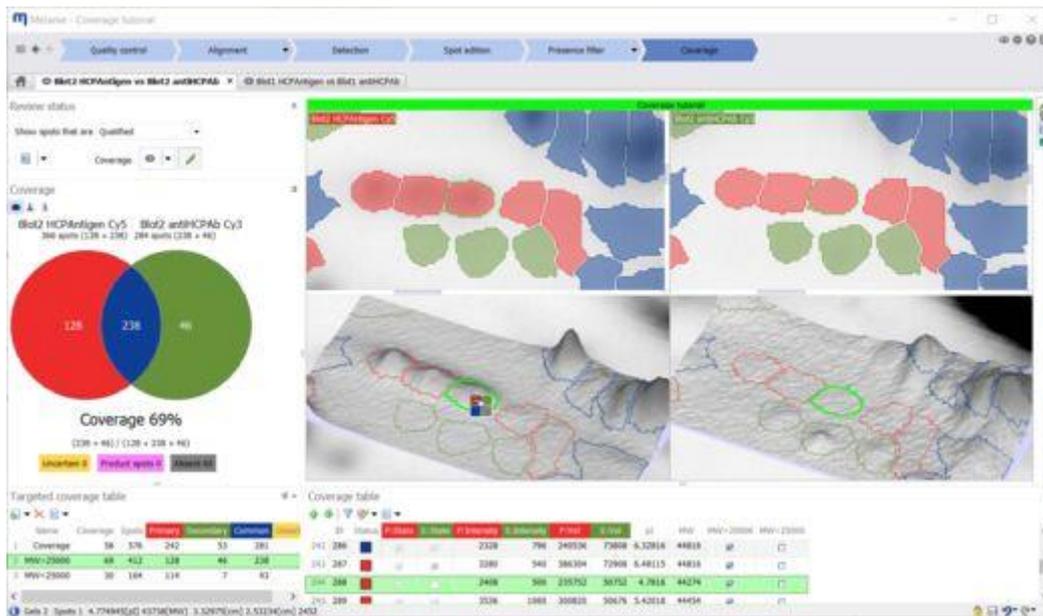


# Melanie 9

## Coverage

簡易操作手順



# Melanie 9 操作ガイド\_Coverage DIGE/DIBE\_version9.2

## Coverage DIGE/DIBE

この章では、Melanie Coverage DIGE/DIBE を用いて同一メンブレン上に存在する HCP 抗原と免疫応答パターンを比較し、そのカバレージを算出する方法について説明します。

このチュートリアルでは、2 枚の DIBE 解析を解説しています。

### Coverage DIGE/DIBE とは

HCP 抗原と抗 HCP 抗体の反応性が同じ支持体（ゲルまたはプロット）で検出された 2D DIGE または 2D DIBE 実験のカバレージ解析には、このオプションを使用します。

ゲル番号	Cy3 〈抗体〉	Cy5 (HCP)
Blot1	Blot1 antiHCPAb Cy3.tif	Blot1 HCPAntigen Cy5.tif
Blot2	Blot2 antiHCPAb Cy3.tif	Blot2 HCPAntigen Cy5.tif

このチュートリアルでは、C:\Program Files\GE Healthcare\Melanie 9\Tutorials にある 4 枚の TIF ファイルを使用します。

## 1 ソフトウェアの起動、終了

### 1.1 ソフトウェアの起動



Melanie は、Microsoft Windows のメニューで Start > Programs > Melanie9 を選択することにより起動します。デスクトップ上の Melanie のアイコンをダブルクリックして起動することもできます。

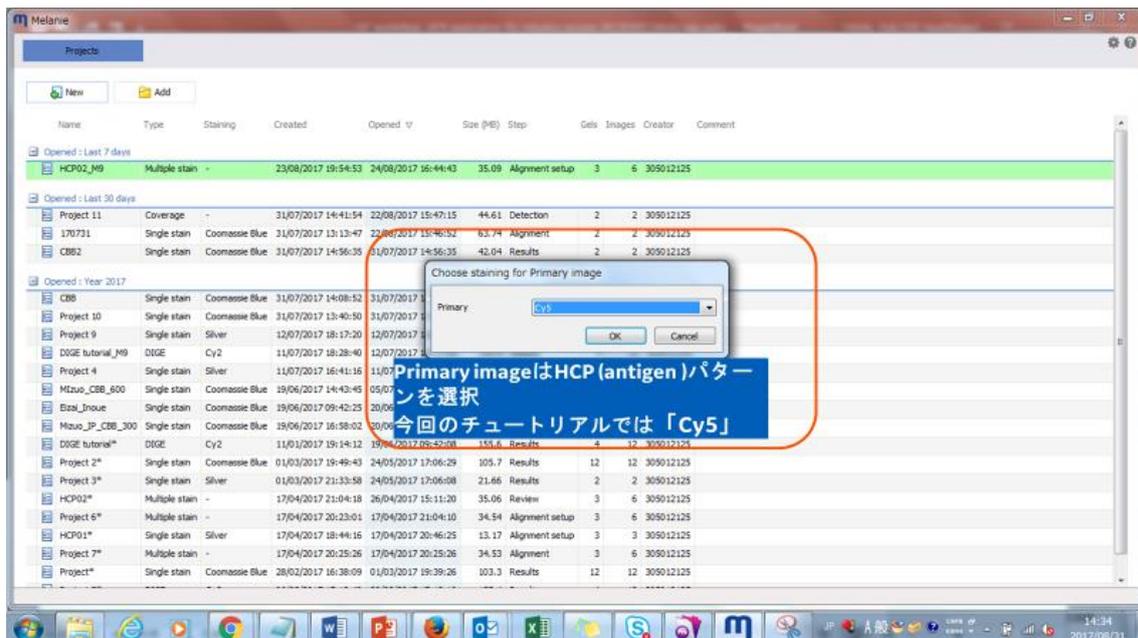
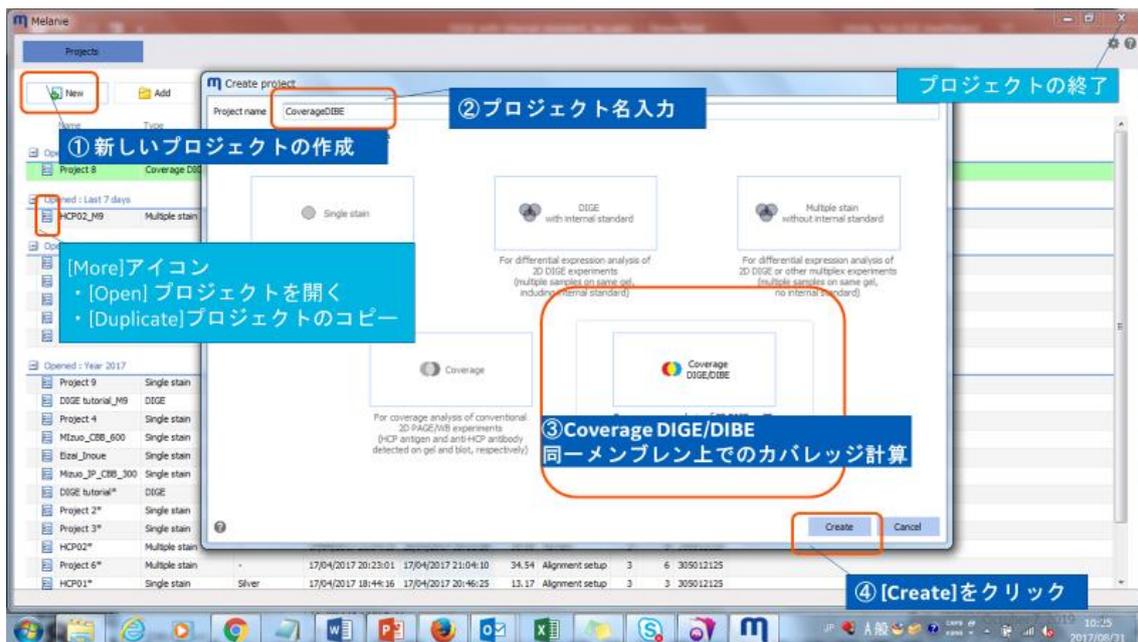
### 1.2 ソフトウェアの終了

