

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、そのカバレッ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(ゲルまたはブロット)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 チュートリアルの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

Projects			The statement lines in	- Net State of the Net State of The	
	Add	Create project Project name CoverageDIBE CoverageDIBE	②プロジェクト名入け	カー プロジェクトの	の終了
Project 8	Coverage D00				
HCP02_M9	Multiple stain	Single stain	DISE with internet standard	Multiple stam without internal standard	-
目 目 ・[Open 日 日 ・[Dupli 日	'イコン プロう cate]ブ	, ジェクトを開く 'ロジェクトのコピー	For differential expension analysis of 20 DIGE experiments (inclusion excession area don inclusion effects on area don inclusion effects of analysis of endoted effects of the second seco	For other entral expression analysis of 20 DB26 or other while experiments (Instant expression is larged, not internal property)	E
Opened : Year 2017 Demont 0	Cincle stain		Coverage	O Coverage DIGE/DIBE	
E DIGE hubsial MR	DICE				
Project 4	Sinde stain	For co	werace analysis of conventional	and a feature of	
Minuo CRB 600	Single stain	(MCB)	2D PAGE/MB experiments 3 Coverage D	DIGE/DIBE	_
E fizal Inoue	Single stain	detect	ed on gel and blot, respectively) 同一メンブレ	レントでのカバレッジ計算	
Mauo JP CBB 300	Single stain				
DIGE tutorial*	DIGE				
Project 2"	Single stain				
Project 3*	Single stain	0		Create Cancel	
НСР02*	Multiple stain	and the second s	and the second s		
Project 6*	Multiple stain	- 17/04/2017 20:23:01	17/04/2017 21:04:10 34.54 Alignment setup 3	6 305012125	44
HCP01*	Single stain	Silver 17/04/2017 18:44:16	17/04/2017 20:46:25 13.17 Alignment setup 3	3 305012125	*

-		-				And a state of the
	Projects					
6	New	Add				
	Name	Type	Staining	Created	Opened V Size (ME) Step Gels Images Creator Comment	
1.00	mad - I ant 7 days					
E	HCP02_M9	Multiple stain		23/08/2017 19:54:53	24(08/2017 16:44:43 35.09 Alignment setup 3 6 305012125	
Op	ened : Last 30 days					
	Project 11	Coverage	1	31/07/2017 14:41:54	2208/201/15/4/115 44.61 Detection 2 2 305012125	
1	1/0/31	single stain	Coorrassie blue	31/07/2017 13:13:47	Zuergauf Schelbz 63.74 Augment 2 2 309012125	
8	0852	single stain	Coomassie blue	31/07/2017 14(36)35	DUV/2017 1436:35 42.04 Kesuts 2 2.309012123	
3 Op	ened : Year 2017				Choose staining for Primary image	
目	C88	Single stain	Coomassie Blue	31/07/2017 14:08:52	31/07/2017	
旧	Project 10	Single stain	Coomassie Slue	31/07/2017 13:40:50	31/07/2017 a Pressry Cys	
8	Project 9	Single stain	Silver	12/07/2017 18:17:20	12/07/2017 1 OK Canoe	
8	DOGE butorial_M9	DUGE	Cy2	11/07/2017 18:28:40	12/07/2017 1	
	Project 4	Single stain	Silver	11/07/2017 16:41:16	1999 Primary image は HCP (antigen)パター	
8	MIZUO_CBB_600	Single stain	Coomassie Blue	19/06/2017 14:43:45	05/07 ·	
	Eizal_Inoue	Single stain	Coornassie Blue	19/06/2017 09:42:25	20/06 ノを迭代	
8	Mauo_JP_C88_300	Single stain	Coornassie Blue	19/06/2017 16:58:02	🚧 今回のチュートリアルでは「Cv5」	
E	DOGE tutorial*	DIGE	Cy2	11/01/2017 19:14:12	19/04/2017/05:42:00 155.6 Results 4 12 305012125	
6	Project 2"	Single stam	Coomassie Blue	01/03/2017 19:49:43	24/05/2017 17:06:29 105.7 Results 12 12 309012125	
目	Project 3*	Single stain	Silver	01/03/2017 21:33:58	24/05/2017 17:06:08 21.66 Results 2 2 305012125	
10	HCP02*	Multiple stain		17/04/2017 21:04:18	26/04/2017 15:11:20 35:06 Review 3 6 305012125	
E	Project 6*	Multiple stain	4	17/04/2017 20:23:01	17/04/2017 21:04:10 34.54 Alignment setup 3 6 305012125	
	HCP01*	Single stain	Silver	17/04/2017 18:44:16	17/04/2017 20:46:25 13:17 Alignment setup 3 3 305012125	
8	Project 7*	Multiple stain		17/04/2017 20:25:26	17/04/2017 20:25:26 34.53 Alignment 3 6 305012125	
B	Project*	Single stain	Coomassie Blue	28/02/2017 16:38:09	01/03/2017 19:39:26 103.3 Results 12 12 309012125	
-			1			

