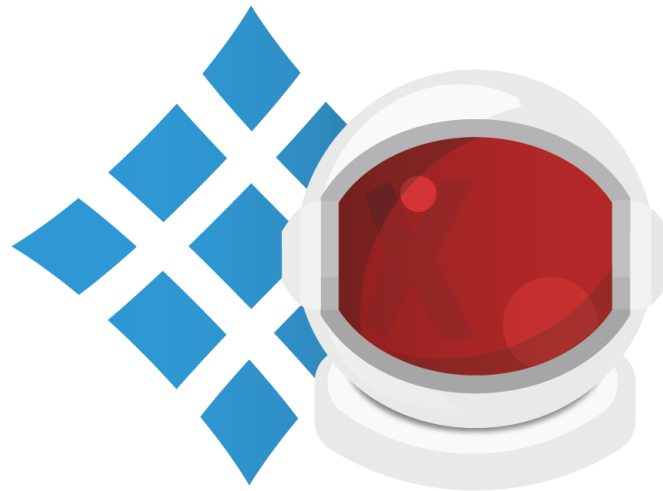
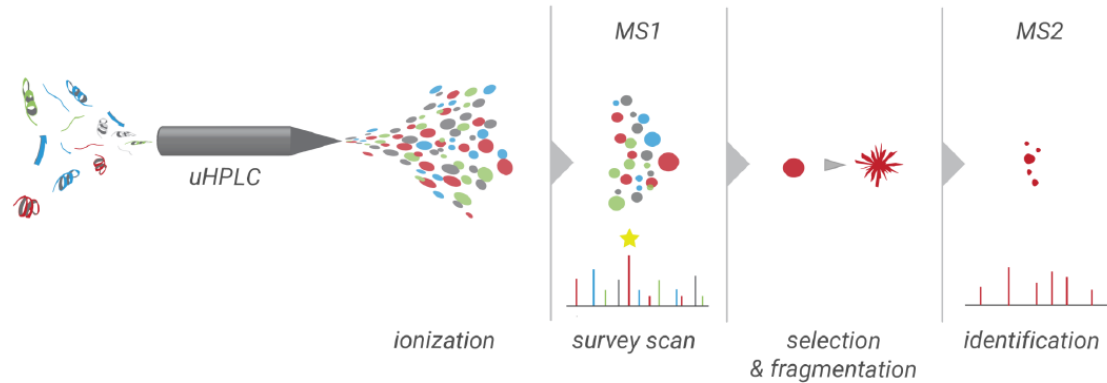


# 質量分析データ解析Webセミナー： DIA（データ独立取得）解析編

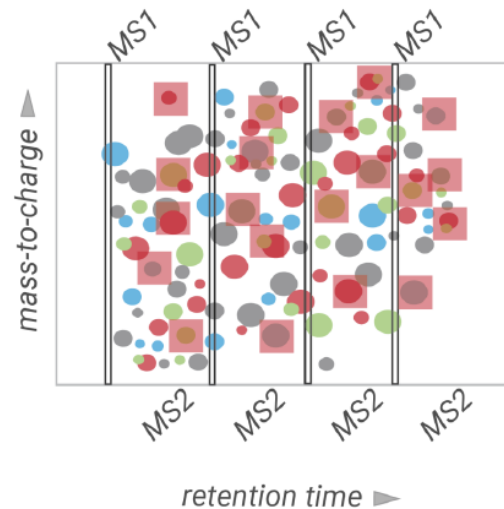


フィルジェン株式会社 バイオインフォマティクス部  
(biosupport@filgen.jp)

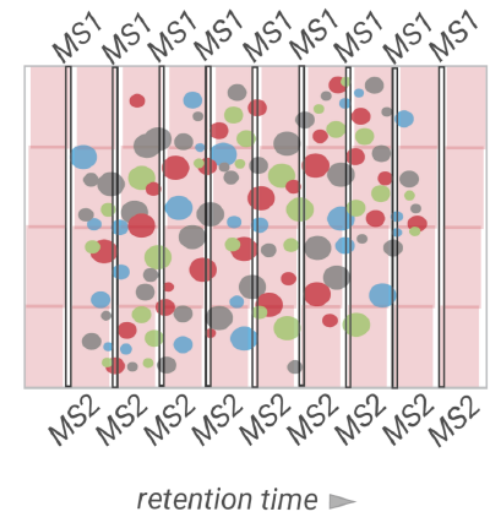
- 従来の取得方法であった DDA (Data Dependent Acquisition)は、MS1で取り込んだ全イオン群のうち、強度の高かったプリカーサーイオンを選択してMS/MSの取得を行うため、全部のプリカーサーイオンに対してMS/MSを取得することが難しい。



