z$  per spostare il marcatore in una nuova posizione.

---

**Suggerimento!** Fare clic sulla linea verticale del marcatore o dell'etichetta dello stato di carica corrispondente per rendere attivo il marcatore. Il marcatore attivo mostra la posizione di  $m/z$ .

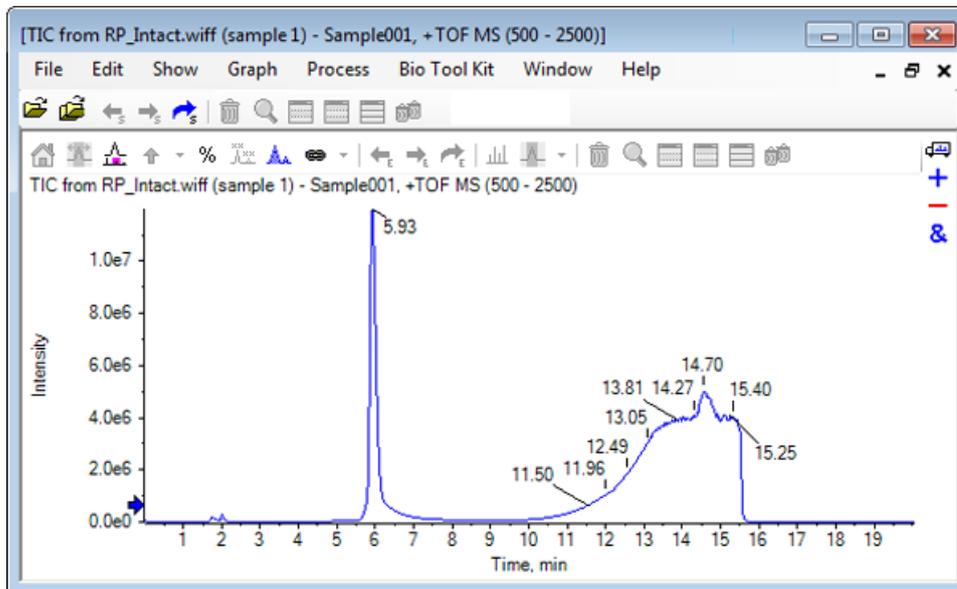
---

1. Fare clic sull'icona **Apri campione** nella barra degli strumenti principale.

Si aprirà la finestra di dialogo Select Sample.

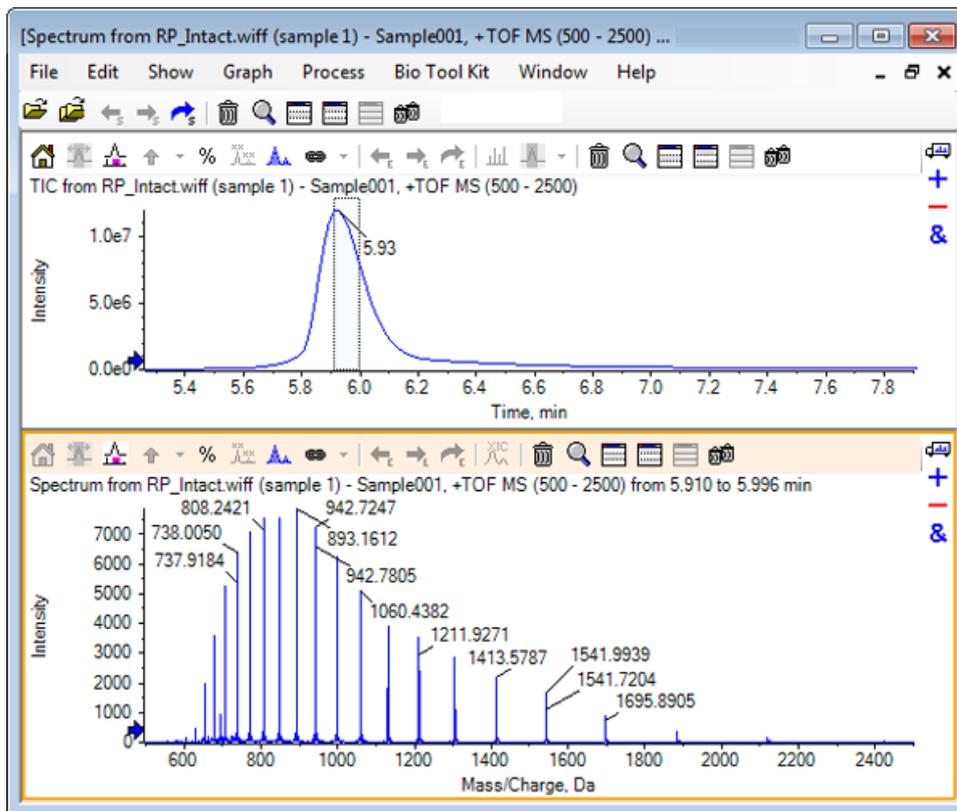
2. Se la cartella **Sample Data** non è già selezionata, fare clic su **Browse** e spostarsi sulla cartella **Sample Data**.
3. Selezionare il file **RP\_Intact.wiff** e fare clic su **OK**.

**Figura 6-12 TIC dal file RP\_Intact.wiff**



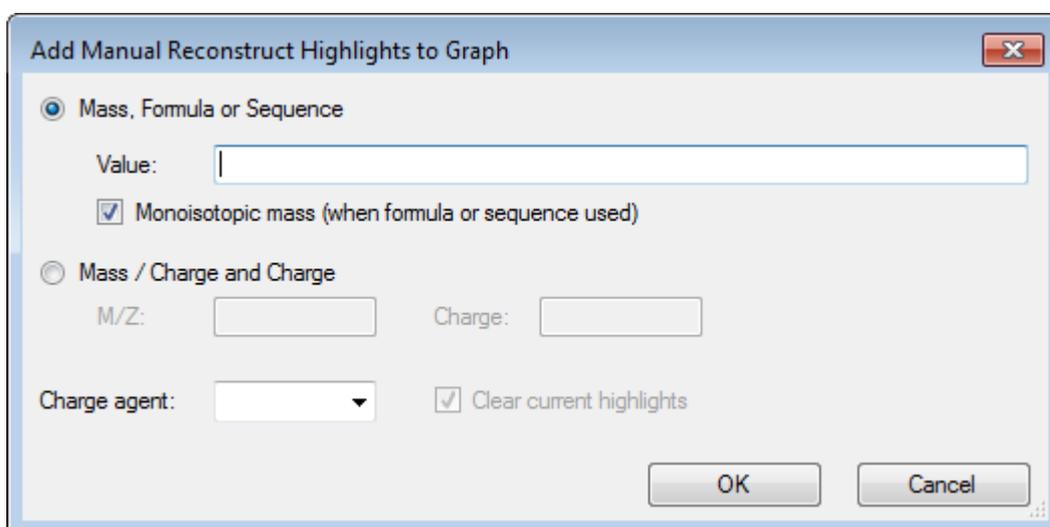
4. Creare uno spettro medio utilizzando l'area superiore (da 5.91 a 6.00 min) del picco per la mioglobina.

Figura 6-13 Spettro medio



5. Con il riquadro Spectrum attivo, fare clic su **Bio Tool Kit > Add Manual Reconstruct Highlights**.  
Si apre la finestra di dialogo **Add Manual Reconstruct Highlights to Graph**.