2.2 イメージを選択する



■ ← → Quality control Alignment ▼ C	Detection Spot edition Preservce filter	@‡@⊠
Inage Display	Valdate // X	
Project 'Project 15'		
Coverage DIGE/DIBE - Cy5		
Overall image consistency	Create DIGE gel	
A The project contains no image	Select the images that are part of the same DIGE gel	
Overall image quality	Cy2 Cy3 Cy5	
Quality check for selected images	Blot1 antHOPAb Cy3 Blot1 HCPAntigen Cy5 Blot2 antHCPAb Cy3 Blot2 HCPAntigen Cy5	
No image selected		_
Create DIGE oel	メージを選択し、[Add]をクリック	
DIGE name	at table	
⑦DIBEに名前をつ	Cancel	
ける。	⑧すべてのゲルで繰り返す There are no images to show.	
Carls 0		C U 10 * 01*

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	Ctrl + スクロールホイールを押しながら
	スクロールホイールをダブルクリックし選	ドラッグ
	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

4 解析のステップを以下に要約します

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。
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。
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。
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。
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。
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
以上のブロット解析の場合、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、必要なときに編集し、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。

Melanie - Project 14							- • • × •
E 🔄 🛧 Quality control Alignment 💌 Detection Spot edition	Presence filter	Coverage					@ # @ ¤
Projec DIGEゲルの編集(オプション) 複数(Coverage 切り出し、回転、pl/MWな ど	の画像を選択する ihiftキーを押した	らには、 ふがら	Ctrl+—	ŧ	(bul)		
Overall image consistency							
The project contains 1 DIGE (2 images) The images have consistent characteristics	1			inter.			
Overall image quality *							
Images show background clipping 2 / Images Images appear contract stratebod 2 / Images			**.				
▲ Images spiper contrast second @ 1 mages ▲ Images show saturated areas © 2 images ●	1 antHCPAb Cy3		A COMMENTATION OF THE PARTY OF THE	Blot1 HCPAnt	igen Cy5	- A	1
Quality check for selected Bilot1 Bilot1 Bilot1 Bilot1 Bilot1 Cristot1 antiHCPAb Cy3	を進めるこ		_				
A This image shows back	solution 1	it depth Estin	nated bit depth Gray l	evels % Dynamic	range % Satura	ited area % Backgro	und clipping % Min v
👔 mis intrage shows satur 🕜 The resolution is 236-4 🛕 注意 - 黄色 - 受け入れられる	が、注意						
The image bit depth is The actionsted bit depth	236	16 16	16	16	100	0.03	0.1
10% of the available intensity layals is used #1							
🔮 100% of the available c 🛕 警告 - 赤 - 異常(分析の品質	に悪影響を						
③ Geisz 与える問題)を検出		_					S 🖬 🤊 🕫
		Μ	\$	JP 🔍 A AQ 🍋	• Gcto	ber 7, 20 <mark>,</mark>	19 21732 2017/08/31

5.1 イメージの編集

Muteir-Projet 3
 Image Edition] 編集の確定。Quality Control/こ戻る。Save する
 Image Edition] 編集の確定。Quality Control/こ戻る。Save する
 Image Edition] 編集の確定。Quality Control/こ戻る。Save する
 Image Edition] 編集の確定。Quality Control/こ戻る。Save する