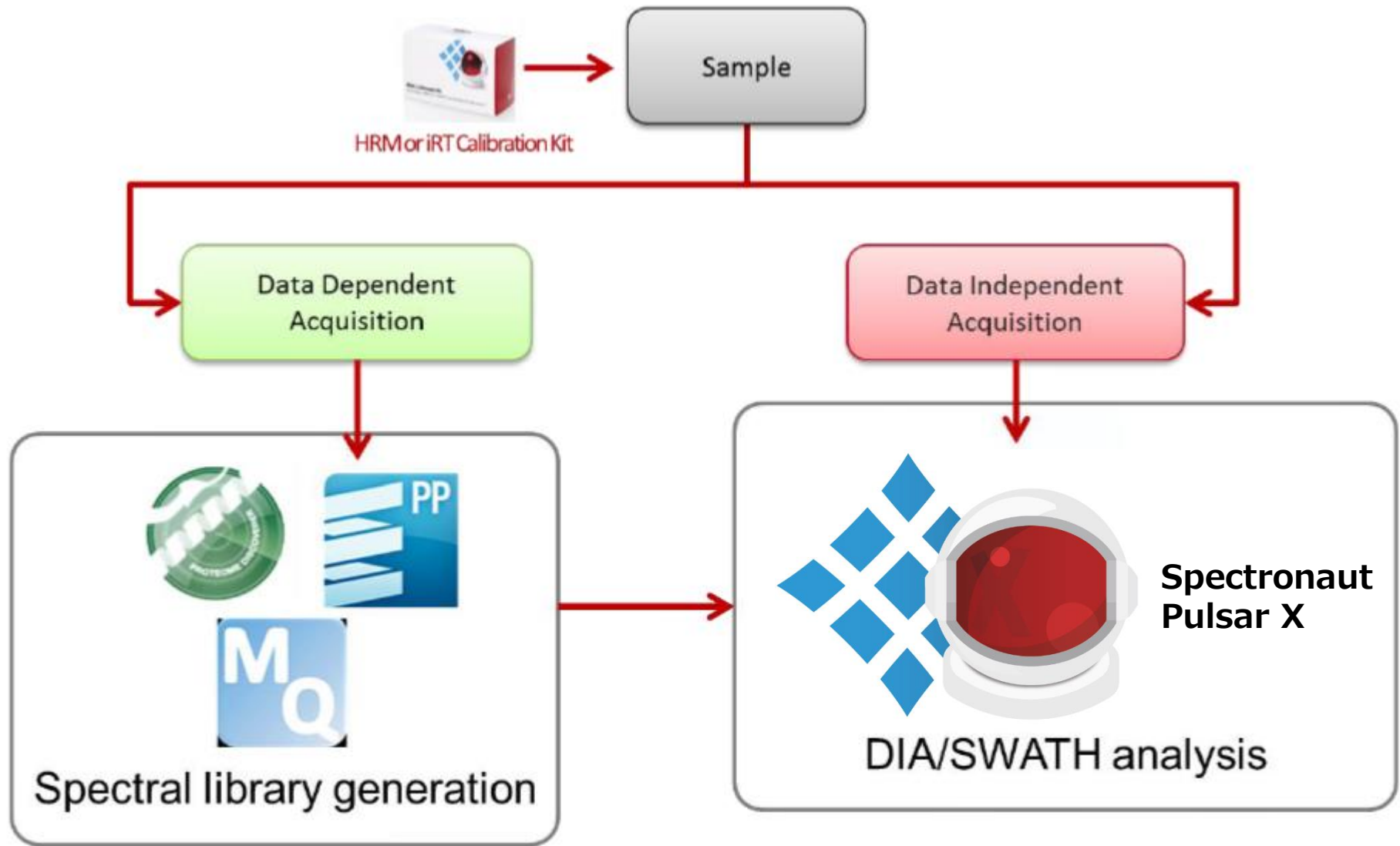
DDA / SHOTGUN



DIA

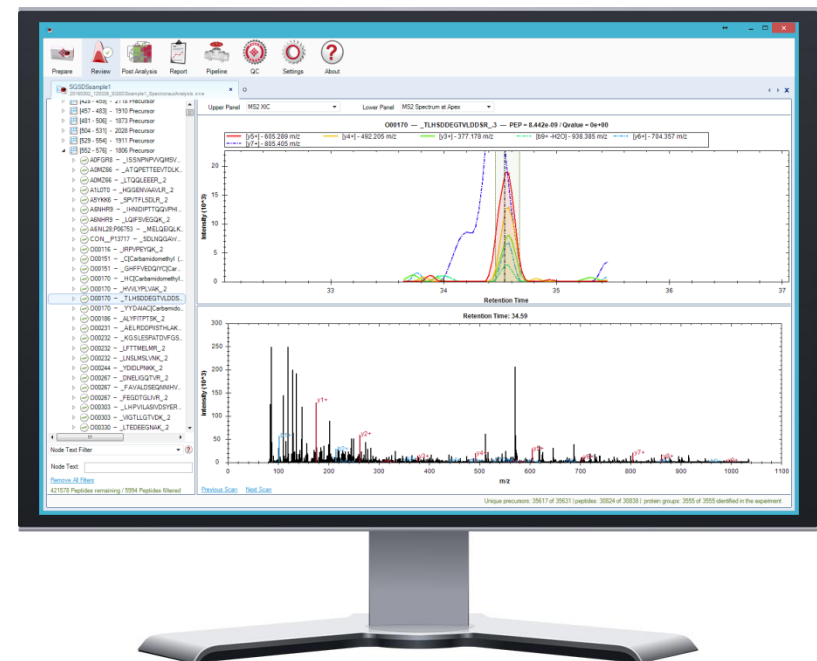


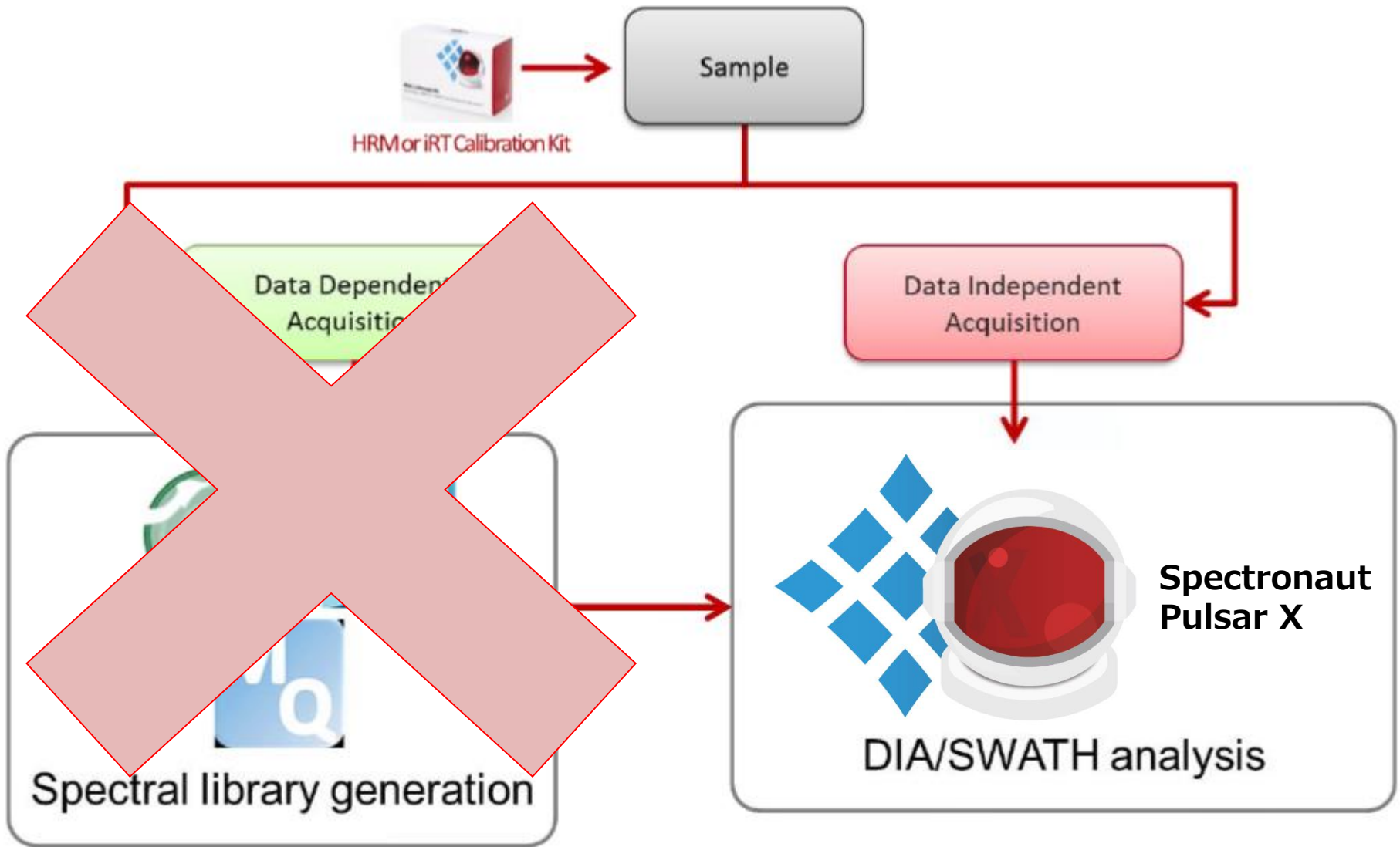
- DIAは、MS1の結果に依存せず、指定した質量範囲のMS/MSデータを連続的に取得するため、すべての分析対象がフラグメント化したMS/MSスペクトルが生成されます。これにより、より再現性の高い包括的なデータの取得が可能となりました。



