

Melanie 9

簡易操作手順

DIGE with internal standard 2^{n}

Single Stain

26 ページ



Melanie 9 操作ガイド_DIGE with internal standard

DIGE with internal standard

この章では、Melanie DIGE with internal standard を用いて処理サンプルとコン トロールを比較して統計 学的に有意な発現差異を示すタンパク質を検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、多くの複製サンプルを使い、内部標準を組み込んで、DIGEの実験的設計の解析 を解説しています。このチュートリアルでは、バクテリア培養のコントロールおよび処理グループ間で、統計学 的に顕著な差異を示すタンパク質を見つける方法を説明しています。

このチュートリアルでは、C:¥Program Files¥GE Healthcare¥Melanie 8¥Tutorialsにある12枚のゲルファイルを使用します。

DIGE with internal standard とは

いくつかのサンプルが同じゲル上で泳動された解析、その 1 つは内部標準の場合、このオプションを使用します。

Note: ソフトウェアで、DIGE 機能がない、もしくは灰色で表示されている場合、DIGEモジュールのライセンスが有効ではないので、この後のチュートリアルを行うことはできません。Melanie DIGE ライセンス をお買い 求めください。

ゲル番号	Cy2	СуЗ	Cy5
ゲル1	内部標準	コントロール 1	処理済1
ゲル 2	内部標準	処理済2	コントロール 2
ゲル 3	内部標準	コントロール 3	処理済3
ゲル 4	内部標準	処理済4	コントロール 4

下の表で示すように、バクテリア溶解液の4つの複製ゲルがあります。

各ゲルに内部標準サンプルがあり、コントロールおよび処理済サンプルをノーマライズできます。内部標準 サンプルはコントロール、処理済溶解液を等量混合して作成したものです。

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 > Melanie 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。

プロジェクトは、「プロジェクト」ウィンドウで管理されます。

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



Note:イメージ (Image) とゲル (Gel) の違いに注意してください。ゲルは、1 つまたは複数のイメージが 含まれます。 DIGE および他のマルチ染色実験の場合、2 つ以上のイメージが同じゲルに属します。

Melanie - Project 5		the second se	-	- c/ ×
	Alignment setup Alignment 💌	Detection Review	Results Poling	000
Inage Display Image Display Images Images/Table Images/Table	M Add images	• Melanie 8 • Tutorials • ≠	Tutonals辺狭常 P 川 ・ ・ ・ ・	⑤ Create DIGE gelダ
ABOUT PROJECT 'Project 5'	CrashPlan	A 名前 Gel 01 Cy5 Treated.gel Gel 02 Cy2 Standard.gel	2016/07/19 12:20 GEL 5 2016/07/19 12:20 GEL 5	イアロクホックスが 開く。 同じDIGEゲルに含ま
Overall image consistency A The project contains no image The images have consistent characteristics Overall image quality The overall image quality is good	Melanie 8 Help Html Tcons Tconplate Toole (x32)	Gel 02 (v)3 Treated.gel Gel 03 (v)3 Control.gel Gel 03 Cy3 Control.gel Gel 03 Cy3 Control.gel Gel 03 Cy3 Control.gel Gel 04 Cy3 Treated.gel Gel 04 Cy3 Standard.gel Gel 04 Cy3 Standard.gel	2016/07/19 12:00 GEL 2 2016/07/19 12:20 GEL 2	れるCy2、Cy3、Cy5 イメージを選択し、 [Add]をクリック
Quality check for selected images No image selected	🧎 Tutorials 📕 Intel ファイル名(1	Pick.gel Pick.gel T (): "Gel 04 Cy5 Control.gel" "Gel 01 Cy. ▼	2016/07/19 12:20 GEL > • All Files (*.*)	
			M<(0) キャンセル	

このチュートリアルでは、C:¥Program Files¥GE Healthcare¥Melanie 8¥Tutorialsにある12枚のゲル ファイル(Gel 01 Cy2 Standard.gelからGel 04 Cy5 Control.gel)を使用



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

Quality control	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。
Experimental design	解析の設計の定義
	Experimental デザインウィザードを使用して、共通のデザイン、ファクター名、
	ファクターレベルのいずれかを作成し、イメージを割り当てます。
Alignment setup	アライメント(スポットの位置あわせ)方法の指定
	アライメントの効率を高め、マッチの編集作業を最小限に抑えるには、最初
	に類似した画像のグループ内で画像を補正することができます。
Alignment	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。
Detection	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。
Review	スポットの確認と標準化(ノーマライズ)
	スポットパターンを確認し、スポットを編集したり、アラインメントを修正したり
	することもできます。
Results	
	Melanie は解析デザインに合わせた専用のツールと統計テストを自動的に
	提案します。スポットをフィルタリングし、スポットセットを使用してタグ付けし、
	さまざまなプロットとオプションを使用してスポットを検証します。
Picking	切り出し(ピッキング)するスポットの選択とエクスポート
	ピッキングのスポットを選択しピッキングリストを作成します。

5 Quality control

Quality Control ステップでは、これらの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。

Note: イメージ (Image) とゲル (Gel) の違いに注意してください。ゲルは、1 つまたは複数のイメージが 含まれます。 DIGE および他のマルチ染色実験の場合、2 つ以上のイメージが同じゲルに属します。