Melanie のプログラムを閉じるには、メニューの File > Exit を選択します。プログラムウィンドウの右上端の Close ボタンをクリックすることもできます。Melanie は、終了する前にゲルイメージやそれらとマッチングするデータに対する修正を保存するかどうかを確認するダイアログボックスが現れます。開いているワークスペースは自動的に保存されます。

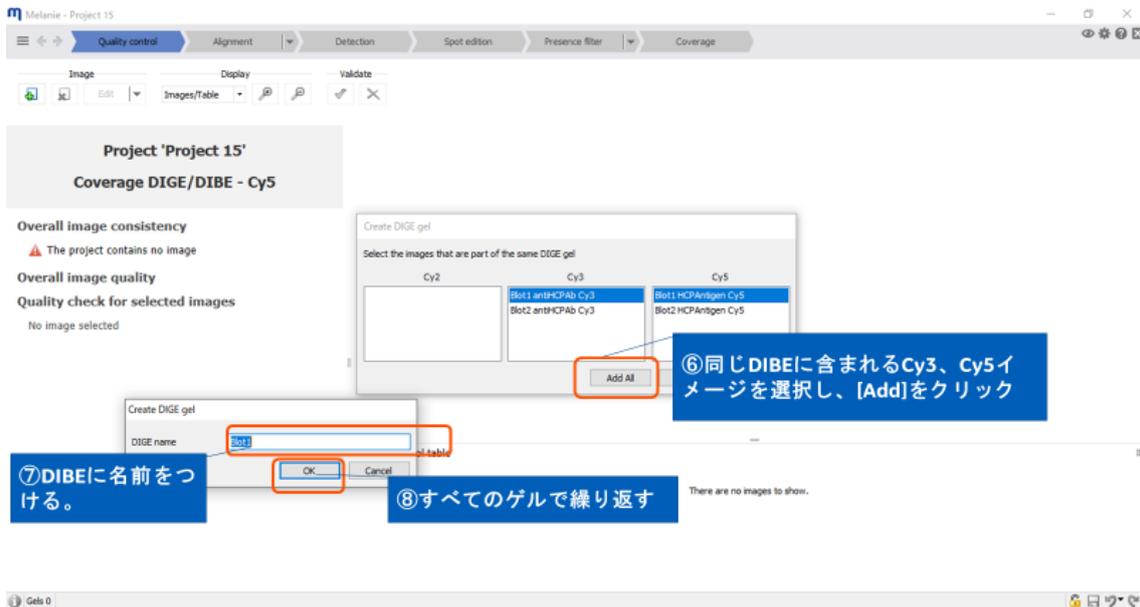
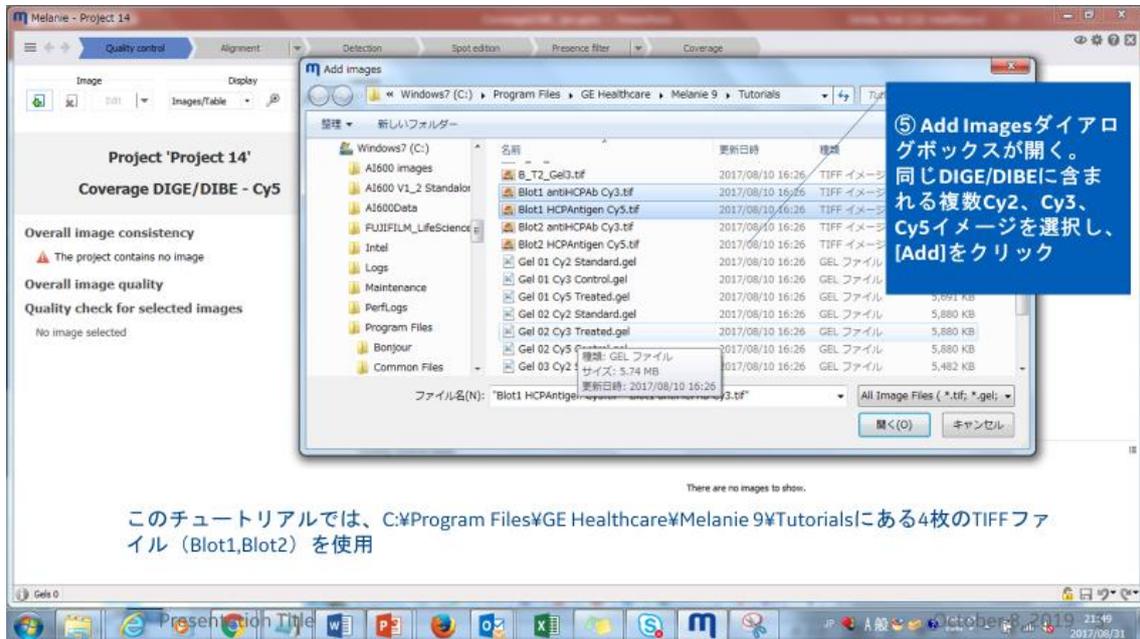
## 2 Projects