- ペプチド同定のためにスペクトルライブラリーが必要です。

- 直感的な操作により、DIAデータの解析が可能
- 同定数の最大化とFDRコントロールのために開発された独自のデータベース検索エンジン「Pulsar」を搭載
- スペクトルライブラリーの作成が可能
- 外部検索エンジンで作成されたスペクトルライブラリーのインポートが可能
- **スペクトルライブラリーなしでDIA解析が行える「direct DIA」ワークフローを搭載**
- 複数のスペクトルライブラリーを組み合わせたハイブリッドライブラリー機能を搭載
- 発現に差があったタンパク質群を即座に確認可能
- クラスタリング解析やGO解析などの統計的解析が可能





- DDAベースのスペクトルライブラリーなしに、1回の測定で解析できます。

## directDIA™

Protein extraction,  
digestion and clean-up



DIA map recording  
by LC-MS/MS



directDIA™ data extraction  
& multiplexed quantification



Data analysis, statistics,  
biological interpretation



## 利点

- DDA測定からスペクトルライブラリの生成が不要
- 1回のランで解析できるため、装置の測定時間の短縮、コストの削減

## 原理

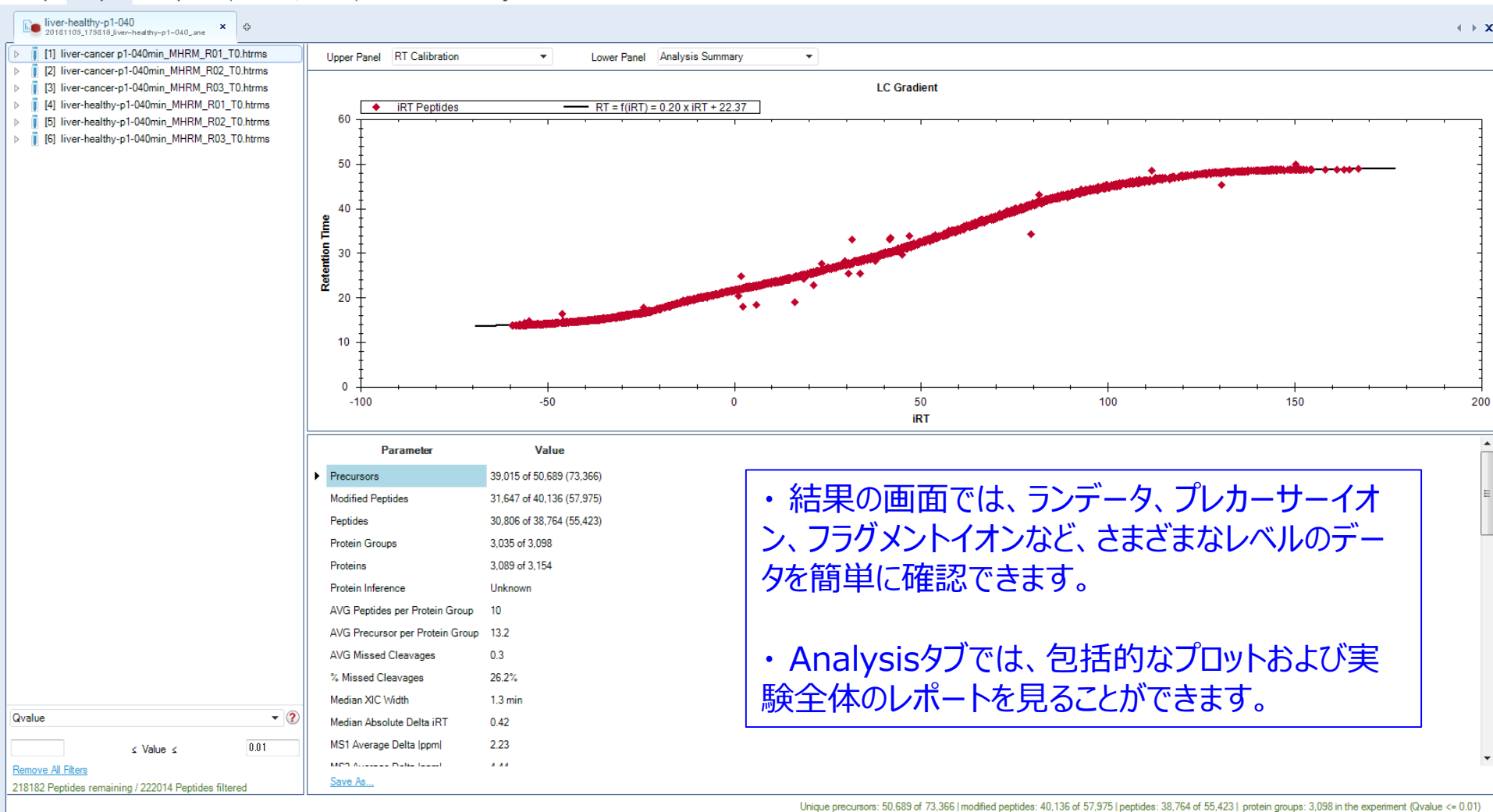
- directDIAはfastaファイルに対してDIAデータを直接解析することによって動作します。
- DIAデータは疑似DDAデータに変換されてから検索されます。