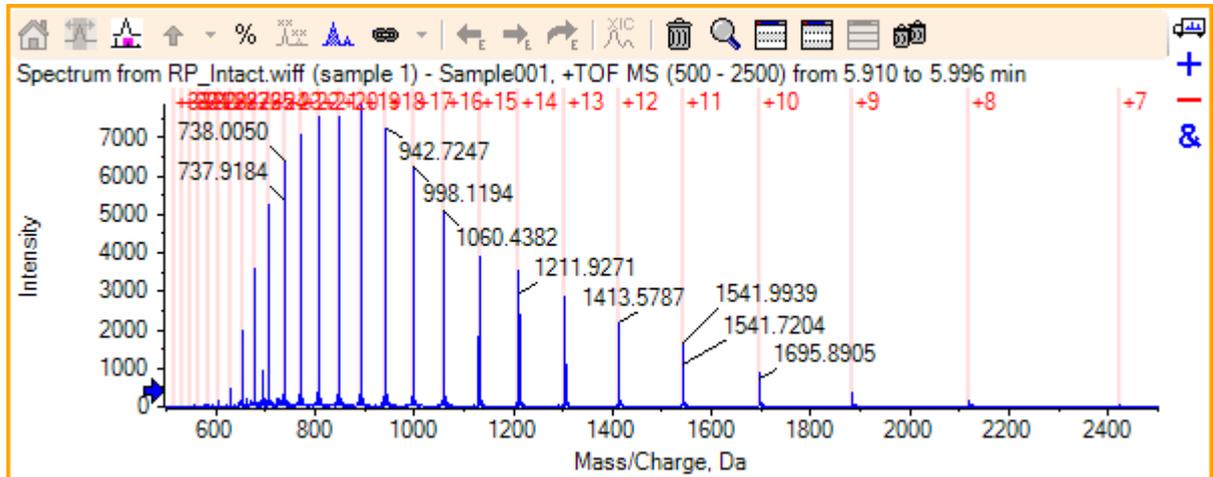
Figura 6-14 Add Manual Reconstruct Highlights to Graph



6. Digitare **16950** nel campo **Value**.
7. Selezionare **H+** come **Charge agent** e poi fare clic su **OK**.

Il grafico viene aggiornato e contiene i punti chiave.

**Figura 6-15 Spettro con punti chiave aggiunti**



8. Fare clic su **Bio Tool Kit > Remove Manual Reconstruct Highlights** per rimuovere i marcatori.

Il grafico viene aggiornato con i punti chiave rimossi.

## Proteina digerita

Utilizzare questa opzione per ottenere informazioni sulle sequenze peptidiche teoriche derivanti dalla scissione enzimatica definita dall'utente di una specifica proteina.

## Barra degli strumenti



Utilizzare le icone nella barra degli strumenti per regolare la visualizzazione come richiesto.

**Tabella 6-1 Icone della barra degli strumenti**

Icona	Nome (Suggerimento)
	Trovare e sostituire in sequenza
	Convertire selezione in maiuscolo
	Trovare sequenza

**Nota:** Le ultime sei icone in questa barra degli strumenti, a cominciare dall'icona Elimina questo riquadro, sono descritte in [Barra degli strumenti del riquadro generico](#).

---

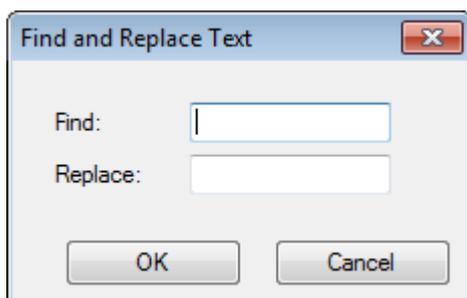
### Trovare e sostituire in sequenza

Utilizzare questa opzione per trovare un testo esistente nel campo **Sequence** e sostituirlo con il nuovo testo.

1. Fare clic sull'icona **Trovare e sostituire in sequenza**.

Si apre la finestra di dialogo **Find and Replace Text**.

**Figura 6-16** Finestra di dialogo Find and Replace Text



2. Digitare le informazioni da sostituire nel campo **Find**.
3. Digitare le informazioni appropriate nel campo **Replace**.
4. Fare clic su **OK**.

Il software sostituisce il testo esistente con testo di sostituzione specificato dall'utente.

### Convertire selezione in maiuscolo

Utilizzare questa opzione per convertire il testo digitato nel campo **Sequence** da carattere minuscolo a maiuscolo.

1. Selezionare il testo appropriato.
2. Fare clic sull'icona **Convertire selezione in maiuscolo**.

Il software sostituisce il testo in caratteri minuscoli con lo stesso testo in caratteri maiuscoli.

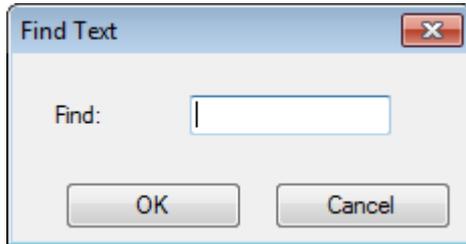
### Trovare sequenza

Utilizzare questa opzione per trovare un testo nel campo **Sequence**.

1. Fare clic sull'icona **Trovare sequenza**.

Si apre la finestra di dialogo **Find Text**.

Figura 6-17 Finestra di dialogo Find Text



2. Digitare le informazioni appropriate nel campo **Find**.
3. Fare clic su **OK**.

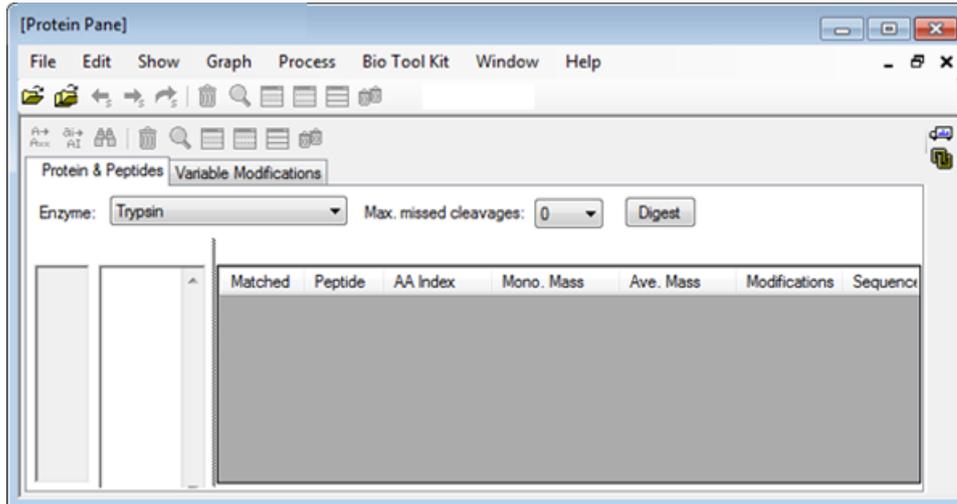
Il software evidenzia il testo corrispondente.

## Digestione teorica della proteina

1. Fare clic su **Bio Tool Kit > Digest Protein**.

Si apre il riquadro **Protein**.

Figura 6-18 Protein Pane - Scheda Protein &amp; Peptides



2. Digitare una sequenza di proteine o di peptidi nel campo fornito.

---

**Nota:** Per questa esercitazione, è stata utilizzata GLSDGEWQQV LNWGKVEAD IAGHGQEVLI RLFTGHPETL EKFDKFKHLK TEAEMKASED LKKHGTVLT ALGGILKKGK HHEAELKPLA QSHATKHKIP IKYLEFISDA IHHVLHSHKP GDFGADAQGA MTKALELFRN DIAAKYKELG FQG (sequenza di mioglobina).