Melanie - Project 5		International Advances	And Address of	-		THE OWNER OF	allow the	- 0	×
+ + Quality control Depermental design Alignment se	tup Alignment	- Detection	Review	Results	Picking			Ø	# 0 🖸
Display Edit mages Images/Table • P P	Valdate								
<mark>ABOU</mark> ① [Edit Image] DIGEゲルの編集(オ ^{'Pr} 切り出し、回転なる	プション) ど	複数の画像 たはShiftキー	を選択する ーを押しな	^も Genes には、Ctrl- がら	キーま				*
Overall image consistency				10.2		1000	1.1		
 The project contains 4 DIGE (12 images) The images have consistent characteristics 	1 A.S.								
Overall image quality	201				1.10				
The overall image quality is good	() Gel	01 Cy2 Standard	() Gel 01	Cy3 Control	6	Gel 01 Cy5 Treated			
Quality check for selected images				C Gel 02					
6 Gel 01 Cy2 Standard ① The resolution 19 254 dpi ⑦ The image bit depth is 1x ⑦ The image bit depth is 1x	すべての外 を持って分析	観が正しいと テを進めること	すれ ? : が		7				
24% of the available intensity levels is used a		the Rows Cos Her	olution Bit depth Es	amated bit depth Gray	ievels % Dynam	icronge 16 Satura	ted area % Backgrou	ind clipping %	Min valu 🐣
① This Image shows no sat ① This Image shows no sat ① This Image shows no bac	分析の質を	低下させる可能	忠。 能性 ¹⁶	16 16	24 21	42 38	0	0	53.44 23.63
D Gel 01 Cy3 Control のある問題	題を発見		16	16	31	58	0	0	29.90
① The resolution is 254 dpi ① The The Timage bit depth is 11	異常が確認 質に悪影響を	され、Melanie テ与える問題を	は	16	26	49	(n)	0	82.74
			-	-			5478 AL	<u>6</u>	3.6.
				-	JE 🥠	A RAY 👻 🐖 😰	rens + - 😫 di	2017/	02/06

5.1 イメージの編集

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



次のステップ Experimental Design をクリックし、変更を保存(Save modifications)して移動します。

6 Experimental Design - 解析デザイン

Experimental Design ステップでは、実験的デザインに関する情報を指定または編集できます。実験のメ インファクター、サブジェクト、ブロック、その他の変数など。この情報は、ワークフロー全体でアライメント設定、 画像表示レイアウト、適切な統計テスト、データ解析ツールを提案するために使用されます。



6.1 実験デザインを選択する

6.2 要因(Factor)と Factor レベルの名前をつける

ウィザードの2番目の画面でFactorとFactorレベルの名前を変更します。

Izard Select	■ Experimental-dest Peter E.col ● [Factor]主要因 名を入力
2 Cy5 Treated 2 Cy5 Control 3 Cy3 Control 9 Cy5 Treated 4 Cy5 Control 4 Cy5 Control	Fatter fewel name Strong in the Color Carbod * Carbod * Carbod * Aprex ② [Factor level name]のデフォルト (A1、A2) をダブルクリック Aprex Aprex
メージファイル のファイル名の きない場合は、	名にFactorレベルを識別する文字列があると[String in file]欄に表示される。 イメージが自動的にFactorレベルに割り当てられる。 次のステップで画像をFactorレベルに割り当てることができる。
	Your design is not valid - Some treatment combinations have no samples, Statistical analysis canvot be carried out on this experimental design. E-cost Control Con
	Orate Carol

次のステップ[Aliment setup]をクリックし、変更を保存(Save modifications)して移動します。

Wizard でファクター、レベル振り分けができなかった場合

Melanie - Project 5 000× 🔄 🔶 Quality control Depenmental design Alignment setup Alignment 💌 Detection Wizardでファクター、レベル振り分けができなかった場合 The milar) Gel 02 Cy3 Treated Gel 03 Cy5 Treated m E.coli Control Gel 03 Cy5 Treated Gel 04 Cy3 Treated Gel 01 Cy3 Control Gel 02 Cy5 Control Gel 03 Cy3 Control Gel 04 Cy5 Control Gel 01 Cy5 Treated el 01 Cy3 C el 02 Cy5 C el 03 04 CV5 0 3 gels not used Gel 02 Cy3 Treated ① 振り分けるイメージ を[New level] エリアに Gel 03 Cy5 Treated Gel 04 Cy3 Treated ② [level] 名を入力 例:「Treated」 Gel 02 Cy3 Trea... Gel 03 Cy5 Trea... Gel 04 Cy3 Trea... Treated Gel 01 Cy3 Control Gel 04 Cy5 Control Gel 03 Cy3 Control Gel 01 Cy5 Trea... \$ 1/2>

7 Alignment setup アライメントセットアップ

アライメントは実験中のイメージのスポット位置をリファレンスイメージに合わせます。 アライメントは、画像解 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。

アライメントセットアップはリファレンスイメージを設定します。内部標準を含む DIGE 実験では、すべてのイメ ージは、各ゲルの Standard (内部標準) イメージを使って合わせます。各ゲルの内部標準イメージは、リ ファレンスイメージ (リスト内の一番上のゲルの内部標準イメージ) に対してあわせます。

7.1 リファレンスイメージを指定する

リスト内で一番上に表示されるイメージが、アライメントプロセスのリファレンスイメージとして使用されます。リ ファレンスイメージを変更するには、リストの一番上にそのゲルをドラッグします。



次のステップ Aliment をクリックし、変更を保存(Save modifications)して移動します。

8 Alignment アライメント

アライメントは、実験中の各イメージとそのリファレンス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て行います。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。

8.1 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。

8.2 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:ユーザーマッチングのみを用い、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。 次のステップ Detection をクリックし、変更を保存(Save modifications)して移動します。

9 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を表す固有のスポット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。



9.1 検出パラメータを設定する

Detection parameters	
Smooth 3	
•	4
Saliency 22.2 (9.39))
٠	Þ
Min area 5	
•	۴.
	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 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。

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、赤いスポットの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 で表示しています。

10 Review レビュー

Review ステップでは、アライン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。このようにして、データセットが統計分析のために準備されていることを確認できます。スポットフィルタの高度な選択基準に基づいて、スポット編集およびノーマライズの設定を確認します。



10.1 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。一貫性の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。



Spot edition ボタンをクリックし、スポット編集モードに入ります。以下の操作ができます。

🚱 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。

10.2 スポットノーマライゼーション Spot normalization

内部標準を用いた DIGE 実験(DIGE experiments with an internal standard)では、レシオメトリックノ ーマライゼーションが適用され、かつ自動的に実行されます。