解析の最初のステップは、プロジェクトを作成し、ゲル画像をインポートすることです。これらの画像は自分の画像にすることもできますし、Single Stain チュートリアルや DIGE チュートリアル画像を使用することもできます。

### 2.1 新しいプロジェクトを作成する

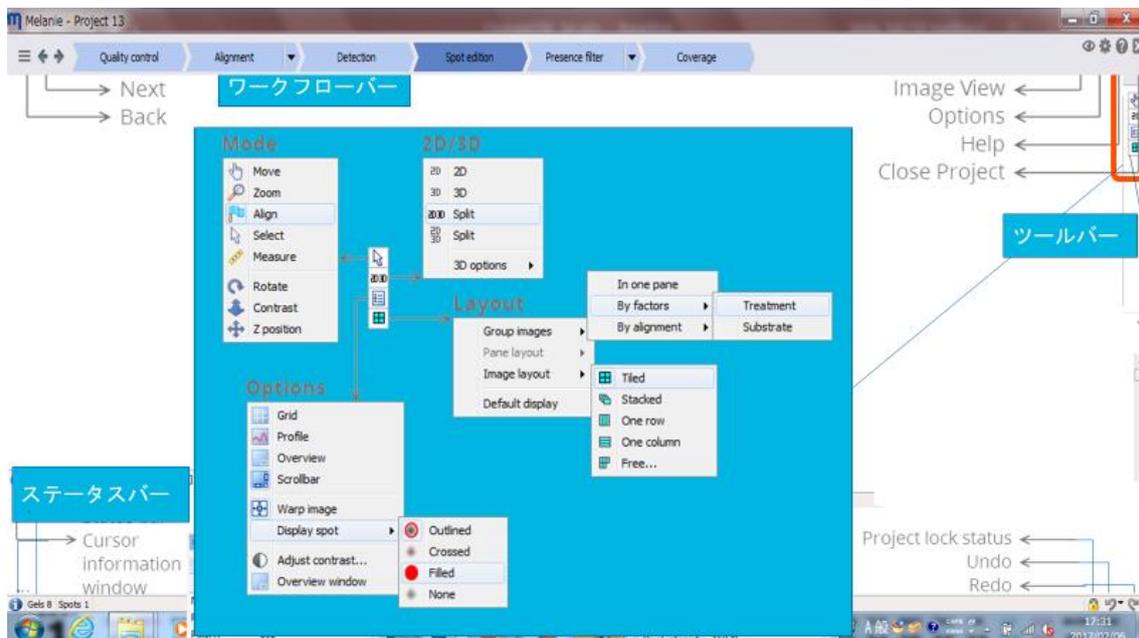


## 2.2 イメージを選択する



### 3 表示領域

表示領域には、画像ビューが表示されます。 ツールバーのさまざまなオプションを使用して、これらのビューを操作およびカスタマイズできます。



#### 3.1 2D/3D 表示の操作

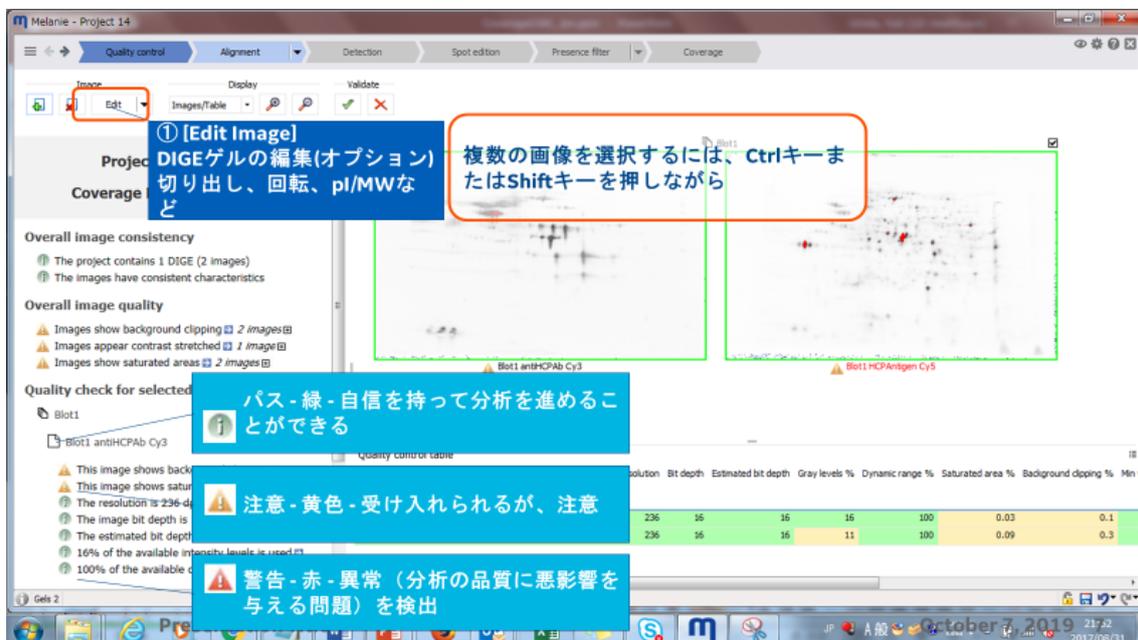
	2D view	3D view
イメージの移動	スクロールホイールを押しながらドラッグ スクロールホイールをダブルクリックし選択域の中央を表示	Ctrl + スクロールホイールを押しながらドラッグ
イメージのズーム	スクロールホイールを回転	スクロールホイールを回転
イメージの回転	-	スクロールホイールを押しながらドラッグ
ピーク高の変化	-	Ctrl + スクロールホイールを回転