---

3. Selezionare un **enzima**.

## Lavorare con la funzione Bio Tool Kit

**Nota:** Per questa esercitazione, è stata selezionata la Tripsina.

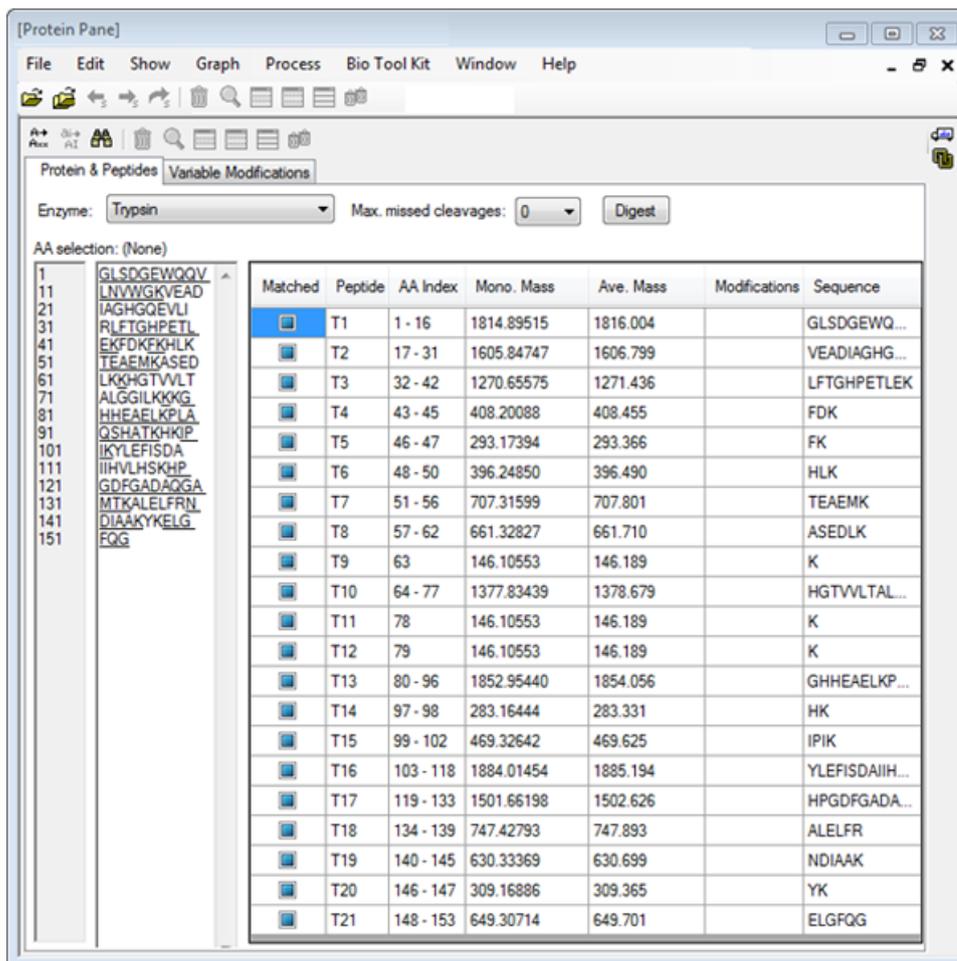
4. Selezionare **Max. missed cleavages**.

**Nota:** Per questa esercitazione, è stato selezionato 0.

5. Fare clic su **Digest**.

Il software compila la tabella con informazioni teoriche sui peptidi digeriti e sulle relative sequenze.

**Figura 6-19 Protein Pane compilato con informazioni teoriche**

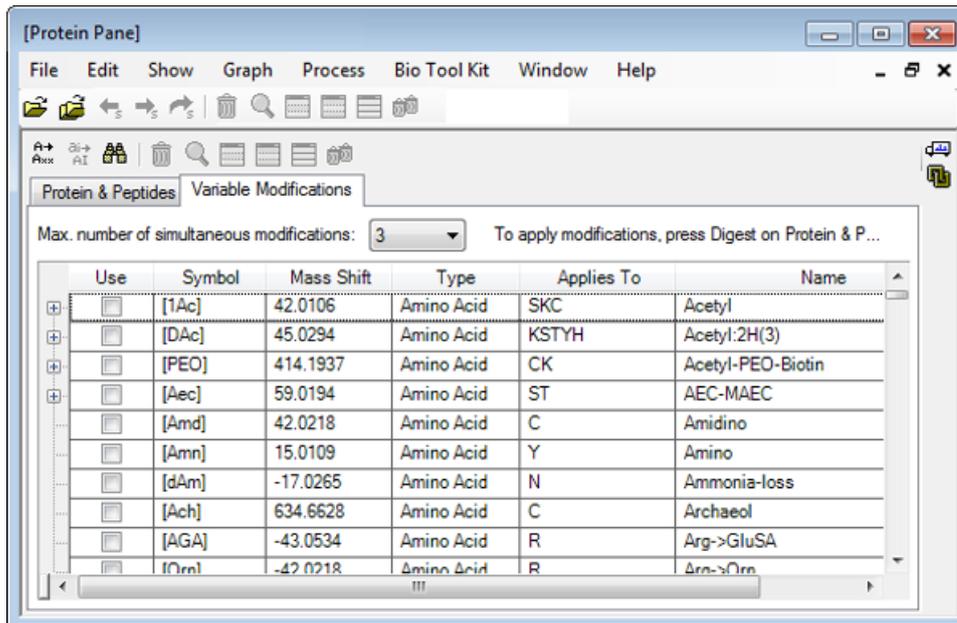


The screenshot shows the Protein Pane software interface. The 'Enzyme' is set to 'Trypsin' and 'Max. missed cleavages' is set to '0'. The 'Digest' button is visible. The 'Protein & Peptides' tab is active, showing a list of peptides on the left and a table of matched peptides on the right.

Matched	Peptide	AA Index	Mono. Mass	Ave. Mass	Modifications	Sequence
<input checked="" type="checkbox"/>	T1	1 - 16	1814.89515	1816.004		GLSDGEWQ...
<input checked="" type="checkbox"/>	T2	17 - 31	1605.84747	1606.799		VEADIAGHG...
<input checked="" type="checkbox"/>	T3	32 - 42	1270.65575	1271.436		LFTGHPETLEK
<input checked="" type="checkbox"/>	T4	43 - 45	408.20088	408.455		FDK
<input checked="" type="checkbox"/>	T5	46 - 47	293.17394	293.366		FK
<input checked="" type="checkbox"/>	T6	48 - 50	396.24850	396.490		HLK
<input checked="" type="checkbox"/>	T7	51 - 56	707.31599	707.801		TEAEMK
<input checked="" type="checkbox"/>	T8	57 - 62	661.32827	661.710		ASEDLK
<input checked="" type="checkbox"/>	T9	63	146.10553	146.189		K
<input checked="" type="checkbox"/>	T10	64 - 77	1377.83439	1378.679		HGTWLTAL...
<input checked="" type="checkbox"/>	T11	78	146.10553	146.189		K
<input checked="" type="checkbox"/>	T12	79	146.10553	146.189		K
<input checked="" type="checkbox"/>	T13	80 - 96	1852.95440	1854.056		GHHEAELKP...
<input checked="" type="checkbox"/>	T14	97 - 98	283.16444	283.331		HK
<input checked="" type="checkbox"/>	T15	99 - 102	469.32642	469.625		IPIK
<input checked="" type="checkbox"/>	T16	103 - 118	1884.01454	1885.194		YLEFISDAIH...
<input checked="" type="checkbox"/>	T17	119 - 133	1501.66198	1502.626		HPGDFGADA...
<input checked="" type="checkbox"/>	T18	134 - 139	747.42793	747.893		ALELFR
<input checked="" type="checkbox"/>	T19	140 - 145	630.33369	630.699		NDIAAK
<input checked="" type="checkbox"/>	T20	146 - 147	309.16886	309.365		YK
<input checked="" type="checkbox"/>	T21	148 - 153	649.30714	649.701		ELGFQG

6. Fare clic sulla scheda **Variable Modifications**.

Figura 6-20 Protein Pane - Scheda Variable Modifications



7. Selezionare un **Max. number of simultaneous modifications**.

---

**Nota:** Per questa esercitazione, è stato selezionato 3.

---

8. Selezionare la casella di controllo nella colonna **Use** per le modifiche appropriate.

---

**Suggerimento!** Se un'icona è mostrata alla sinistra della casella di controllo, è possibile selezionare l'intero elenco di amminoacidi o solo quelli che sono applicabili.