Melanie - Project	1.5				100						-				
Spot norms	① Revie	wに見	₹3												\$ 0 I
Verify your normalization appear in red.	on. Spots used to calcu	late the nor	makzation	factor	Norma	lization マ I 配	plot	44				- Calloreye		F	\downarrow
Back 'Gel 02 C	Normalization Cy3 Treated" vs. 'Gel 02	2 Cy2 Stand	lard	Next	Vol ratio			-					\bigcirc	6	
Use Ratiometric norm	alization •								-			$\langle \rangle$	~		\sim
					16-							~	(h	A	6 1
Normalization factor	tabla	-			- 1				1					U N	
Image	Reference	rta ±	α im 3	t t	HU V		e 🔹	FA -73	14 15			···· 🔨	21	m	> _
and a		P P N	191示=	⊨ œ i	HIC!	2 DIC	元天	明代し	14.	34.3 .					(h
Gel 02		シオ	トメ	+ U	ックィ	/ '	マラ	イセ	ーショ	ALL		-1/	~	111	4
Gel 02 Cy3 Treated	Gel 02 Cy2 Standard		(Rat	iome	etric N	lorm	aliz	ation)が適用	S.12					NI.
Gel 02 Cy5 Control	Gel 02 Cy2 Standard		tittat					L	13 202711					~	$\sim \sim$
Gel 01		21	ι, 1	20	目期日		美仃	वग	ます。	•		\sim	\frown	10	
Gel 01 Cy3 Control	Gel 01 Cy2 Standard	1,41	903	1.27	1									45	()
Gel 01 CyS Treated	Gel 01 Cy2 Standard	0.511	563	1.36	1							Gel 02 Cy3	Treated)
CHINA .					0.062	024 4	096	16384	65536 2.6#5	1#6 4.2#6	1.7e7 6	707		T	\sim
Gel 03 Cy3 Control	Sel 03 Cv2 Standard	1.43	563	1.23	-						Near	1 Vol	\sim	1	
Gel 03 Cy5 Treated	Gel 03 Cy2 Standard	0.563	563	1.33	Normia	lination	table					-71	0		
					rearing -	incocroni	100						~		m
Gel 04					H	3.4	1					-		1	
Gel 04 Cy3 Treated	Gel 04 Cy2 Standard	0.66	563	1.33		ID Vo	fratio	Mean Vol	Gel 02 Cy3 Treated	Gel 02 Cy2 Standard	Fitting error	H- /	1 n		- Su
Get 04 Cys Control	Gel 04 Cyz Standard	2.13	30.3	7.54	2.36	235 2	.42209	262149	407984	168443	1.55277		21	1 5	
Standard					237	230 1	.20947 KK084	031877	300070	440,384	1.22874			\sim	In C
Gel 02 Cy2 Standard	Gel 03 Cy2 Standard	0.937	563	1.12	239	238	1.7984	1133812	1520519	845403	1.15294	1	\leq	1	
Gel 01 Cy2 Standard	Gel 03 Cy2 Standard	1.05	563	1.13	240	239 2	01276	127927	181492	90170.7	1.29036				
Gel 04 Cy2 Standard	Gel 03 Cy2 Standard	1.07	563	1.13	241	240 2	17878	227689	336084	154253	1.3968			C	~ ()
					242	241 1	.64669	197387	253293	153820	1.05567		100	m	ALK
					243	242 1	.89136	167497	230353	121792	1.21253	. ~	5	15	
*					1							1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1	informa for	× / ,
Gels 2 Spots 1									Mozilla Firefor						3 9-0
370	0	C	-	1	02	X					m	%	8 A 82 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10	SS 7 . = 8	10:06 2017/02/17

次のステップ Result をクリックし、移動します。

11 Results 結果

Result のステップでは、専用のツールと統計テストを使用して結果を調べることができます。デフォルト画面は、最良のあなたの実験計画に適合されている統計解析の結果が表示されます。

このチュートリアルでは Control 、Treated サンプル間で顕著なタンパク質発現の差異があるスポット 「ANOVA 検定値が 0.05 未満であり、かつボリューム比の平均が 2 以上または 0.5 以下」を見つけます。

11.1 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



11.2 ANOVA 検定値が 0.05 以下のスポットを見つける

11.3 ANOVA 検定値が 0.05 以下のスポットセットを作る



Melanie	roject 5	x
* *	Quality control - Experimental design - Alignment etup - Alignment - Detection - Review - Resulta - Poling	00
A 8	One-factor analysis with "Leol" ×	
Gel 02 Cy5 Gel 02 Cy5 Gel 03 Cy3 Gel 03 Cy3 Gel 04 Cy5	 ④ [Filter by values]をク リックし、ウィンドウ を開く。 ですのでの ですの です ですの ですの ですの ですの です です ですの です です です	
Expression VolRato		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
2	Papezsion ratio table - with 'Control' as reference	v X
0.79	Expression ratio table table ・ Correct Dimension ratio tableが開き、Controlの平均ボ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・	•
م.ما	Anova table Expression ratio table - with 'Control' as reference	0+0(+
0	🖉 📴 💽 🥥 💽 🛐 💽 😰 🍪 🖉 😵 🕅 👘 🕫 🗤 🖉 🖉	5 //17