## 4 解析のステップを以下に要約します

<b>Quality control</b>	画像の品質と整合性の確認 Melanie は、画像キャプチャ手順を最適化するために必要なフィードバックを提供します。必要に応じて、ゲルの再スキャンや画像の編集を行います。
<b>Alignment</b>	画像の補正と、ゲル同士の位置変化の修正 アライメント階層内の画像を補正し、ツールを使用して各アライメントペアを体系的に見直し、必要に応じてマッチを編集します。
<b>Detection</b>	すべての画像のスポットの検出と定量化 自動的に計算された検出パラメータを微調整し、典型的なスポットパターンの生成に考慮する画像を選択します。
<b>Spot edition</b>	高度な選択基準に基づいてスポットをフィルタリングし、スポットを編集します。また、製品由来スポットを定義することができます。
<b>Presence filter</b>	スポットの存在量(intensity、volume、%)のしきい値を設定して、スポットを無し absent、有り present または不確実 uncertain と分類できます。カバレッジステップで不確実なスポットをすばやく確認できます。
<b>Coverage</b>	専用ツールを使用してカバレッジ結果を調べたり編集したりできます。デフォルトの画面には、カバレッジペアのうちの 1 つのカバレッジが表示されます。2 枚以上のプロット解析の場合、追加の画像ペアのカバレッジを調べ、すべての結果の要約を表示することができます。

## 5 Quality control

Quality Control ステップでは、画像とそのプロパティを表示し、品質と整合性をチェックし、必要に応じて編集し、さらに解析するイメージを検証することができます。画像の追加、削除、名前の変更も可能です。



### 5.1 イメージの編集

Edit > Edit images ボタンをクリックすると、イメージ編集モードに移行します。



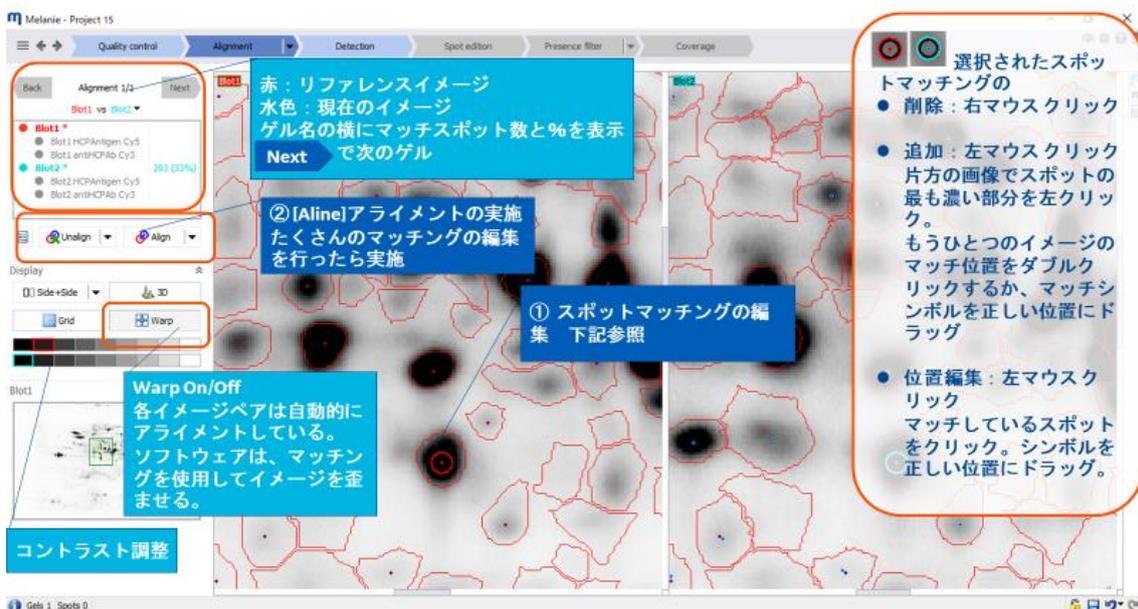
## 6 Alignment アライメント

DIGE Coverage が 1 枚の場合、アライメントの必要はありません。

Classic、複数枚のゲル/メンブレンイメージを解析するときはアライメントを実施します。アライメントはリファレンスイメージと実験中の各イメージとの間のスポットマッチングを見つけ、各イメージを Warp してリファレンスイメージと重ね合わせます。

アライメントは、イメージ解析プロセスにおいて非常に重要です。アライメントが不十分な場合、その結果生じるスポット検出および定量化は根拠が薄くなります。

### 6.1 Blot1 と Blot2 をアライメントするには



イメージでのマッチングスポットは以下のように表示されます。

	自動マッチ	ユーザーマッチ
非選択時		
選択時		

**マッチングの削除:** 右マウスボタン

マッチスポットを右クリック、マッチを削除する確認ウインドウで[Yes]をクリック

**マッチングの追加:** 左マウスボタン

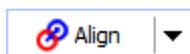
片方の画像でスポットの最も濃い部分を左クリック。両方の画像にシンボルが表示される。

もうひとつのイメージのマッチ位置をダブルクリックするか、マッチシンボルを正しい位置にドラッグ

既存マッチングの位置編集：左マウスボタン

マッチしているスポットをクリック。シンボルを正しい位置にドラッグ。

## 6.2 アライメントの実施



Current images（現在のイメージペア）、All images（ツリービューにあるすべてのイメージ）、Choose images（イメージを選択）、Non-aligned images（アライメントされていないイメージ）でアライメントを実施でき、それぞれ以下の実施方法が選択できます。

**Based on user matches**：ユーザーマッチしたスポットのみを指標に用い、新しくアライメントを実行します。

**Based on all matches**：ユーザーマッチと自動マッチを保ちながら、新しくアライメントを実行します。

## 7 Detection スポット検出

スポット検出ステップの目的は、解析中のすべてのイメージのスポットパターンを表す融合パターンを生成することです。

最初に、すべてのイメージの融合イメージを作成します。次いで、自動的に計算された、または微調整された検出パラメータを使用して、融合イメージ上にスポットを検出します。最後に、スポットパターンをすべての個々のイメージに伝播させ、スポットを定量化します。