---

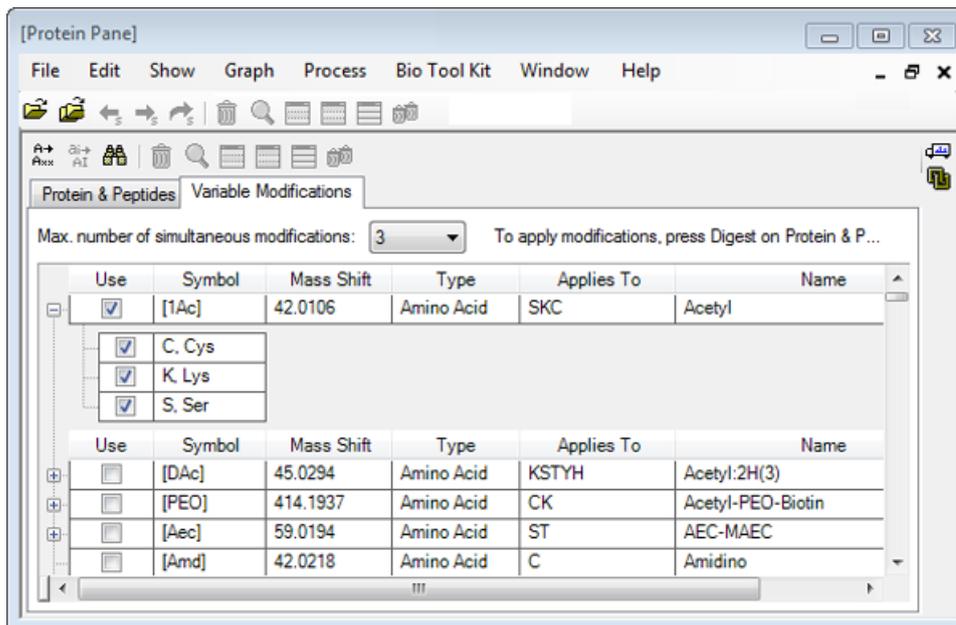


---

**Nota:** Per questa esercitazione, è stata selezionata la casella di controllo per [1Ac].

---

Figura 6-21 Esempio di modifiche selezionate

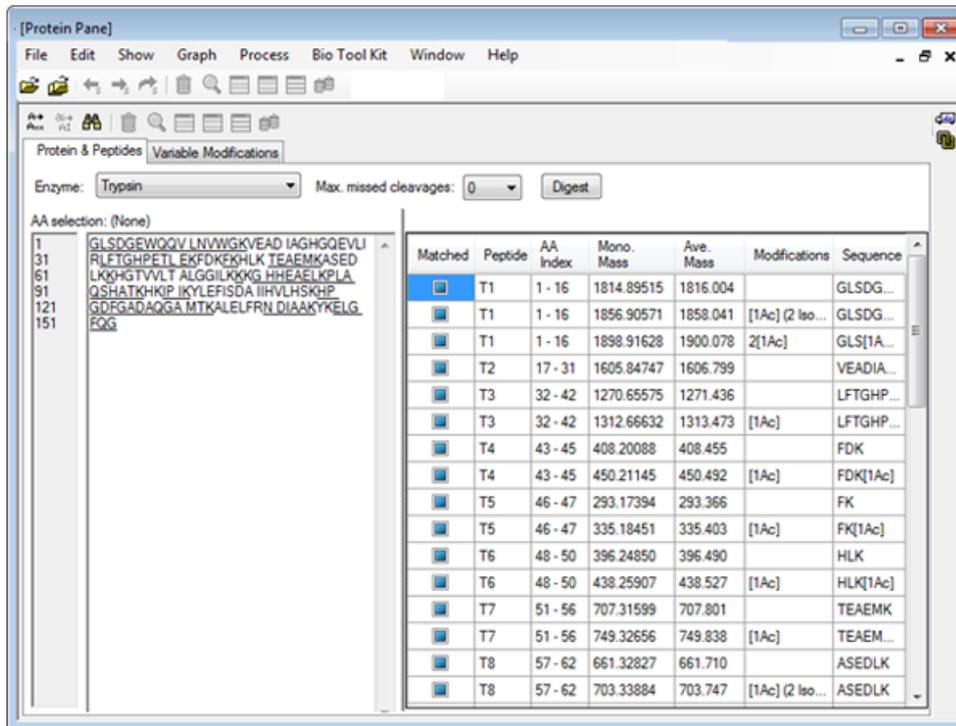


9. Fare clic sulla scheda **Protein & Peptides**.

10. Fare clic su **Digest**.

I risultati nella tabella sono modificati per rispecchiare le selezioni eseguite dall'utente.

Figura 6-22 Protein Pane compilato con informazioni modificate



## Ricostruzione peptide cromatografia liquida a spettrometria di massa (LCMS)

La ricostruzione peptide LCMS identifica i picchi spettrali ed esegue la deconvoluzione dai picchi spettrali identificati. Lo strumento di ricostruzione peptide LCMS funziona in due fasi. In primo luogo, i picchi si trovano utilizzando l'algoritmo di ricerca del picco "Enhance". In secondo luogo, lo strumento trova i gruppi dei picchi che formano le serie di isotopi e di carica e segnala la massa neutra di tutti i componenti trovati.

1. Fare clic sull'icona **Apri campione** nella barra degli strumenti principale.

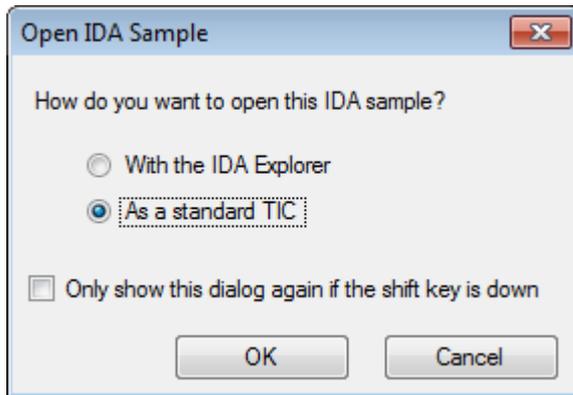
Si aprirà la finestra di dialogo **Select Sample**.

2. Se la cartella Sample Data non è già selezionata, fare clic su **Browse** e spostarsi sulla cartella **Sample Data**.

3. Selezionare il file **RP\_digests.wiff** e fare clic su **OK**.

Si aprirà la finestra di dialogo **Open IDA Sample**.