11.4 処理サンプル「Treated」の発現量が「Control」2 倍以上のスポットを見つける

11.5 Treated の値が 2 以上のスポットセットを作る





11.6 Anova Table に「Treated>=2」のスポットセットを表示する

11.7 「Anova<=0.05」かつ「Treated>=2」のスポットセットをつくる

Melanie - Project 5											X
🗧 🔶 Quality control	Experimental design	Alignment set	up Alignment	Detection) R	evien	Results	Pickr	19	Ø	¢00
1: One-factor an	alysis with 'E.coli' ×										
Experimental design view	18 *	1		Control			and the second		international lines	led	4
E.col	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	Gel 01 Cy3 Cont		Gel 04 Cy5 Con	10		Gel 01 Cy57res	and .		Gel 04 Cy3 Treated	45
Control	Trouted	1		F			A				
Gel 02 CyS Control Gel 01 CyS Control Gel 03 Cy3 Control Gel 04 Cy5 Control Gel 04 Cy5 Control Gel 04 Cy5 Control	el 02 Cy3 Trivated el 01 Cy5 Trivated el 03 Cy5 Trivated el 04 Cy3 Trivated	$\langle \rangle$	1	\$7	\checkmark	Y	R	A	h	2AA	_
♥ ▼ ① ク	[Annotate]の リックし、「	隣の▼ オンド	をクリックし ウを開く	Spot Set	t > Comb	ineを	0		H	- nu	-
Combine spot sets		A che	②[Inputs][C	「Anova<	=0.05]	٤	Create spot or	e	(4)	Create spot set	
Inputs	Operator Out	st	Treated>=	2」を選択	2					インドウのnow	
	+And +	v soot set	Operator	⊂ 「And」	を選択						
Treated>=2 * -			③ [Output] [:	FNew s	pot set J	を選			na	mei - Interesting	-
	OK	Cancel	択し、[OK]を	ミクリック	2			OK S	Sp [OI	ots」と人力し、 K]をクリック	-
		Anova table				2				@ n	- *
0.79			▼Ⅳ・目目・					C		S Result - JNI	-
• • •	1	10	Max Sars Fok	Actova (p)	Control Innin	d Analysis-1	Ampvil<=0.05	Treated>=2 Inte	mesting Spots	Interesting	-
0.63		10 570	1.5684 2.40	32 2. 16332e-7	0.65097 1.5	84 🖸	2	, P	2	Spots」チェック	
		11 543 1	.63872 2.08	133 2.20024e-7	0.787723 1.63	172	R	P	P	ボックスカラムが	
		12 1059	1.9027 2.75	187 2.303e-7	0.69167 1.9	27	8	2	R	でキス	
0.4		Anova tab	e Expression ratio table - with	"Control" as referenc	e conte de serie	a. 14				600	
Gels 8 Spots 55											3.6.
🔞 🤉 🖉 🔚	0	-1 0				Se.	m	JE 4	U A AQ SO O	🔊 😢 🛄 🖞 - 📑 🗐 🕼 2017/(02/17

11.8 抽出されたスポットの評価

このチュートリアルでは 4 枚のゲルを使用していますので、1 マッチングスポットあたり、コントロール(青)と 処理サンプル(黄緑)で各 4 スポットずつ存在することになります。縦軸は発現量比(volume Ratio) で表示されており、内部標準ボリュームはすべて 1 です(表示なし)。サンプルスポットを横切る帯と白線 はばらつきと、平均値を示しています。



各スポットを検証したら、Analysis1 チェックボックスカラムにチェックを入れます。

- 🗹 関心のあるスポットとして確認
- 🛛 関心ないスポットと確認
- 図-まだレビュー、検証していないスポット

Ettan Spot Picker(スポット回収ロボット)を使用するならば、次のステップ Picking をクリックし、移動します。

12 Picking ピッキング

[ピッキング]ステップでは、スポットをスポットピックロボットが読み取れるピックファイルにエクスポートできます。 Note: Ettan Spot Picker ではリファレンスマーカーを含むピッキングゲルを使用します。

Quality control Experimental	design	Alignment set	up)	Algoment	•	Detection Review	Results	Picking	@ # 0
house images 1 [Choos	se fror	m disk]	Pick.g	elを逞	【訳す	3	Image to pick: Pick		1
ze to pick	1	0	ne altero	ACCESS 1		B111 22		and the state	T PAR -
Abroant Di Die	31	Alinel	51	*2	ኮመ፤	2 施			
ment mape			-	-	-	and the state of t		· 0. · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	P 1
Cy2 Standard (2) [A	iment	コスポ・	ットマ	ッチ	ング	No Contraction		040.0 80 0	0
左右。	の画像	を共通	する	スポ	ット	設定 300		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	9.0
ine spots to pick		000	-	69.92	6	Se going Se	1.1400	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · ·
. × Rd (4) [Use	valida	ted spo	ts] An	alvsis	112	See 32	0	· · ·	•
ourrently 39 spots f チェッ	クを入	nt-z	、ポッ	トを	呼びと	ान ि 😤 🐂	IRI	D	® EL' (
	0					190 0	⑦左0	0 8	しつもガゴ
(CE Maniferrane Ethan (Taut)	5			Etta	an (Te	xt)] ^o	Reffer	ence	石のもタノ
Export 2.txt	を	選択す	5			0 Q	Marke	rをダブル	ルクリック
Ettan marker	(A) IF.		4	+ -	i A		クリッ	ク [IR1]	[IR2]
Generate fie	(6) [Et	ttan Ma	rker]	201	190		Ettan markers	8 10 m	
		今日間・	目		<u> </u>	A Mapping and its Analysised			
(P) (P)	ener	ate filel	をク	U w A	, "	To ensure than the linear inplies are unable, the inappoint be unapped the uprival theoring of an any time to active the segment materials again.	Ettan marker Pia	elX Porel Y Cm X Cm T	
(In the second s	Jenen	are mej	~ /				4.050	100 100 100	
	3	1091 83	379	3001					
	5	1056 115	1019	911		ワーフをはすすメッ	/		
	6	1024 146	163	858		セージが出たらIOKI			
	2	1010 159	378	848	1.1.1	+ +=-+-			
	8	916 250	1207	708		を押り			
	9	854 312	1158	625					
	10	017 747	1000	can.			•		0.10-

13 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。

13.1 pl / MW setting

Quality control ステップの Edit ボタンから「Edit pl/MW...」を押す。



13.2 pl / MW setting



13.3 pl / MW 表示



14 画面のエクスポート

14.1 イメージウインドウのエクスポート

Options(歯車)をクリックしま O 🛱 す。 General options... Export > Sheet to clipboard Workflow options... 表示しているすべてのイメージ 📋 Sheet to clipboard Export ۶ Export > Image to clipboard ¢ Image to dipboard 選択(左上の名タグが緑)イメー 2D E Export data ジ

14.2 表(Table)のエクスポート

Save アイコンをクリックします)。 Save > テキストファイルで保存。 Selected row もしくは all rows

Ano	va table	9			
	- -	₽ ▼	🎷 -		•
-	Save			Bars	Fol
 8	Print				2.55
₽ħ.	Conv to	diphoard			2.05
43	Copy to	cipuoaru			2.22
	4 179	1.76543			2.15

14.3 Experiment Design view のエクスポート

Settings をクリックしま	Experimental design view	H -			
す。	E.C	coli	•	Save	
Save > html ファイルで	Control	Treated		Print	Į
幽隊保仔。	Gel 01 Cy3 Control	Gel 01 Cy5 Treated	4	Copy to clipboard	