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。

Melanie - Project 15 = + + Quality control ○ ○ 選択されたスポッ 赤:リファレンスイメージ 水色:現在のイメージ ゲル名の横にマッチスポット数と%を表示 Next で次のゲル トマッチングの Back Alignment 1/1 Next 削除:右マウスクリック Bott vs Botz * Blot1 * Antigen Cy3 HCPAb Cy3 追加: 左マウスクリック 片方の画像でスポットの Blot2HCPAntigen Cy3 Blot2 antHCPAb Cy3 最も濃い部分を左クリッ ② [Aline]アライメントの実施 ク RUnalign + @Align くさんのマッチングの編集 もうひとつのイメージの ったら実施 マッチ位置をダブルク リックするか、マッチシ []] Side+Side 4, 30 ンボルを正しい位置にド ① スポットマッチングの編 Grid Warp 下記参照 ラッグ 集 位置編集: 左マウスク Warp On/Off リック 『アは自動的に 各イメ マッチしているスポット ライメントしている。 をクリック。シンボルを正しい位置にドラッグ。 10 ソフトウェアは、マッチン を使用し コントラスト調整 Gels 1 Spots 0 S 8 9. 6.

6.1 Blot1 と Blot2 をアライメントをするには

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	0	()

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ィンドウで[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

🔗 Align 🛛 👻

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。



Detection p	aramete	rs		
Smooth	3			
•				4
Saliency	22.2	(9.39)		
•				۲.
Min area	5			
•				,
			Apply	Reset 🕶

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 <分割。

Saliency:スポットの突出度。<u>数値が小さいほど</u> 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あり、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。

Melanie - Project 15									- ø ×
-	lgament -	Detection	Spot editors Pro	isence filter 💌	Coverage				040
Selection criteria	\$	Not		1000		100 mm	10.60	X=QQ	201
Select spots by clicking on individual spots, drawing or setting selection criteria.	a box around spots,	しきい値	を決めて	Stop:	- Series			-28 to	- Post
Selection criteria (apply)	3 - B ×	ニスホット	で进択	A CINC	BDD as		DIT BIT		
Select spots where the Area - expres	sed as value •	1 -<	100		A A B				X
is equal or smaller <= + than 100	1	Pone	The Party is		CA I			・分割	2 mill
an at least a 1 a of the following in	aner alimane	1-1-Man		1 SHORE	O STATE	1. 2%	Coke	・結合	3
unariessi i i or sic toxining in	agest a magest		and the second second	(Nand /			1 Contraction	• 拡大	3
			STATES	The Dell	AND ANY	2211-2		始山	
Exclude/include spots	8			Contraction of the local distance of the loc	0	and it	200	•稍百小	
Further lock de spate from unur analysis		選択した	スポットの					•移動	3
Enclose produce spins more your analysis.		Include	Evelude to the		677	The latest			-
1794 spots 1794 included	0 excluded	menuuen	Exclude & MA		T A				A Contraction
0 selected 0 Q	= G					110		and the second s	
		PLON!		500 00		1) スポット	・編集 🚺	100
1794 Unselected 1794 🙀	-0	1 LARC	The second				ana an	Contraction of the	
	Display analyded	Carlo Alle	- 1.442d	1. Franklinger	C ALL WAY IS	- And	CAX CON		
		> Blot1 antHCPAb C	Cy3 Blot2 HCPAntgen Cy5 (b)	otz anthOPAb Cy3					
Define product spots		Froup table							
If you analyze in-process samples, you can exclude	the product spots.	▶ ◆ ▼ ジ・田	🗄 🔹 Area 🛛 🗸						
		ID Mean	SD CV V Bers	Excluded Edited Blot1H	CPAntigen Cy5 Blot1 ar	EHCPAb Cy3 Blot2 HC	PAntgen Cy5 Blot2 an	BHCPAb Cy3	
0 selected	0 G	361 125 25	2 0.08		27	27	23	23	
Ditel	w 0 product spots	362 301 75	6 0.00		81	81	69	69	
		363 621 125	10 0.08		135	135	115	115	
	製品由来	スポット定	義	CONTRACTOR OF THE	230	230	196	196	
	カバレッ	ジ分析に含	まないように	する	176	176	150	150	
	11110	307 1004 207.2			224	224	191	191	
Gels 4 Spots 0									3 8 7

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、小さな淡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