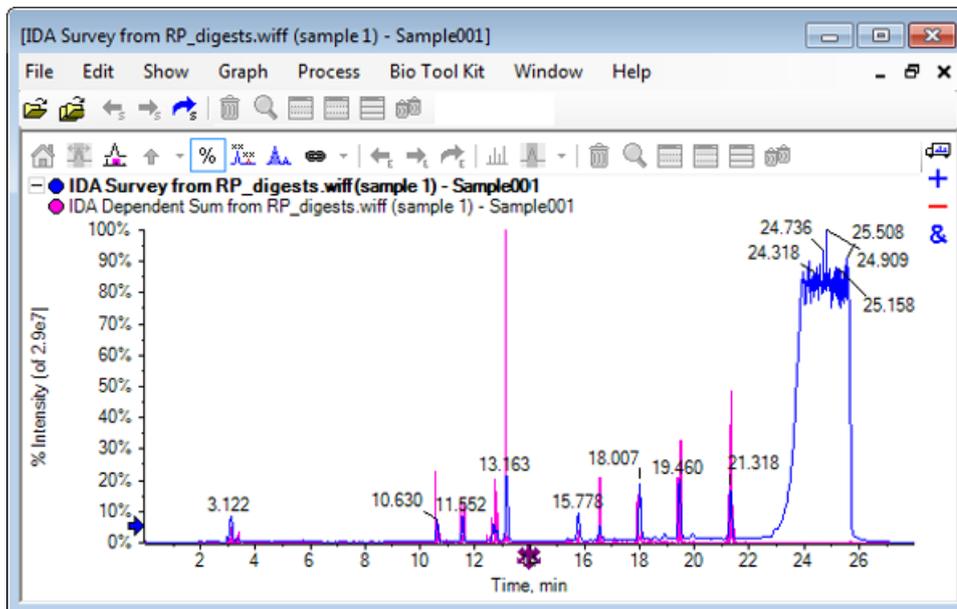
Figura 6-23 Finestra di dialogo Open IDA Sample



4. Assicurarsi che l'opzione **As a standard TIC** sia selezionata e quindi fare clic su **OK**.

Assicurarsi che la prima traccia, **IDA Survey from RP\_digests.wiff (sample 1) - Sample001**, sia mostrata in grassetto. Se necessario, selezionare questa traccia.

Figura 6-24 IDA Survey from RP\_digests.wiff



5. Fare clic su **Bio Tool Kit > LCMS Peptide Reconstruct (with peak finding)**.

Si apre la finestra di dialogo **LCMS Peptide Reconstruct Options**.

Figura 6-25 Finestra di dialogo LCMS Peptide Reconstruct Options

LCMS Peptide Reconstruct Options

Time Range  
Minimum retention time: 0.00 min  Maximum retention time: 0.00 min

'Enhance' Peak Finding  
Approximate LC peak width:  sec Minimum intensity in counts: 5 counts  
 Perform background subtraction Chemical noise intensity multiplier: 1.5

Charge Deconvolution  
Mass tolerance: 0.100 Da Maximum charge: 5

OK Cancel

6. Digitare i seguenti valori nei campi specificati:

- **9.00** min nel campo **Minimum retention time**
- Selezionare la casella di controllo **Maximum retention time** e digitare **16.00** nel campo
- **6.0** sec nel campo **Approximate LC peak width**

**Nota:** La larghezza approssimativa del picco viene utilizzata per determinare l'offset durante la sottrazione del fondo.

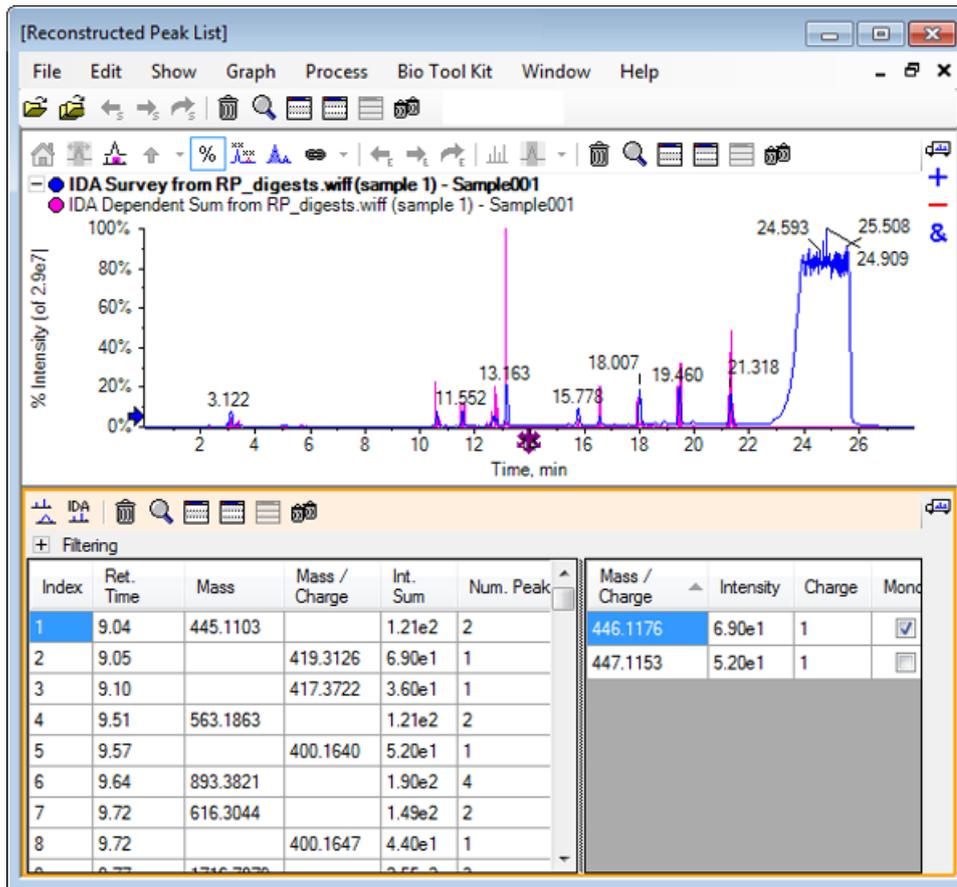
- **5** conteggi nel campo **Minimum intensity in counts**
- **1.5** nel campo **Chemical noise intensity multiplier**
- **0.100** Da nel campo **Mass tolerance**
- **5** nel campo **Maximum charge**

**Nota:** La tolleranza di massa nella sezione carica deconvoluzione fa in modo che il picco ricostruito sia abbinato con la proteina teoricamente digerita e che i diversi valori  $m/z$  appartenenti allo stesso peptide siano raggruppati insieme.

7. Fare clic su **OK**.

Il software mostra una tabella di peptidi separati dal tempo di ritenzione. Le seguenti informazioni vengono fornite per ogni peptide elencato: **Index, Ret. Time, Mass, Mass / Charge, Int. Sum** e **Num. Peaks**.

Figura 6-26 Reconstructed Peak List



8. Espandere **Filtering** per mostrare le opzioni di filtro disponibili.

Le opzioni di filtro disponibili includono: **Intensity threshold**, **Min. Num. Peaks** e **Show matched peaks only**.

Figura 6-27 Opzioni di filtraggio

Filtering

Intensity threshold:

Min. Num. Peaks:   Show matched peaks only

Index	Ret. Time	Mass	Mass / Charge	Int. Sum	Num. Peak	Mass / Charge	Intensity	Charge	Mono
1	9.04	445.1103		1.21e2	2	446.1176	6.90e1	1	<input checked="" type="checkbox"/>
2	9.05		419.3126	6.90e1	1	447.1153	5.20e1	1	<input type="checkbox"/>
3	9.10		417.3722	3.60e1	1				
4	9.51	563.1863		1.21e2	2				
5	9.57		400.1640	5.20e1	1				
6	9.64	893.3821		1.90e2	4				

9. Selezionare uno o più filtri per regolare la visualizzazione, come richiesto.

**Nota:** In questo tutorial, la soglia di intensità è stata impostata su 2.39e4 e il Min. Num. Peaks è stato impostato su 4.

Figura 6-28 Elenco picchi filtrato ricostruito

Filtering

Intensity threshold:

Min. Num. Peaks:   Show matched peaks only

Index	Ret. Time	Mass	Mass / Charge	Int. Sum	Num. Peaks	Mass / Charge	Intensity	Charge	Mono.
1	10.62	1501.6620		2.39e5	17	501.5605	2.98e4	3	<input checked="" type="checkbox"/>
2	11.55	1270.6542		2.98e5	16	501.8947	3.22e4	3	<input type="checkbox"/>
3	12.68	940.4651		1.93e5	9	502.2281	1.41e4	3	<input type="checkbox"/>
4	13.15	1605.8489		8.62e5	18	502.5619	5.46e3	3	<input type="checkbox"/>
5	15.76	563.3048		1.53e5	4	502.8962	2.39e3	3	<input type="checkbox"/>
6	15.78	747.4268		1.96e5	4	503.2294	3.95e2	3	<input type="checkbox"/>
						751.8383	3.89e4	2	<input checked="" type="checkbox"/>

## Barra degli strumenti



## Lavorare con la funzione Bio Tool Kit

Utilizzare le icone nella barra degli strumenti per regolare la visualizzazione come richiesto.