14.4 Expression Profile のエクスポート

Settings をクリックします。

Save > png、bmp、tiff ファイルで画像保存。

Expression profile		≣			
Vol Ratio			Export I		Save
2.57			Display I	8	Print
2	•	_	2	1	Copy to clipboard
		~		-	

Melanie 9 操作ガイド_Single Stain

Single Stain

この章では、Melanie Single stain を用いて処理サンプルとコントロールを比較して統計学的に有意な発現差異を示すタンパク質を検出する方法について説明します。

Single stain は各ゲルにはサンプルがひとつずつ泳動され、サイプロルビー染色で染色されています。 ここで使用する 2D ゲルには下表で示すように4 群に分けられます。細胞を 2 つの異なる環境下(培地 A および培地 B)で培養し、2 種類の処理(処理 1 および処理 2)を行いました。

クラス	環境	処理
A_T1	培地 A	処理1
A_T2	培地 A	処理2
B_T1	培地 B	処理1
B_T2	培地 B	処理2

このチュートリアルでは、C:¥Program Files¥GE Healthcare¥Melanie 8¥Tutorialsにある12枚のゲル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 > Melanie 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。プロジェクトは、 「Project」ウィンドウで管理されます。

2.1 新しいプロジェクトを作成する

Add Add	ハプロジェクトの作成 Project name Project Life (2) 例	t)プロジェクト名入 J:「Single stain tu	、力 torial」		プロジェクトの終了
freed 14 Coverage DIG LaticE tutorial #9 DIGE peried : Last 7 days Project 13 Coverage DIG [More]アイコン ・[Open] プロ	 Single stain For differential expression analysis of 30 PAGE experiments (one sample per get) 	For differ intel expression and 20 DICE expertence (multiple sandle on same (multiple sandles on same motioning internal stander	and Rysis of Spel, Sp	Multiple stain without internel standard For differential expression analysis of 20 DIC or other multiplex experiments (multiple samples on same gelt, (multiple samples on same gelt, no internal standard)	
ジェクトを開く ・[Duplicate]プロ ジェクトのコ ピー Mizo_CEE_500 Singlestam Exa_proce Singlestam	び Single stain 従来の2D PAGE実 変動解析各ゲルで プルのみを泳動。 Fre component etected on etected on	後の発現 1つのサン antiges of conventions 70% experiments a sector modely of well blet, respectively)	Coverage Disc./Disc. Disc./Disc. Disc. experiments Disc. experiments (HCP antopen and antH-HCP and detected on same biot or g	الله من عن نائی ادار	
Mizue_JP_CBB_300 Single stain DIGE tutonal* DIGE Project 2* Single stain Project 3* Single stain HCP02* Multiple stain Project 6* Multiple stain	 17/04/2017 21:54:18 26/04 17/04/2017 20:23:01 17/04 	2017 15:13:20 35:06 Review 2017 21:04:10 34:54 Algoment setup	5 6 305012125 3 6 305012125	Create	www.

2.2 イメージを選択する

a] je] RAI ♥ Images/Table ♥	Add images	Program Files • GC Meditrone • Melanie	9 • Tutorials	• 4+ Tutorish	ome (5) Add im	nagesダイア
	整理 ・ 新しいフォルダー	5.41 A.T1_Gel1.15 A.T1_Gel2.17 A.T1_Gel2.17 A.T2_Gel2.17 A.T2_Gel2.17 A.T2_Gel2.17 B.T1_Gel2.17 B.T1_Gel2.17 B.T1_Gel2.17 B.T1_Gel2.17 B.T1_Gel2.17 B.T1_Gel2.17 B.T1_Gel2.17 B.T1_Gel2.17 B.T1_Gel2.17 B.T1_Gel2.17	更新日時 2017/08/10 16:26 2017/08/10 16:26	【13] 「サイメージ ズIFF イメージ TIFF イメージ	500 サイ 染色 ゲル 1 選 リック 3 3 3 3 3 5 3 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	ッスが開く。 イメージを [Add]をク
このチュー のゲルファ・	ファイル名(N): トリアルでは、C:¥ イル(A_T1_Gel1.ti	Program Files¥GE Hea からB_T2_Gel3.tif)を	lthcare¥Me	• All Image Resco elanie 9¥T	2,555 NB = Files (*.tif; *.gel; •)) (キャンセル) 「utorials (こあ	る12枚

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

Quality control	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。
Experimental design	解析の設計の定義
	Experimental デザインウィザードを使用して、共通のデザイン、ファクター名、
	ファクターレベルのいずれかを作成し、イメージを割り当てます。
Alignment setup	アライメント(スポットの位置あわせ)方法の指定
	アライメントの効率を高め、マッチの編集作業を最小限に抑えるには、最初
	に類似した画像のグループ内で画像を補正することができます。
Alignment	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。
Detection	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。
Review	スポットの確認と標準化(ノーマライズ)
	スポットパターンを確認し、スポットを編集したり、アラインメントを修正したり
	することもできます。
Results	結果の検証
	Melanie は解析デザインに合わせた専用のツールと統計テストを自動的に
	提案します。スポットをフィルタリングし、スポットセットを使用してタグ付けし、
	さまざまなプロットとオプションを使用してスポットを検証します。
Picking	切り出し(ピッキング)するスポットの選択とエクスポート
	ピッキングのスポットを選択しピッキングリストを作成します。

5 Quality control

Quality Control ステップでは、これらの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。

Note: イメージ (Image) とゲル (Gel) の違いに注意してください。ゲルは、1 つまたは複数のイメージが 含まれます。 DIGE および他のマルチ染色実験の場合、2 つ以上のイメージが同じゲルに属します。