The screenshot shows the software interface for spot detection. On the left, the 'Detection parameters' panel is visible, with 'Smooth' and 'Saliency' set to 2, and 'Min area' set to 5. Below it, the 'Detection input' panel shows three checked items: 'Slot1 HCPAnigen Cy5', 'Slot2 HCPAnigen Cy5', and 'Slot2 antiHCPAb Cy5'. The main window displays a grid of images with red and gold spots overlaid. Annotations in blue boxes provide instructions and parameter details:

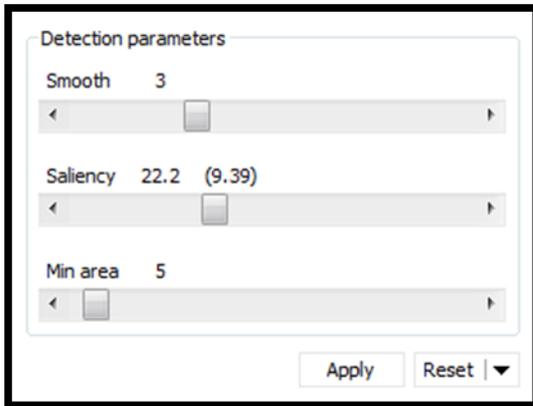
- ② スポット検出を確認する  
デフォルトパラメーターは自動計算
- ③ 検出パラメーターの調節
- ④ [Apply] 検出パラメーターの適用
- ① 融合パターン作成のための  
イメージ選択

検出パラメーター

- Smooth：スポットの分割  
数値が小さいほど細かく分割
- Saliency：スポットの突出度  
数値が大きいほど濃いスポットを検出
- Min area：スポットとして考慮しない面積  
ツブツブごみを除く

赤スポット：現在適用されているパラメーター  
金色スポット：変更前のパラメーター

## 7.1 検出パラメータを設定する



自動的に計算されたパラメータを使用すると、適用されるスポットパターンの即時プレビューが表示されます。検出パラメータは微調整することができます：

**Smooth**：スポットの分割。数値が小さいほど細かく分割。

**Saliency**：スポットの突出度。数値が小さいほど薄いスポットを検出。

**Min area**：スポットとして考慮しない面積。ツブツブごみを除く。

現在選択されているパラメータの値は各スライダの上に表示され、赤いスポットパターンに対応しています。パラメータを変更すると以前に適用されたスポット検出パラメータは、カッコ内に記載され、金色のスポットで表示します。

## 8 Spot edition スポットエディション

Spot edition のステップでは、アライメントと検出結果を検証するためのさまざまなツールが用意されています。これにより、カバレッジ分析の準備が整ったことを確実にすることができます。高度な選択基準に基づいてスポットをフィルタリングし、スポットを編集し、製品スポットを定義することができます。

しきい値を決めて  
スポットを選択

追加  
削除  
分割  
結合  
拡大  
縮小  
移動

① スポット編集

選択したスポットの  
Include/Exclude を決定

製品由来スポット定義  
カバレッジ分析に含まないようにする

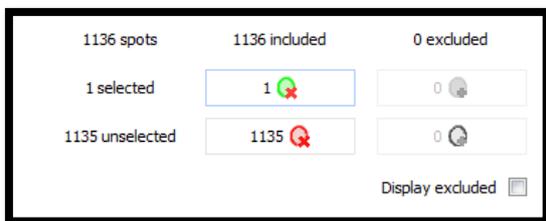
ID	Mean	SD	Cv	▽	Bars	Excluded	Edited	Bot1 HCPAntigen Cy5	Bot1 antiHCPAb Cy3	Bot2 HCPAntigen Cy5	Bot2 antiHCPAb Cy3
361	125	25	2	0.00	■	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	27	23	27	23
362	301	75	6	0.00	■	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	81	81	69	69
363	621	125	10	0.00	■	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	135	135	115	115
					■	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	142	142	121	121
					■	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	230	230	196	196
					■	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	176	176	150	150
					■	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	224	224	191	191

## 8.1 フィルタースポット

フィルタリングは、スポットを選択し、次いで選択されたスポット、または選択されていないスポットを除外します。分析から除外したいスポットは、ゲル領域の外のスポット、小さな薄いバックグラウンドスポット、またはゴミです。

個々のスポットをクリックするか、スポットの周りにボックスを描いてこれらのスポットを選択することができます。選択モードを有効にする必要があります。選択基準を設定することもできます。

## 8.2 Exclude/include spots



スポットを選択したら、Include / Exclude テーブルを使用して、後で分析するためにスポットを含めるか、除外することができます。

除外したスポットは Display excluded にチェックを入れる则表示されます。

## 8.3 製品スポットを定義する

製造途中のサンプルを分析すると、画像に生物学的産物を表すスポットが表示されることがあります。原則として、カバレッジ分析にそのようなスポットを含めることは望ましくありません。これらのスポットを選択し、「Define product spots」で製品スポットとしてマークします。

## 8.4 スポット編集

Melanie は、スポット形状を編集することができます。しかし、再現性のある定量を保証するためには、できるだけ手作業による編集を避けることが推奨されます。画像のスポットと描画が合わないスポットシェイプに気付いたら、そのエリアのアラインメントを最初に確認することをお勧めします。