### Tabella 6-2 Icone della barra degli strumenti

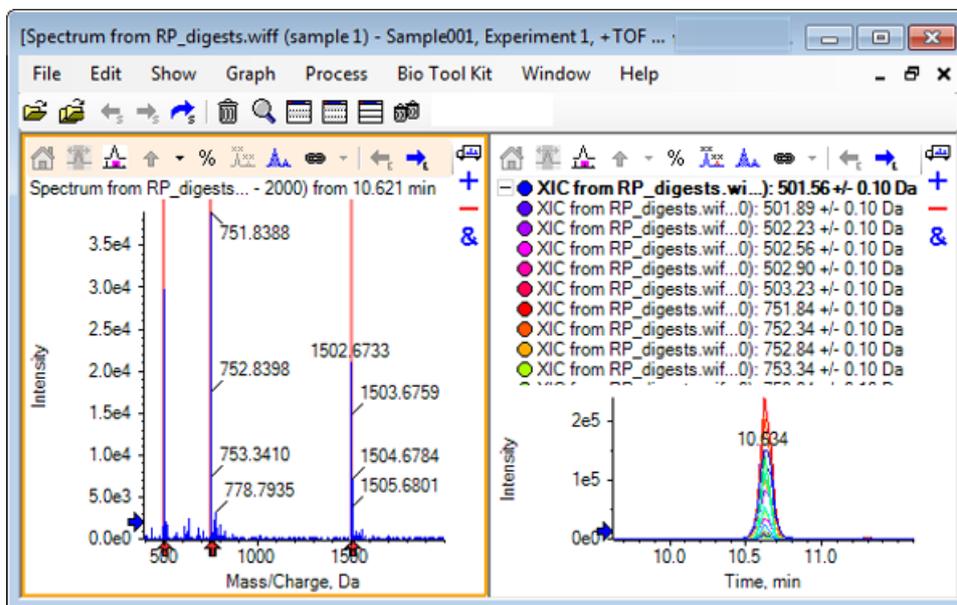
Icona	Nome (Suggerimento)
	Mostrare spettro e XIC
	Visualizzare gli spettri IDA MS/MS

**Nota:** Le ultime sei icone in questa barra degli strumenti, a cominciare dall'icona Elimina questo riquadro, sono descritte in [Barra degli strumenti del riquadro generico](#).

### Mostrare spettro e XIC

Quando l'icona **Mostrare spettro e XIC** è selezionata, verrà aperto il seguente spettro e i riquadri XIC:

#### Figura 6-29 Risultati di Mostrare spettro e XIC



Per lo spettro MS generato, una freccia è mostrata sotto ogni picco che ha contribuito alla massa del peptide. Il XIC di ogni picco  $m/z$  che ha contribuito alla massa del peptide viene visualizzato come sovrapposizioni nel riquadro a destra.

### Visualizzare gli spettri IDA MS/MS

Quando l'icona **Visualizzare gli spettri IDA MS/MS** è selezionata, verrà aperto il seguente riquadro spettro:

## Ricostruzione peptide LCMS con proteina digerita

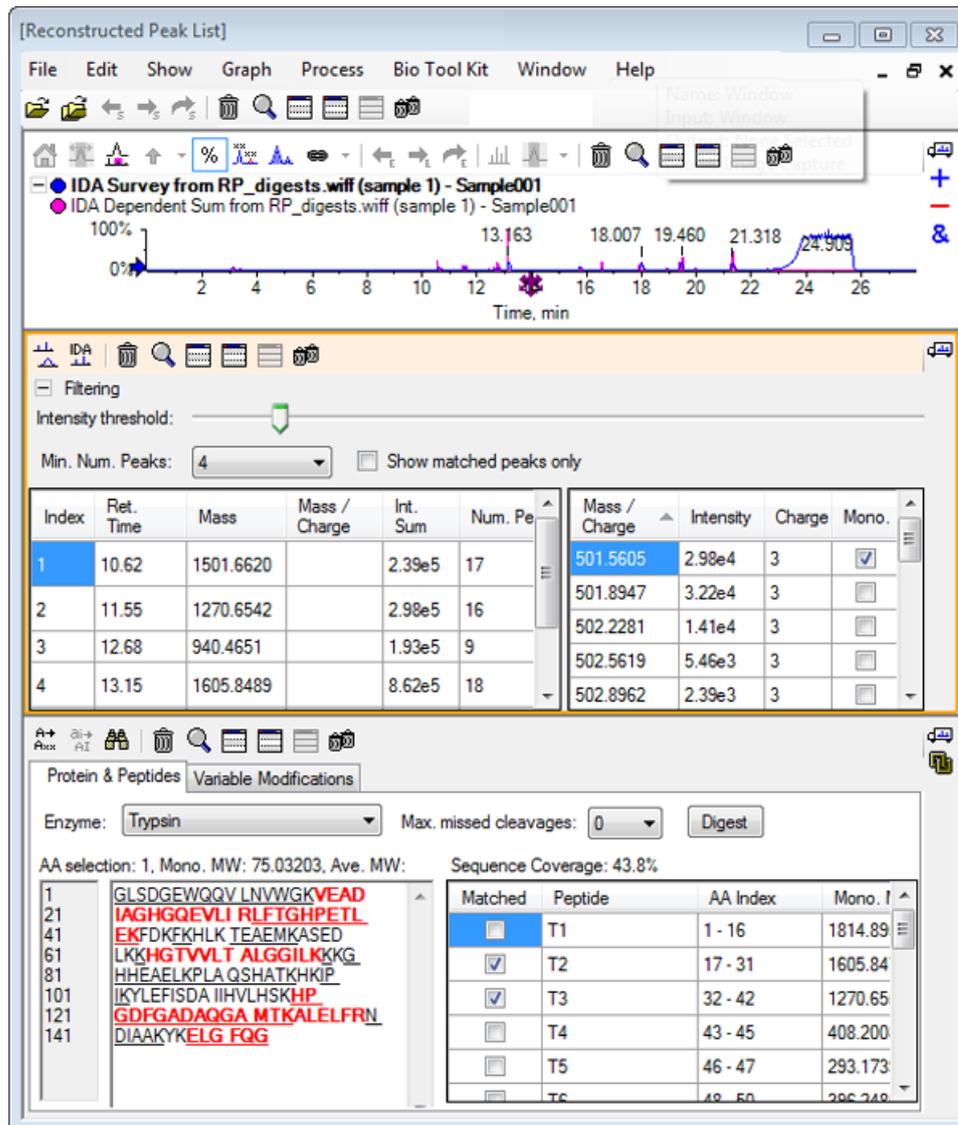
1. Fare clic su **Bio Tool Kit > Digest Protein**.

Si apre il riquadro **Protein**.

2. Trascinare l'icona **Trascinare su un riquadro di proteine per impostare il proprio elenco di picchi** nel riquadro **Protein** nel riquadro **Reconstructed Peak List**.

Il riquadro **Protein** si aggiorna, mostrando le sequenze di peptidi nel riquadro **Protein** corrispondenti a quelle nel **Reconstructed Peak List**. I frammenti nel riquadro **Protein** mostrati in carattere rosso grassetto sono i frammenti con corrispondenze esatte nel riquadro **Reconstructed Peak List**. I frammenti mostrati in normale carattere rosso sono frammenti che avrebbero corrisposto ai frammenti nel riquadro **Reconstructed Peak List** se fosse stato loro assegnato lo stato di carica indicato fra parentesi nella colonna **Match** del riquadro **Reconstructed Peak List**. I frammenti mostrati in carattere nero sono frammenti che non corrispondono ad alcun frammento nel riquadro **Reconstructed Peak List**.