Melanie - Project 5	THE OWNER.	ander der der einer			THE OWNER OF	allowed the second	- 0	×
+ Quality control Experimental design Alignment setup	Algrment + Detection	Review	Results	Pokin			Ø	# 0 🖸
Display Valo	late X							
<mark>ABOU</mark> ① [Edit Image] DIGEゲルの編集(オプ ^{'Pr} 切り出し、回転など	ション) 複数の画(たはShift=	象を選択する キーを押しな;	も には、Ctrl- がら	キーま				
Overall image consistency			1.7.0		1000	1.1		
The project contains 4 DIGE (12 images) The images have consistent characteristics								
Overall image quality	201	4.47		1.0				
The overall image quality is good	Gel 01 Cy2 Standard	() GH 01	Cy3 Control		Gel 01 Cy5 Treated			
Quality check for selected images			C Gel 02					
to cel 01 C cel 01 Cy2 Standard ① The resolution 19 254 dpt ① The image bit depth is 16	べての外観が正しい 寺って分析を進めるこ	とすれ とが		13	a			
24% of the available intensity levels is used a	Warring Name Rows Com	Resolution Bit depth Est	imated bit depth Gray	ievels % Dynar	scrange % Satural	ed area % Backgrou	nd clipping %	Min valu 🐣
1 This Image shows no sat	女の八れられるが、 近の質を低下させる?	石能松 16	16	24	42	0	0	53.44
IT This image shows no bad のある問題	を発見	16 16	15 16	21 31	38 58	0	0	23.63 29.90
① The resolution is 254 dpi ① The resolution is 254 dpi	常が確認され、Melan	nieは 「た☆	16	26	49	0	0	82.74
) Gets 12 山	- 本影音を与える问题	且ざ快					6	3.6.
		m m		JP. 🧶	A 40 😌 🥌 🖻	······································	17:	27 07/05

5.1 イメージの編集

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



次のステップ Experimental Design をクリックし、変更を保存(Save modifications)して移動します。

6 Experimental Design - 解析デザイン

Experimental Design ステップでは、実験的デザインに関する情報を指定または編集できます。実験のメ インファクター、サブジェクト、ブロック、その他の変数など。この情報は、ワークフロー全体でアライメント設定、 画像表示レイアウト、適切な統計テスト、データ解析ツールを提案するために使用されます。 子のチュートリアルでは細胞を2つの異なる環境下(培地Aおよび培地B)で培養し、2種類の処理 (処理1および処理2)を行ったので2-Factorを選びます。

6.1 実験デザインを選択する



6.2 要因(Factor)とFactorレベルの名前をつける

ウィザードの2番目の画面で Factor と Factor レベルの名前を変更します。

Melanie - Project 16 - Copy
■ ✦ → Quality control Disputition ① [Factor]主要因名を入力例:「Medium」 Results Poling @ ✿ ֎ @ ©
Water Select D Experimental design wizard - Factors definition ② [Sub Factor]副要因名を入力例:「Tteatment」 Notation Prest factor Prest factor Cell A.T1_Gel2 A.u A.T1_Gel2 A.u A.T1_Gel2 A.u B.g Factor level name Factor level name Strong n file Color A.T2_Gel2 A.u B.g A.T3_Gel2 A.u B.g A.T3_Gel2 A.u B.g B.T1_Gel2 Gel3
STreet STreet ③ [Factor level name]:各Factorレベルにサンプル名「A」「B」、「T1」「T2」を入力 イメージファイル名にFactorレベルを識別する文字列があると[String in file]欄に表示され、そのファ イル名のイメージが自動的にFactorレベルに割り当てられる。できない場合は、次のステップで画 像をFactorレベルに割り当てることができる。
A B 1 A.11.642 B.11.642 1 A.11.642 B.12.642 1 A.11.642 B.12.642 1 A.12.642 B.12.642 1 A.12.643 B.12.641 1 A.12.643 B.12.641
① Gets 12 ④ [Create] をクリック ヨウ (***

Melanie - Project 5							States of		
🔶 🔶 Quality con	trol Experimental design	Algrment setup	Algoment 🚽	Detection	Review	Results) P	ldking	@ # @ E
Wizardで	ブァクター、レイ	ベル振り分け	ができなかっ	oた場合	hary note - The m cal test will apply ir of samples per t	umber of samples per a correction. However treatment.	treatment comb , it is generally t	ination is not consiste better to have the sam	nt/balanced. The le (or very similar)
Factor							E.coli		-
Gel 02 Cy3 Treated Gel 03 Cy5 Treated	-					Control		Trea	ted
Gel 04 Cy3 Treated Gel 01 Cy3 Control Gel 02 Cy5 Control Gel 03 Cy3 Control	Control Control			Gel 01 Gel 02 Gel 03 Gel 04	1 Cy3 Control 2 Cy5 Control 8 Cy3 Control 4 Cy5 Control		Gel 01		
Gel 04 CyS Control Gel 01 CyS Treated	Control - ① 振り分け・ を[New level] ドラッグ	るイメージ エリアに		= 39	els not used: Gel (Gel (Gel (02 Cy3 Treated 03 Cy5 Treated 04 Cy3 Treated			
Gel 02 Cy3 Tres Gel	03 Cy5 Trea Gel 04 Cy3 Trea Control		*	Tréated	② [ievel] 名 例:「Tre	名を入力 ated」		new level	•
Gel 01 Cy3 Control G	el 04 CyS Control Gel 03 CyS Control	<1/2>	Get 0s Cy5 Treas						
) Gels 1) 🔯 🗴		۷	η 🕜	a	P 🤻 A AQ 🖲	240 € ^{cont} # (<mark>らいの。 12:55</mark> 日本語 2617/02/08

Wizard でファクター、レベル振り分けができなかった場合

次のステップ[Aliment setup]をクリックし、変更を保存(Save modifications)して移動します。

7 Alignment setup アライメントセットアップ

アライメントは実験中のイメージのスポット位置をリファレンスイメージに合わせます。アライメントは、画像解 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。

アライメントセットアップはリファレンスイメージを設定します。Single stain 実験では、Factor(今回は Medium A と B)ごとにグループを作り、リファレンスイメージを設定します。

7.1 アライメントグループ(階層)を作る



7.2 リファレンスイメージを指定する

リスト内で一番上に表示されるイメージが、アライメントプロセスのリファレンスイメージとして使用されます。リ ファレンスイメージを変更するには、リストの一番上にそのゲルをドラッグします。



次のステップ Aliment をクリックし、変更を保存(Save modifications)して移動します。

8 Alignment アライメント

アライメントは、実験中の各イメージとそのリファレンス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て行います。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。