 **スポットを作成** クリックしてドラッグすると、新しいスポットの輪郭（楕円）を描画できます。

 **スポットを削除** クリックして削除します。クリックしてドラッグすると、すべてのスポットが削除される領域を定義します。

 **スポットを分割** 分割する位置にスポットを通して線を描きます。スポット輪郭の外から外に線を描きます。

 **スポットの結合** いくつかのスポットを通して軌跡を描きます。

 **スポットを拡大** 追加したい領域の輪郭を描きます。

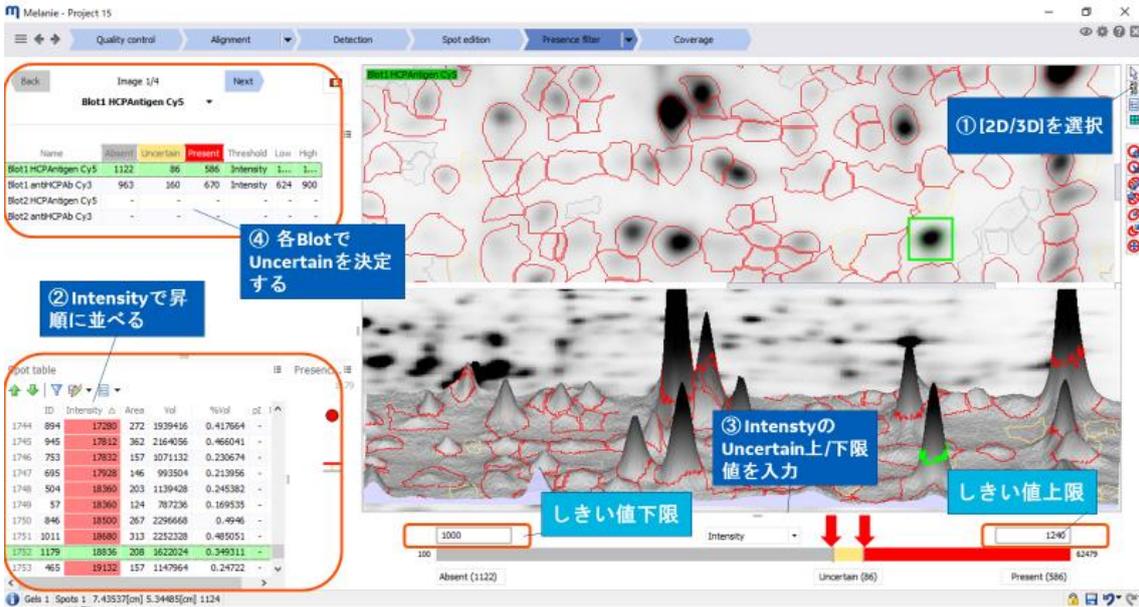
 **スポットの縮小** 縮小したい領域の輪郭を描きます。

 **スポットの移動** この特定の画像だけで移動するスポットをクリックしてドラッグします。

## 9 Presence filter 出現フィルター

HCP 抗体のカバレッジ評価は、画像上のスポットの定性分析です。スポットが特定のイメージに存在するかどうかを知るため、そのスポットの正確な発現量は重要ではありません。不在または存在しているスポットの分類は、スポット存在量しきい値 (Intensity または Volume) に基づいて行います。

Presence filter ステップでは、スポットの存在度のしきい値を設定して、スポットを不在(Absent)、不確実(Uncertain)または存在(Presence)と分類できます。Coverage ステップで不確実なスポットをすばやく確認できます。



### 9.1 2D/3D 表示の操作

	2D view	3D view
イメージの移動	スクロールホイールを押しながらドラッグ スクロールホイールをダブルクリック	Ctrl + スクロールホイールを押しながらドラッグ

	クし選択域の中央を表示	
イメージのズーム	スクロールホイールを回転	スクロールホイールを回転
イメージの回転	-	スクロールホイールを押しながらドラッグ
ピーク高の変化	-	Ctrl + スクロールホイールを回転

## 10 Coverage カバレッジ

Coverage ステップでは、カバレッジ結果を確認、編集ができます。デフォルト画面は、カバレッジ・ペアのカバレッジ(Primary vs. Secondary)を表示します。複数のカバレッジ・ペアがあれば、(Primary vs. Primary)などすべての結果の概要を表示できます。同じ Project で複数のゲルやプロットを分析する場合、カバレッジの単純なレポートを超えて、すべての画像にわたって個々のタンパク質スポットの有無を調べることができます。スポットは、カバレッジステータス（下記参照）に従って色分けされています。

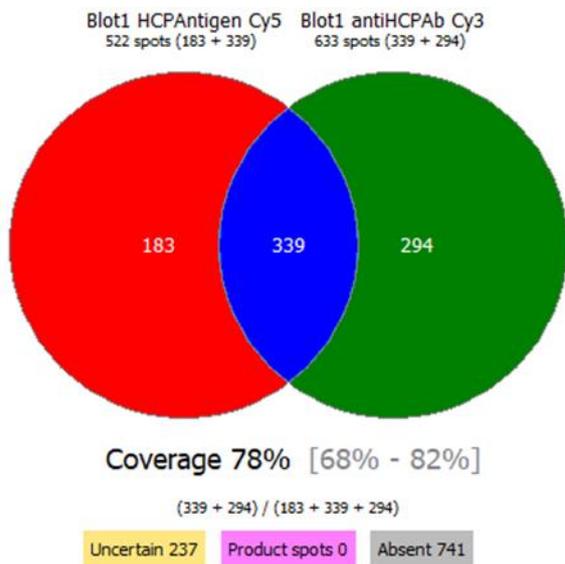
The screenshot displays the 'Coverage' step in the Melanie software. It features a Venn diagram comparing spots between two blot images: Blot1 HCPAntigen Cy5 (409 spots) and Blot1 antiHCPAb Cy3 (394 spots). The Venn diagram shows 36 spots unique to the primary image, 21 spots unique to the secondary image, and 373 shared spots, resulting in a 92% coverage. A 'Coverage table' lists individual spots with columns for ID, Status, P:State, S:State, P:Intensity, S:Intensity, P:Vol, and S:Vol. A legend indicates that 'P' represents Primary HCP antigen images and 'S' represents Secondary anti-HCPAb images. The interface also includes buttons for 'Uncertainを選択' and 'スポットを選択し、評価'.

ID	Status	P:State	S:State	P:Intensity	S:Intensity	P:Vol	S:Vol
112	424			1189	448	117120	2738
113	426			2340	420	285860	5778
114	428			1408	424	159168	5676
115	440			400	380	51516	47572
116	443			8096	392	538172	28824

## 10.1 カバレッジテーブル

Coverage STATUS			Spot filter STATE	
Description	Short notation	Visual notation	Primary image	Secondary image
双方のイメージに不在	Absent		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
双方のイメージに存在	Common		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Primaryのイメージだけに存在	Primary		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Secondaryのイメージだけに存在	Secondary		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
双方のイメージで不確定	Uncertain		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Primaryのイメージで不確定、Secondaryのイメージに存在	Uncertain/Present		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Primaryのイメージに存在、Secondaryのイメージで不確定	Present/Uncertain		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Primaryのイメージに不在、Secondaryのイメージで不確定	Absent/Uncertain		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Primaryのイメージで不確定、Secondaryのイメージに不在	Uncertain/Absent		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## 10.2 カバレッジ 図、レンジ