Figura 6-30 Informazioni teoriche sul riquadro Protein collegato al Reconstructed Peak List



## Ricostruire la proteina

Utilizzare questa opzione per ottenere la massa media (peso molecolare) di una proteina intatta.

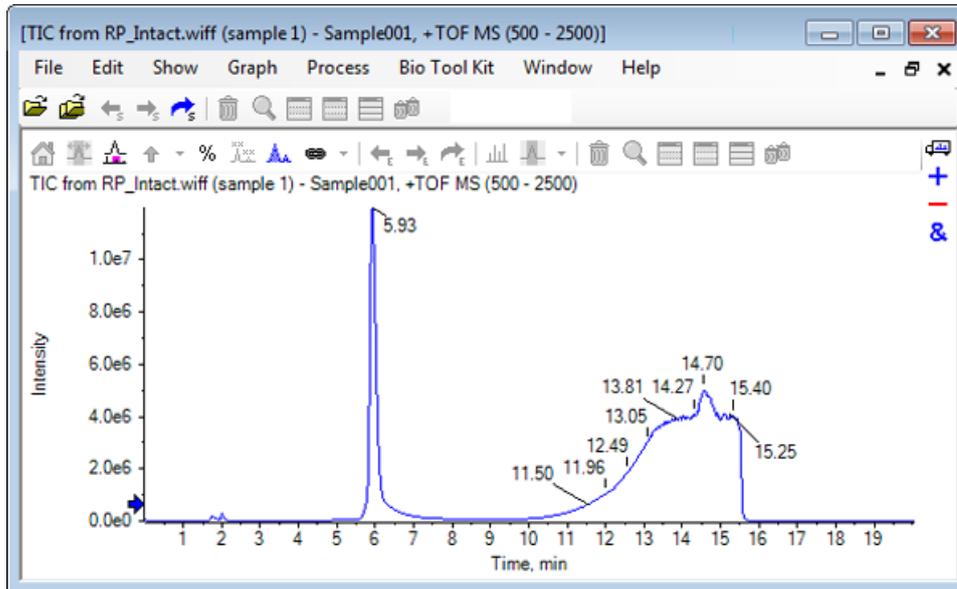
1. Fare clic sull'icona **Apri campione** nella barra degli strumenti principale.

Si aprirà la finestra di dialogo **Select Sample**.

2. Se la cartella **Sample Data** non è già selezionata, fare clic su **Browse** e spostarsi sulla cartella **Sample Data**.

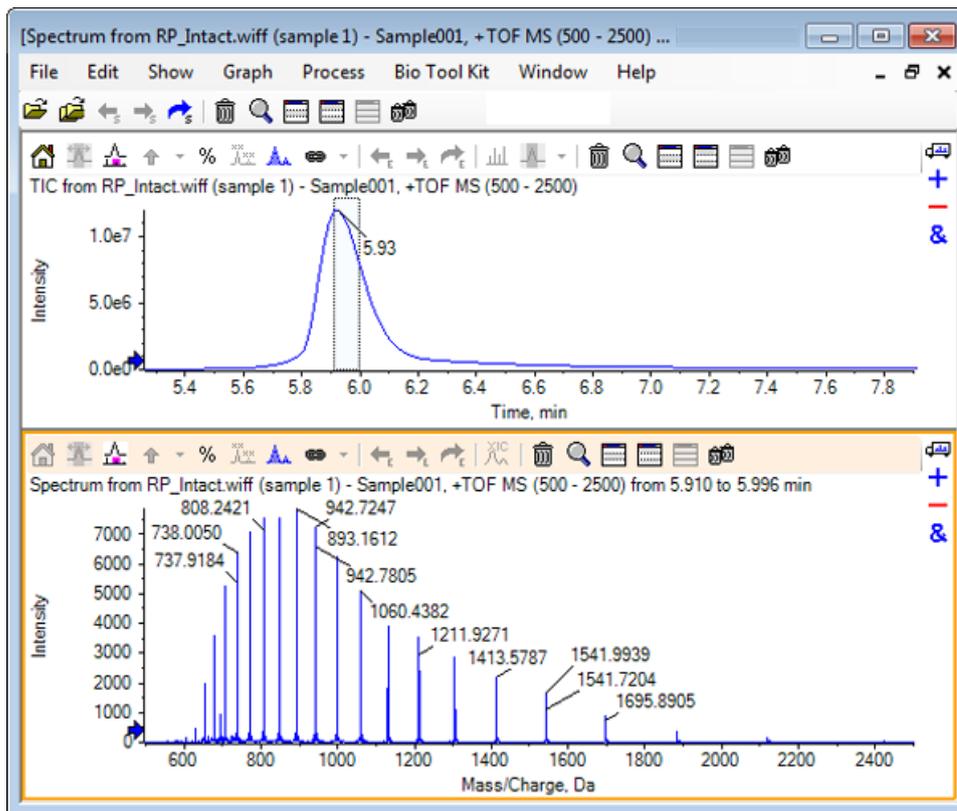
3. Selezionare il file **RP\_Intact.wiff** e fare clic su **OK**.

**Figura 6-31** TIC dal file **RP\_Intact.wiff**



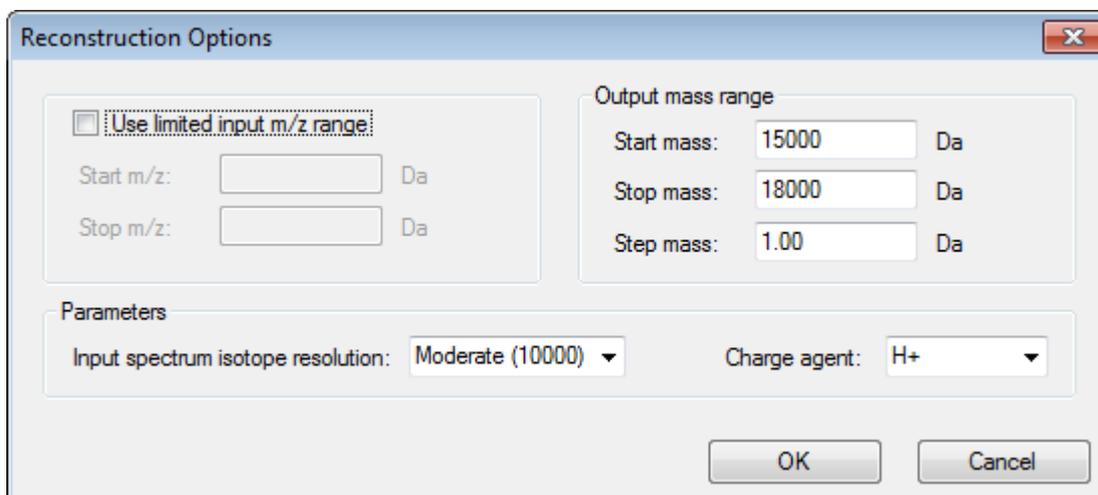
4. Creare uno spettro mediato utilizzando una regione del picco a 5.93 min. Fare riferimento alla [Figura 6-32](#).

Figura 6-32 Spettro medio



5. Col riquadro dello spettro attivo, fare clic su **Bio Tool Kit > Reconstruct Protein**.  
Si apre la finestra di dialogo **Reconstruction Options**.