<u>Single stain 解析では、アライメントセットアップで分けたそれぞれの Subject 内(Tutorial では A_T1_Gel1-Gel3)でアライメントし、Subject 間(Tutorial では A_T1 と A_T2)、B も同様に、次に Factor 間 (Tutorial では A と B) のリファレンスイメージでアライメントします。</u>



8.1 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。

8.2 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: ユーザーマッチングのみを用い、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。 次のステップ Detection をクリックし、変更を保存(Save modifications)して移動します。

9 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を表す固有のスポット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。



9.1 検出パラメータを設定する

Detection parameters	
Smooth 3	
•	•
Saliency 22.2 (9.39)	
•	Þ
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。

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、赤いスポットの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 で表示しています。

10 Review レビュー

Review ステップでは、アライン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。このようにして、データセットが統計分析のために準備されていることを確認できます。スポットフィルタの高度な選択基準に基づいて、スポット編集およびノーマライズの設定を確認します。



10.1 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。一貫性の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。

400 =.+ ⑥ Reviewに戻る G Creat ③ [Sprit] を選択 QDe In one pane By factors 2 Spotをクリッ 選択 Øs Image layout 10 Me A TI-A T2-8 T1-8 T Default dis Shrink Move 画面表示変更 ッグ Display exclud ラ 7 [田]から Spotを横断するよう 4) 編集を実行す Group Images \rightarrow By り分け線を引 る前の確認画面 alignment [Edit and...]を選択 Image layout → Tiled 🎛 6 🙆 💕 🔂 💭 🐨 😰 🕹 🕱 🕥 👘 👘 🖉 😣 🖉

Spot edition ボタンをクリックし、スポット編集モードに入ります。以下の操作ができます。

🕝 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。

10.2 スポットノーマライゼーション Spot normalization

内部標準を用いた DIGE 実験(DIGE experiments with an internal standard)では、レシオメトリックノ ーマライゼーションが適用され、かつ自動的に実行されます。

Melanie - Projec	ct 5				-	-		and the second se					and the second	and a second second		. C X
4 Spot nom	1 Revie	wIこ月	E る													# 0 E
Verify your normalizat appear in red.	tion. Spots used to calcu	late the non	naization	fector	Norma	lizatio	n plot	4.4				- 610200		\sim	H	65 65
Back VGel 02	Normalization Cy3 Treated" vs. 'Gel 03	2 Cy2 Stand	ard	Next	Vol ratio								U.		\bigcirc	
Use Ratiometric non	malization •				16-				•			\sim	C.	1		~
									• •				XY		1 ~	ST.
Normalization facto	or table													-	5	~
Image	Reference	内音	8標3	車を	用いけ	=DI	GE実	職で	は、レ						Y/	6
Gel 02		2.4		N 11	a. h	1_		14		asher		1	\leq	A		5
Get 02 Cv3 Treated	Gel 02 Cv2 Standard	24			222			1 6		10 A 10						1 1
Gel 02 Cy5 Control	Gel 02 Cy2 Standard	2	(Rat	iome	etric N	lori	naliz	ation)が適用	1.11.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1	********				\lor \neg	1.1
		され	1. 1	10	白動的	41-	主行	され	ます				-	M	\sim	X
Gel 01						-	~ .		u 2 0			\sim	1	γ / γ	>1	
Gel 01 Cy3 Control	Gel 01 Cy2 Standard	1.41	963	1.27								1			1 1	1
Gel 01 Cy5 Treated	Gel 01 Cy2 Standard	0.511	563	1.36								Gel 02 Cys	Treated	<u> </u>	2	
Gel 03					0.0627	024	4096	16384	65536 2.6e5	166 4.266	1.7e7 6.	Ae7			()	
Gel 03 Cy3 Control	Gel 03 Cy2 Standard	1.43	563	1.23							Nean	Vel D	9		\bigcirc	
Gel 03 Cy5 Treated	Gel 03 Cy2 Standard	0.563	563	1.33	Norma	lizatio	n table					. 7 1	~			
Cited 1						4.4	10					\sim	C			~
Gel 04 Cv2 Treated	Cel 04 Cv2 Standard	0.66	643	1.22	(C) - 1					and the second second second	-		1 2	~ 6	V Z	-
Gel 04 Cv5 Control	Gel 04 Cy2 Standard	2.13	563	1.24		10	3 43300	263140	All US UZ Cys Treated	169.449	ricing error		1			
		10.00			237	236	1.26947	502944	5666.70	446384	1.22874		21	The	20	1
Standard					238	237	1.55984	931877	1163854	746136	1	-	T		¥ /	5
Gel 02 Cy2 Standard	Gel 03 Cy2 Standard	0.937	563	1.12	239	238	1.7984	1133832	1520519	845482	1.15294	1	$ \leq$	Ind	I C A	11
Gel 01 Cy2 Standard	Gel 03 Cy2 Standard	1.05	563	1.13	240	239	2.01276	127927	181492	90170.7	1.29036	~			SKI	
Gel 04 Cy2 Standard	Gel 03 Cy2 Standard	1.07	563	1.13	241	240	2.17878	227689	336084	154253	1.3968				~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~	1
					242	241	1.64669	197387	253293	153820	1.05567			m	n	X
					243	242	1.89136	167497	230353	121792	1.21253	. ~	1	γ	21 -	
+				•	4	_				1		1	1	and and a second	N	10
Gels 2 Spots 1		-							Mozilla Firefor							3 3. G.
370	0	G	4	7	02	x					m	R	■ A 般 📽 🥔	9 mil -	= E al 🖕 2	10:06 017/02/17

次のステップ Result をクリックし、移動します。

11 Results 結果

Result のステップでは、専用のツールと統計テストを使用して結果を調べることができます。デフォルト画面 は、最良のあなたの実験計画に適合されている統計解析の結果が表示されます。 このチュートリアルでは One-way ANOVA(一元分散分析)を用い、Medium A、B 間で顕著なタンパク質 発現の差異があるスポット「ANOVA 検定値が 0.05 未満であり、かつボリューム比の平均が 2 以上または 0.5 以下」を見つけます。