詳細 : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25599550>

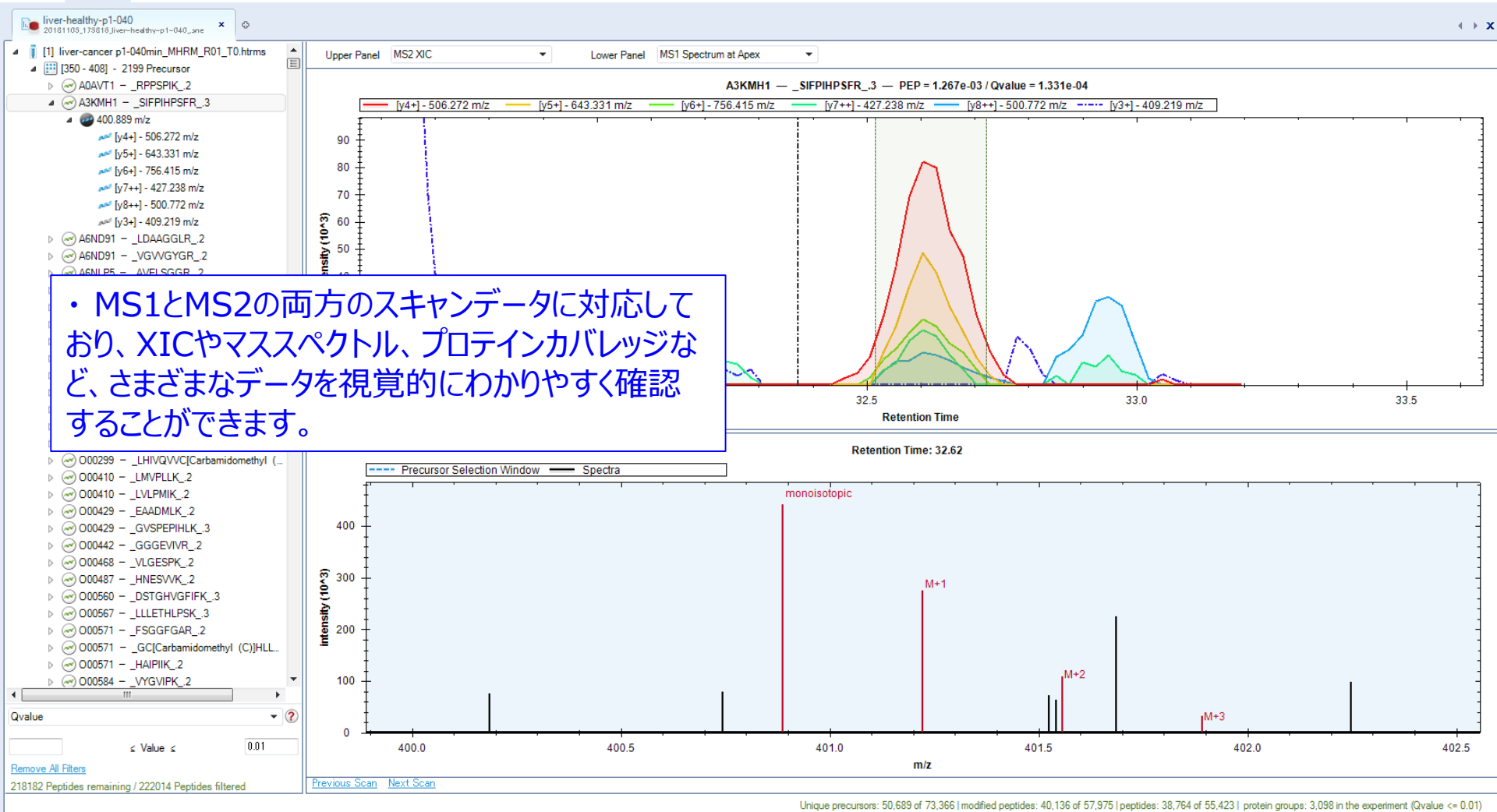
- 各解析で必要なファイル

Resource	Classic DIA analysis <i>(library-based)</i>	directDIA <i>(library-free)</i>
DIA run files	<b>required</b>	<b>required</b> <sup>a</sup>
Library <sup>b</sup>	<b>required</b>	<i>not applicable</i>
Protein database (FASTA)	<b>recommended</b>	<b>required</b>
Gene Ontology annotation	<b>optional</b>	<b>optional</b>