カバレッジはベン図、スポット数グラフ、ヒストグラムで表示することができます。

カバレッジレンジが Coverage パーセンテージの後に表示されます。Uncertain なスポットのレビュー前に、カバレッジレンジが

- ・小さい、たとえば 5～10%間隔：結果について比較的自信があり、詳細なスポットレビューを検討できます。

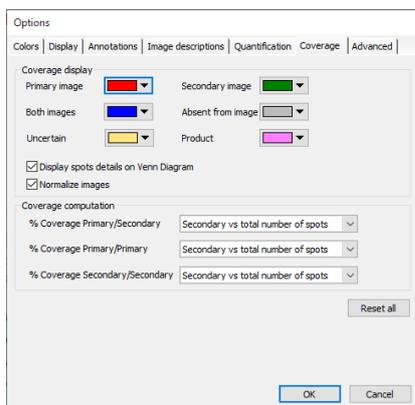
- ・大きい、たとえば 20～30%間隔：最初に大きい間隔の原因を特定することをお勧めします。実験、検出モダリティ、画像取得、アライメント、検出パラメーター、またはプレゼンスフィルターのしきい値。

## 10.3 カバレッジ算出式

Option から 3 つの計算方法を選択できます。3 つの項目をそれぞれ設定します。

### General Option/ Coverage/ Coverage computation

- **Secondary vs total number of spots** : カバレッジ =  $(\text{共通} + \text{Secondary}) / (\text{Primary} + \text{共通})$



+ Secondary)

【推奨・デフォルト】% Coverage primary / secondary

いわゆるカバレッジ評価。複数枚の場合、カバレッジの再現性の確認。

- Intersection vs Primary image spots : カバレッジ = (共通) / (Primary + 共通)

- Intersection vs total number of spots : カバレッジ = (共通) / (Primary + 共通 + Secondary)

% Coverage primary/ primary (同一 HCP サンプル

(Primary)のゲル・メンブレン間 再現性確認) や% Coverage secondary /secondary : (異なる抗 HCP 抗体(Secondary)評価)に用いられます。

## 10.4 複数のカバレッジ結果の要約を表示

ホームボタンを押すと、同じ Project で測定された複数のカバレッジ結果の要約の表示、およびメンブレン間の比較が追加できます。



- カバレッジの再現性の確認
- 同一 HCP サンプル (Primary) の再現性確認
- 異なる抗 HCP 抗体 (Secondary) のカバレッジ評価

Name	Open	Primary image	Primary type	Secondary image	Secondary type	Coverage	Percent	Spot count	Spots	Primary	Secondary	Common	Uncertain	Formula
1. Blot1 HCPAntigen Cy5 vs Blot1 antHCPAb Cy3	<input checked="" type="checkbox"/>	Blot1 HCPAntigen Cy5	Primary	Blot1 antHCPAb Cy3	Secondary	87%	87%	430	36	21	373	131	373 / (36 + 373 + 21)	Primary Sec
2. Blot2 HCPAntigen Cy5 vs Blot2 antHCPAb Cy3	<input checked="" type="checkbox"/>	Blot2 HCPAntigen Cy5	Primary	Blot2 antHCPAb Cy3	Secondary	84%	84%	570	39	50	481	0	481 / (39 + 481 + 50)	Primary Sec



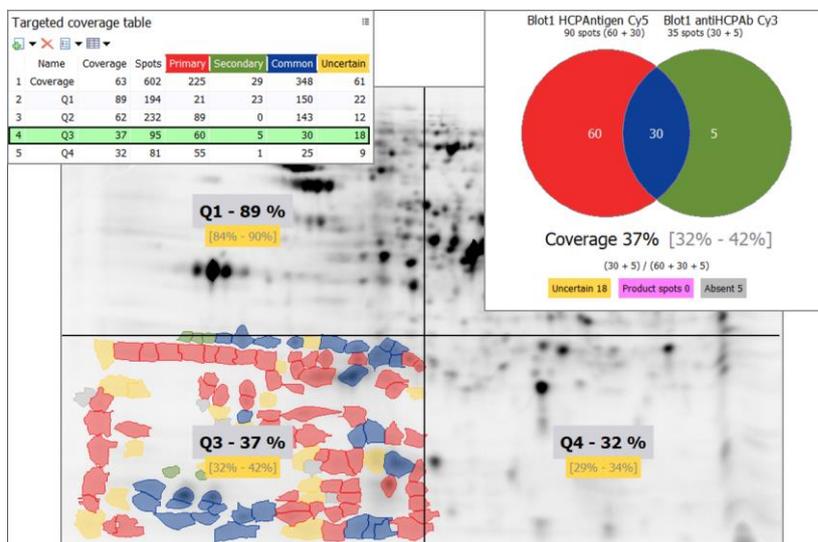
## 10.5 カバレッジクアドラントとターゲットの定義、管理 (新機能)

タンパク質のさまざまな電荷およびサイズのカテゴリに対する抗体のカバレッジを評価するために、pI および

MW のしきい値を指定してカバレッジクアドラントを作成できます。どの pI および MW 範囲で抗体カバレッジが最適以下であるかがすぐにわかり、免疫戦略のさらなる最適化が可能です。

### 注意

この機能を使用するには、pI および/または MW マーカーを定義する必要があります。



象限を作成または編集するには、[ Targeted coverage ] テーブルの [ Create targeted coverage ] アイコンをクリックし、[ Create quadrants ] を選択します。次に、[ Create quadrants ] ウィンドウに pI および MW 値を入力します。pI または MW にしきい値を設定したくない場合は、値-1 または 0 を入力します。

- pI および MW のしきい値を入力すると、Q1、Q2、Q3、Q4 の 4 つの象限が作成されます。
- pI のしきい値のみを入力すると、Low pI および High pI という名前の 2 つの垂直セクションが作成されます。
- MW のしきい値のみを入力すると、Low MW および High MW という名前の 2 つの水平セクションが作成されます。

スポットが選択されている場合、ターゲットカバレッジを作成できます。

- 「Create targeted coverage from spot selection」スポットが選択されている場合
- 「Create targeted coverage from spot set」以前にスポットセットを定義した場合