11.1 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

11.2 ANOVA 検定値が 0.05 以下、Fold(発現量比)が 2 以上のスポットを見つけ、 「ANOVA=<0.05, Fold=>2」のスポットセットを作る



11.3 Medium「B」の発現量が「A」の 2 倍以上のスポットを見つけ、「B=>2」のスポッ トセットを作る



11.4 Anova Table に「B=>2」のスポットセットを表示し、「ANOVA=<0.05, Fold=>2」 かつ「B>=2」の「Interest Spots」スポットセットをつくる



11.5 抽出されたスポットの評価

このチュートリアルでは 12 枚のゲルを使用していますので、1 マッチングスポットあたり、Medium A(青)と B(黄緑)で各 6 スポットずつ存在することになります。縦軸は発現量(volume) で表示されます。サ ンプルスポットを横切る帯と白線はばらつきと、平均値を示しています。



各スポットを検証したら、Analysis1 チェックボックスカラムにチェックを入れます。

- 🛛 関心のあるスポットとして確認
- 🗵 関心ないスポットと確認
- 🛛 まだレビュー、検証していないスポット

Ettan Spot Picker(スポット回収ロボット)を使用するならば、次のステップ Picking をクリックし、移動します。

11.7 複数の統計結果を表示

ホームボタンを押すと、複数の統計結果の表示ができます。

- Gel analysis
- One-factor analysis (One-way ANOVA) 一元分散分析
- Two-factor analysis (Two-way ANOVA) 二元分散分析
- PCA (主成分分析)

11.8 Two-factor analysis (Two-way ANOVA)

■概要

Two-Way ANOVA は、【Condition 2】が同じで【Condition 1】値が異なる群間や(Two-Way ANOVA Condition 1)、その逆(Two-Way ANOVA Condition 2)の群間の有意差を計算します。Two-Way ANOVA 解析は、2 つの因子による作用の有意性の差も計算します(Two-Way ANOVA Interaction)。 したがって、Two-Way ANOVA には 3 つの仮説があります。各セットの帰無仮説は以下の通りです。

- ・ 第一条件の母集団平均は等しい。これは【Condition 1】のみの One-Way ANOVA と似ています。
- ・ 第二条件の母集団平均は等しい。これは【Condition 2】のみの One-Way ANOVA と似ています。
- ・ 2 つの因子の間に相互作用がない。有意な ANOVA Interaction 値は、相互作用あるいは干渉に より、2 つの因子が互いに影響しあっていることを示しています。

この種の影響の例を以下に示します。

Two-Way ANOVA 解析のグラフ例

各グラフは、2 つの異なる実験条件におけるタンパク質発現量(縦軸)の変化を示しています。 【Condition 1】 (横軸)は、2 つの温度 A と B を、【Condition 2】は薬剤処理(図中 ●)とコントロー ル(図中〇)を示しています。 各条件で 3 回の泳動が行われているため、4 つの実験群それぞれに 3 サンプルがあります。【Condition 1】と【Condition 2】は、条件の一方を固定し他方を変えるというように 使用されており、群 1 と群 2 は【Condition 1】値が等しく(どちらも温度 A)、【Condition 2】値(薬 物処理またはコントロール)が異なります。群 3 と群 4 は、別の【Condition 1】値(どちらも温度 B) と、異なる【Condition 2】(薬物処理またはコントロール)値を持つこ とになります。

<実験1 > 温度AとB、または処理済みと未処理のサンプルのタンパク質発現量に変動はありません。

<実験 2 > 温度 B でタンパク質発現が増加していますが、薬物処理は効果がありません。 <実験 3 > 薬物処理でタンパク質発現が増加していますが、温度変化は効果がありません。 <実験 4 > 薬物処理と温度上昇の両方の作用でタンパク質発現が増加しています。すなわち 2 条件は独 立しており、P12 は有意ではありません。

<実験 5 > 薬物処理のみが温度変化と関連しており、タンパク質発現量が増加しています。すなわち 2 つの条件は相互作用しており、結果として P12 < 0.001 となります。

12 Picking ピッキング

[ピッキング]ステップでは、スポットをスポットピックロボットが読み取れるピックファイルにエクスポートできます。 Note:Ettan Spot Picker ではリファレンスマーカーを含むピッキングゲルを使用します。

13 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。

13.1 pl / MW setting

Quality control ステップの Edit ボタンから「Edit pl/MW...」を押す。

Melanie - Project 13		Transmission (March 1997)	and the provider
E - Alignment	Detection	Spot edition Presence filter	Coverage
Image Display Images/Table Images/Table Edit Images/Table Edit images Edit pi/MW (Biot1 HCPAntigen Cy5 with 5 markers)	Validate		🖏 Blot1
Droject 'Droject 12'	2° .		475

13.2 pl / MW setting

13.3 pl / MW 表示

14 画面のエクスポート

14.1 イメージウインドウのエクスポート

Options(歯車)をクリックしま O 🛱 す。 General options... Export > Sheet to clipboard Workflow options... 表示しているすべてのイメージ 📋 Sheet to clipboard Export ۶ Export > Image to clipboard Ś Image to dipboard 選択(左上の名タグが緑)イメー 2D E Export data ジ

14.2 表(Table)のエクスポート

Save アイコンをクリックします)。 Save > テキストファイルで保存。 Selected row もしくは all rows

Ano	va table	9			
	- -	₽ ▼	🌠 🚽		•
-	Save			Bars	Fol
 8	Print				2.55
₽ħ.	Conv to	diphoard			2.05
43	сору ц	cipuoaru			2.22
	4 179	1.76543			2.15

14.3 Experiment Design view のエクスポート

Settings をクリックしま	Experimental design view				
す。	E.O	coli	•	Save	ł
Save > html ノアイルで	Control	Treated		Print	Į
幽隊保仔。	Gel 01 Cy3 Control	Gel 01 Cy5 Treated	4	Copy to clipboard	/

14.4 Expression Profile のエクスポート

Settings をクリックします。

Save > png、bmp、tiff ファイルで画像保存。

Expression profile	
Vol Ratio	Export 🕨 🔚 Save
2.57	Display 🕨 😂 Print
2	2 1 Copy to clipboard

お問合せ先

Cytiva (मनन्नार)

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