- ライブラリーベースのDIA分析またはライブラリーフリーのdirectDIA分析の2種類があります。
- directDIAは、Thermo Fisher ScientificおよびSCIEXのデータに対してのみサポートされています。
- ライブラリーは、Spectronaut Pulsar Xのソフトウェア上で生成することができます。







• MS1とMS2の両方のスキャンデータに対応しており、XICやマススペクトル、プロテインカバレッジなど、さまざまなデータを視覚的にわかりやすく確認することができます。



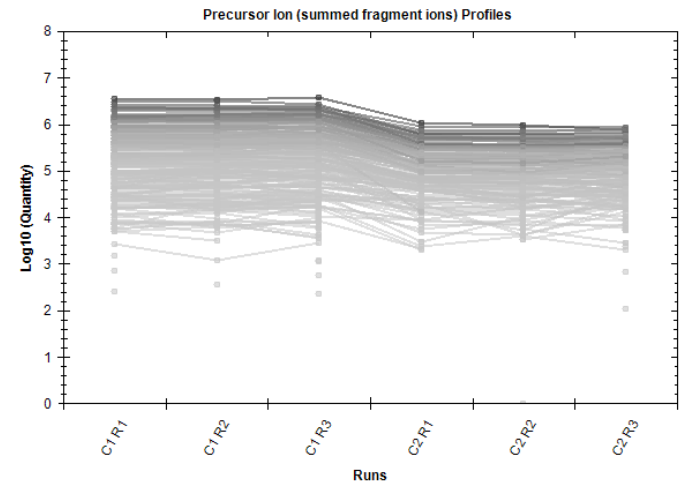
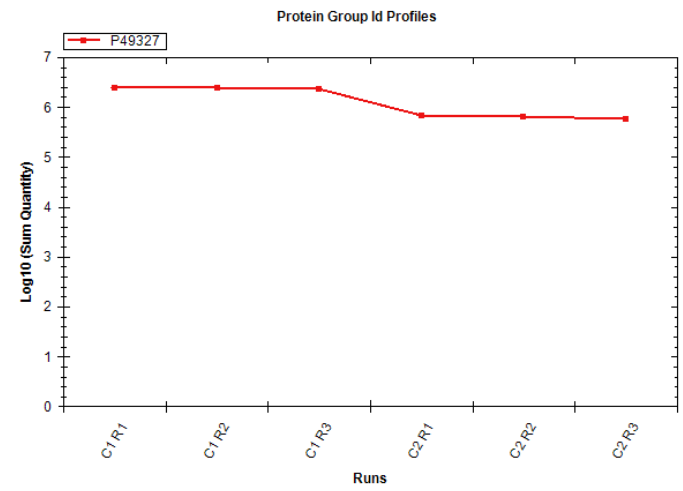
liver-healthy-p1-040

- Analysis Overview
  - Overview
  - Data Completeness
  - Run Identifications
  - Coefficients of Variation
  - CVs Below X
  - Normalization
- Scoring Histograms
  - Label Free
  - Protein FDR
  - Protein Pvalue Histogram
- Analysis Details
  - Binned Identification
  - Binned Coefficients of Variation
- Differential Abundance
  - Candidates
  - P-value Histogram
  - All Comparisons Histogram
  - GO Enrichment
  - GO Clustering
  - Heatmap
  - Volcano Plot