Figura 6-33 Reconstruction Options



6. Digitare i valori appropriati per le seguenti opzioni:

- **Start mass:** 15000 Da
- **Stop mass:** 18000 Da
- **Step mass:** 1.0 Da

7. Selezionare il valore appropriato di **Input spectrum isotope resolution:** Moderate (10000).

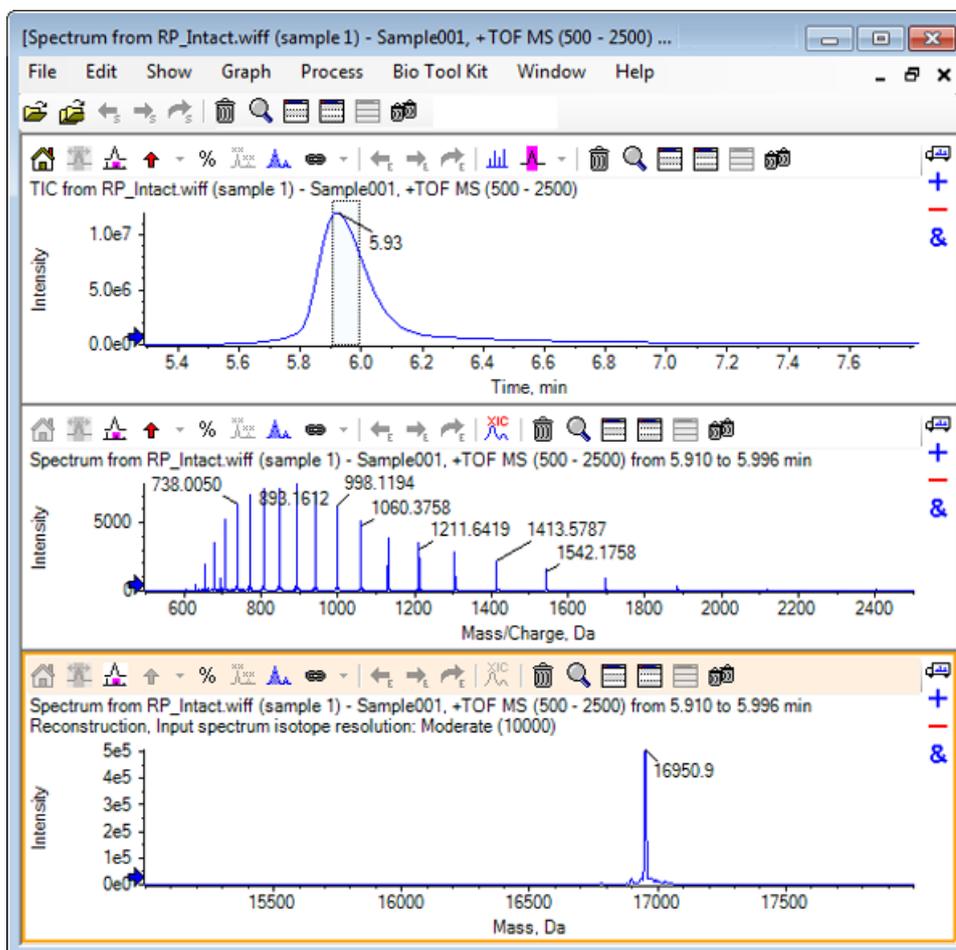
**Nota:** Per i dati acquisiti utilizzando un sistema a quadrupolo, è mostrato il parametro Peak width invece del parametro Input spectrum isotope resolution.

8. Selezionare il valore appropriato di **Charge agent:** H+.

9. Fare clic su **OK**.

Il software genera uno spettro della proteina ricostruita in un riquadro separato col titolo: **Reconstruction, Input spectrum isotope resolution [user selection]**.

Figura 6-34 Riquadro Ricostruzione

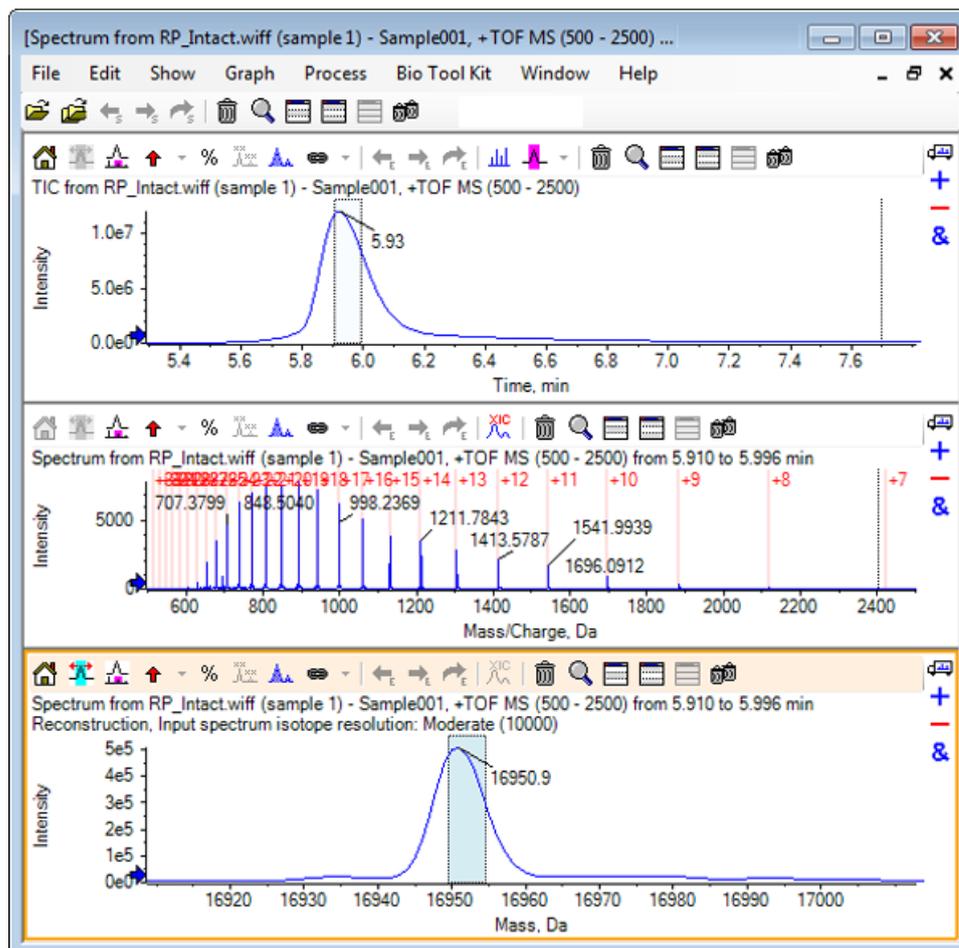


**Nota:** Per dati acquisiti utilizzando un sistema a quadrupolo, il titolo nel riquadro è: Reconstruction, Peak width [value].

10. Selezionare il picco della proteina ricostruita.

I punti chiave di ricostruzione manuale verticale sono aggiunti allo spettro selezionato per generare la proteina ricostruita.

**Figura 6-35** Spettro con punti chiave di ricostruzione manuale



## Riepilogo

In questa sezione sono state trattate le seguenti attività:

- Ordinare manualmente i dati spettrali MS/MS da un campione di proteine digerito.
- Collegare uno spettro ordinato manualmente con frammenti peptidici.

- Aggiungere marcatori (punti chiave ricostruiti manualmente) che indicano le posizioni del rapporto teorico  $m/z$  di una data massa in uno spettro.
- Rimuovere i marcatori da uno spettro.
- Ottenere informazioni sulle sequenze peptidiche teoriche derivanti dalla scissione enzimatica definita dall'utente di una specifica proteina.
- Utilizzare la ricostruzione peptide LCMS per identificare i picchi spettrali ed eseguire la deconvoluzione dei picchi spettrali identificati.
- Collegare le informazioni teoriche su un riquadro di proteine con una lista dei picchi ricostruiti.
- Ottenere la massa media (peso molecolare) di una proteina intatta.