1136 spots	1136 included	0 excluded
1 selected	1 🙀	0
1135 unselected	1135 Q	• @
		Display excluded 📃

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 れると表示されます。

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。<u>原</u> <u>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。</u>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。

ピ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で、そのスポットの正確な発現量は重要でありません。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	Ctrl + スクロールホイールを押し
	ドラッグ	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	
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 で複数のゲルやブ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。



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			
双方のイメージに存在	Common		1	1
Primaryのイメージだけに存在	Primary		4	
Secondaryのイメージだけに存在	Secondary			1
双方のイメージで不確定	Uncertain			
Primaryのイメージで不確定、Secondaryのイメージに存在	Uncertain/Present			1
Primaryのイメージに存在、Secondaryのイメージで不確定	Present/Uncertain		\checkmark	
Primaryのイメージに不在、Secondaryのイメージで不確定	Absent/Uncertain			
Primaryのイメージで不確定、Secondaryのイメージに不在	Uncertain/Absent			

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= (共通 + Secondary) / (Primary + 共通

olors Display Annotations Image Coverage display	descriptions Quantification Coverage Advanced
Primary image	Secondary image
Both images 📃 🔻	Absent from image
Uncertain 📃 🔻	Product 🗾 🔻
Display spots details on Venn Dia Normalize images	gram
Coverage computation	
% Coverage Primary/Secondary	Secondary vs total number of spots 🛛 🗸
% Coverage Primary/Primary	Secondary vs total number of spots \sim
% Coverage Secondary/Secondary	Secondary vs total number of spots
	Reset all
	OK Cancel

+ 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)

(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

- m	elanie - Project 13					1.00	The second second						The local division in which the local division in the local divisi
=	🗲 複数のカバレッジ結	果の要約を表え	Spot editor	Presence	filter 💌	Cover	age 🚽					-	# 6 E
Ħ	Blot1 HCPAntigen Cy5 vs Blot1 antHCPAb	Cy3 09 Blot2 HCPAntigen	1 Cy5 vs Biot2 antiHCPAb Cy3									Option	n
_	Coverage pairs	Targeted coverage										-	
	S New 🗶 Delete 🔯	Coverage +										Tableの言	安定
Cove	rage summary table												
	Name	Open Primary image	Primary type Secondary image	Secondary type	Coverage	Percent	Spot count	Spots	Primary Seco	ndery Common	Uncertain	Formula	Coverage
1.4	Blot1HCPAntigen Cy5 vs Blot1antHCPAb Cy3	Biot1 HCPAntigen Cyt	5 Primary Blot1 antHCPAb Cy3	Secondary	87%	87%		430	36	21 373	131	373 / (36 + 373 + 21)	Primary Seco
2 (1	Blot2 HCPAntigen Cy5 vs Blot2 antHCPAb Cy3	Biot2 HCPAntigen Cy	5 Primary Blot2 antHCPAb Cy3	Secondary	84%	84%		570	39	50 481	0	481/(39+481+50)	Primary Seci



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、 pl 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 pl 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、pl 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 pl および MW 値を入力します。 pl 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。

- pl 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。
- pl のしきい値のみを入力すると、Low pl および High pl 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 pl / MW setting

等電点、分子量マーカーを基に、スポットに pl / 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 pl / MW setting

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

Melanie - Project 13	Towned and the local set of the	
E 🔄 🔶 Quality control Alignment 💌	Detection Spot edition Presence filter 💌 Coverage	
Image Display	Validate Validate	
Edit images Edit pI/MW (Blot1 HCPAntigen Cy5 with 5 markers)	® Biot1	

11.2 pl / MW setting

▶ pl 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 pl マーカーを定義します。次に、pl マーカーを作成する位置をダブルクリックしま す。[pl マーカーの編集]ボックスで、マーカーの pl 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。

	e ə	Quality cont	rol		Alignmen	nt		-			Detection	
₽ 2	New pr Open p	roject project										
	Project Project	t properties t report					_					
	Export •		1	Project								
				Data		×						
				Image		×		2D	÷,			
				Display area	1	F		3D	⊁	_	Save to file	
				Application	window	١				8	Print	
										e _b	Copy to clipboard	

お問合せ先

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:<u>tech-jp@cytiva.com</u> www.cytivalifesciences.co.jp