Regulation	Comparison (group1/group2)	Group	ProteinGroups	AVG Log2 Ratio	Absolute AVG Log2 Ratio	Qvalue
Contains:	Contains:	Contains:	Equals:	GreaterThanOrEqu...	LessThanOrEqu...	0.0
Healthy / Cancer	P49327	P49327	-1.90622007393...	1.90622007393104	7.504113717408911	
Healthy / Cancer	P31327	P31327	0.78065973534...	0.780659735342764	6.174420492048781	
Healthy / Cancer	P02751	P02751	-3.690448499141	3.690448499141	6.675314497351111	
Healthy / Cancer	P21333	P21333	-1.15549204974...	1.15549204974787	4.881339619750991	
Healthy / Cancer	P98160	P98160	-2.06536440743...	2.06536440743055	1.2368450450291	
Healthy / Cancer	P35573	P35573	2.97997497878...	2.97997497878645	5.8442012013250	
Healthy / Cancer	P06737	P06737	3.00964362212...	3.00964362212629	2.5517039629976	
Healthy / Cancer	P00367	P00367	2.36419840783...	2.36419840783078	1.7255603557964	
Healthy / Cancer	P11586	P11586	1.49572362513...	1.49572362513252	7.2936688709516	
Healthy / Cancer	P12576	P12576	1.5409934714...	1.5409934714714	1.2874093631065	
Healthy / Cancer	Q16822	Q16822	1.92939535188...	1.92939535188003	6.8837414822778	
Healthy / Cancer	P11498	P11498	0.85011911176...	0.850119111761991	2.5467612971760	
Healthy / Cancer	P48735	P48735	1.58041906826...	1.58041906826787	3.6280475048982	
Healthy / Cancer	P30038	P30038	2.78650904152...	2.7865090415213	5.6571225603117	
Healthy / Cancer	Q04828	Q04828	-1.86096394795...	1.86096394795462	1.0302352510560	
Healthy / Cancer	P02545	P02545	-0.77301846299...	0.773018462997989	3.1042334623446	
Healthy / Cancer	P08238	P08238	-1.15579833093...	1.15579833093756	1.6379567564711	
Healthy / Cancer	P23378	P23378	3.14453331496...	3.1445333149665	9.2347195957027	

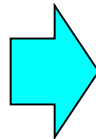
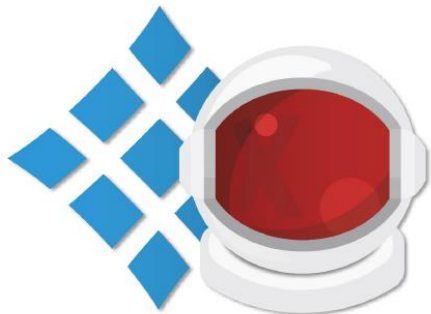
・ 有意差のあるタンパク質群の抽出はソフトウェアが自動でリスト化します。

・ リストはデフォルトでQ-valueが小さい順番に並び替われています。





# ソフトウェアデモンストレーション



## Spectronaut™ Pulsar X

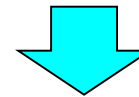
User Manual

### 2.2 Demo Data







In section 3, Spectronaut™ Pulsar X Usage, we will guide you through the software perspective by perspective. The examples shown for the classic DIA analysis (section 3.4.1.1) are generated with the demo data available for downloading [here](#). Please note this demo data was intentionally prepared to be as small as possible for demoing purposes. Most DIA experiments will require larger storage space and more resources to be analyzed.

Page 13 of 126

 **BIOGNOSYS**  
NEXT GENERATION PROTEOMICS



- データセットはヒトの肝臓癌組織
- 健康な組織と癌性組織を同じ患者から抽出、3人の患者（R01、R02、R03）を分析
- ライブラリーは2つの条件のプールからフラクション分離された複数のDDAデータから作成

- ▶  [1] liver-cancer-p1-040min\_MHRM\_R01\_T0.htrms
- ▶  [2] liver-cancer-p1-040min\_MHRM\_R02\_T0.htrms
- ▶  [3] liver-cancer-p1-040min\_MHRM\_R03\_T0.htrms
- ▶  [4] liver-healthy-p1-040min\_MHRM\_R01\_T0.htrms
- ▶  [5] liver-healthy-p1-040min\_MHRM\_R02\_T0.htrms
- ▶  [6] liver-healthy-p1-040min\_MHRM\_R03\_T0.htrms

## 手順1 : スペクトルライブラリーの作成

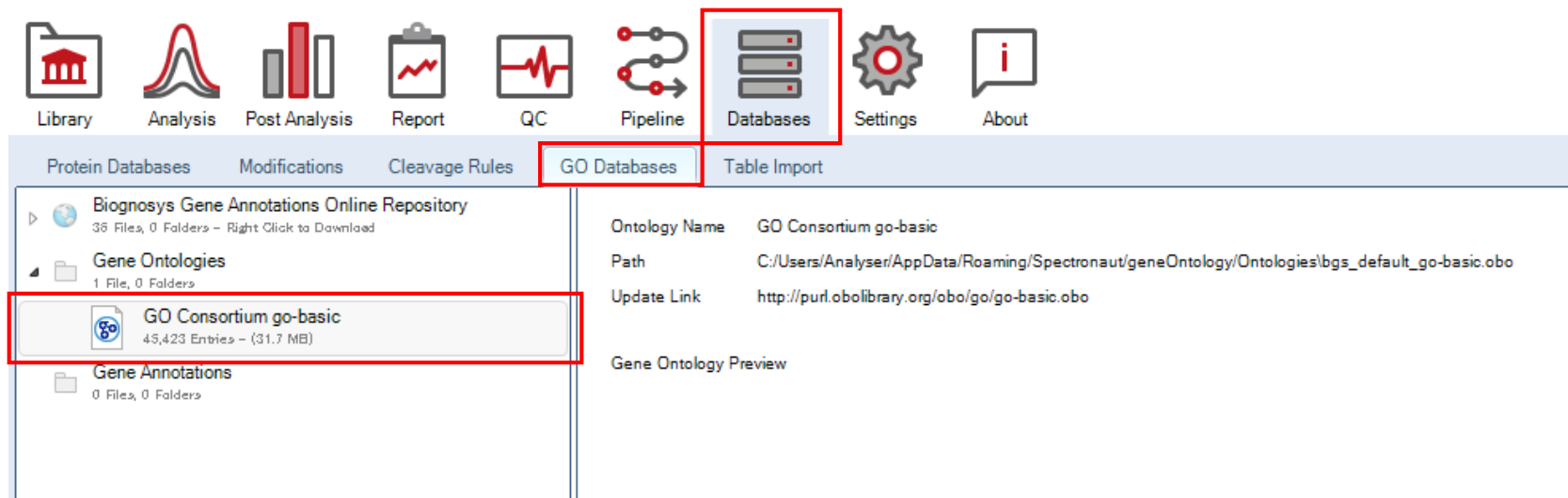
- DDAもしくはDIAで取得したデータを読み込み、Pulsarエンジンを使ってライブラリーを作成