## 11 pI / MW setting

等電点、分子量マーカーを基に、スポットに pI / MW 情報を付加することができます。10.5 カバレッジクアドラントを実施するときに必要です。

## 11.1 pI / MW setting

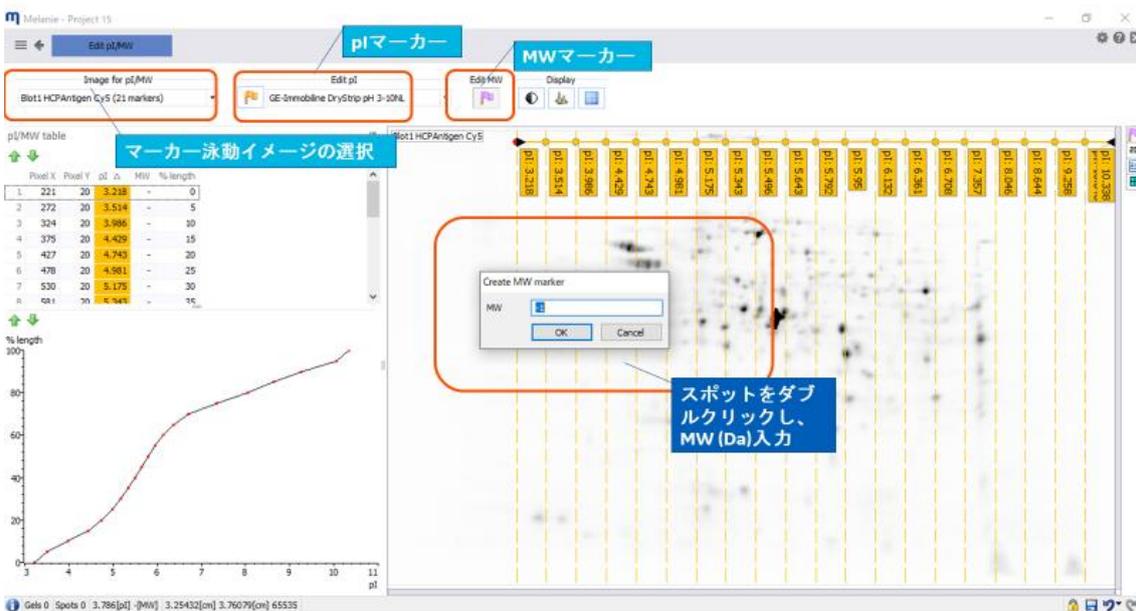
Quality control ステップの Edit ボタンから「Edit pI/MW」を押し、マーカーを定義する画像を選択します。



## 11.2 pI / MW setting

 pI マーカーの設定：「Pi user markers」リストから Pi ユーザーマーカーを選択して、個々のタンパク質スポットまたはゲルの位置に pI マーカーを定義します。次に、pI マーカーを作成する位置をダブルクリックします。[pI マーカーの編集]ボックスで、マーカーの pI 値を指定します。Cytiva の IPG ストリップ（とくに NL）を使用しているならば、リストから選択します。

 MW マーカーの設定：「Edit MW」アイコンをクリックし、MW マーカーを作成する位置をダブルクリックします。[Edit MW marker]ボックスで、マーカーの MW 値（ダルトン単位）を指定します。



## 12. データのエクスポート

### 12.1 PDF 形式のプロジェクトレポート

分析を簡単に共有したり、すべての重要なプロジェクト情報をアーカイブしたりするために、すべての重要な品質管理チェック、ワークフローパラメーター、結果、画像、表、プロットを 1 つのドキュメントにまとめた

PDF 形式の包括的なプロジェクトレポートを自動的に生成できます。

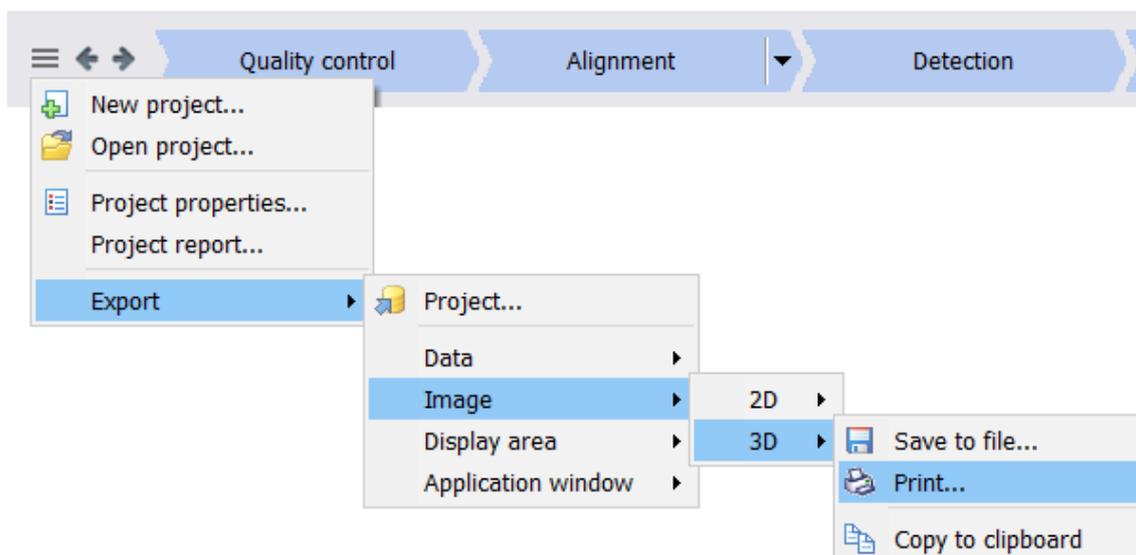
レポートを生成するには、画面の左上にある[Project ]アイコンをクリックし、[Project report]オプションを選択します。

注意

含まれる画像とスポットの数によっては、プロジェクトの作成に時間がかかる場合があります（1～10 分以上）。

## 12.2 エクスポート

Melanie にはさまざまなエクスポート機能が用意されているため、プロジェクトを簡単に共有したり、プロジェクトのデータや画像を保存してさらに分析や公開したり、データや画像を印刷したり、プレゼンテーションや書面で使用するためにクリップボードにコピーしたりできます。



## お問い合わせ先

### Cytiva (サイティバ)

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社

〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング

お問い合わせ：バイオダイレクトライン

Tel：03-5331-9336

e-mail：[tech-jp@cytiva.com](mailto:tech-jp@cytiva.com)

[www.cytivalifesciences.co.jp](http://www.cytivalifesciences.co.jp)