## 手順2 : DIAデータ解析

- DIAデータを読み込み、ライブラリーを参照してタンパク質の同定・定量を行う

## 手順3 : 解析結果の確認

- タンパク質データの確認、およびクラスタリング解析やGO解析などの統計データの確認



- Spectronaut™ Pulsar XはデータにGOアノテーションを付加することができます。
- GOアノテーション付加には、Gene OntologyファイルとGene Annotationファイルの2つのファイルが必要です。
- Gene Ontologyファイル (\*.obo 形式)はソフトウェアインポート時に自動でインストールされます。PerspectiveタブのDatabases → GO Databasesから確認できます。

Library Analysis Post Analysis Report QC Pipeline Databases Settings About

Protein Databases Modifications Cleavage Rules GO Databases Table Import

Biognosys Gene Annotations Online Repository  
38 Files, 0 Folders - Right Click to Download

Gene Ontologies  
1 File, 0 Folders

GO Consortium go-basic  
43,423 Entries - (31.7 MB)

Gene Annotations  
1 File, 0 Folders

goa\_human  
19,059 Entries - (3.0 MB)

Annotation File  
Organism: Homo sapiens  
Description: GOC Validation Date: 10/05/2016 \$  
Submission Date: 10/5/2016

The above "Submission Date" is when the annotation project was submitted to the Gene Ontology Consortium (GOC). The "GOC Date" indicates when this file was last changed as a result of validation and filtering process.

Accession	Annotation	Namespace	Evidence	Ontology
A0A024R161	Requires Ontology	Function	IEA	GO:0004871
A0A024R161	Requires Ontology	Component	IEA	GO:0005834
A0A024R161	Requires Ontology	Process	IEA	GO:0007186
A0A075B734	Requires Ontology	Function	IEA	GO:0005215
A0A075B734	Requires Ontology	Process	IEA	GO:0006810
A0A075B734	Requires Ontology	Component	IEA	GO:0016021
A0A075B759	Requires Ontology	Process	IEA	GO:0000413
A0A075B759	Requires Ontology	Function	IEA	GO:0003755
A0A075B759	Requires Ontology	Component	IEA	GO:0005737
A0A075B759	Requires Ontology	Process	IEA	GO:0006457
A0A075B767	Requires Ontology	Process	IEA	GO:0000413
A0A075B767	Requires Ontology	Function	IEA	GO:0003755
A0A075B767	Requires Ontology	Process	IEA	GO:0006457
A0A087V1H1	Requires Ontology	Process	IEA	GO:0009607
A0A087V1H1	Requires Ontology	Component	IEA	GO:0016021
A0A087V1H5	Requires Ontology	Function	IEA	GO:0005249
A0A087V1H5	Requires Ontology	Component	IEA	GO:0016021
A0A087V1H5	Requires Ontology	Process	IEA	GO:0071805
A0A087V1J2	Requires Ontology	Function	IEA	GO:0005525
A0A087V1J2	Requires Ontology	Component	IEA	GO:0016021
A0A087V1U7	Requires Ontology	Function	IEA	GO:0004453
A0A087V1U7	Requires Ontology	Process	IEA	GO:0005737
A0A087V1U8	Requires Ontology	Component	IEA	GO:0005737
A0A087V1U0	Requires Ontology	Component	IEA	GO:0031966
A0A087V1U8	Requires Ontology	Function	IEA	GO:0003676
A0A087V1U8	Requires Ontology	Component	IEA	GO:0005622
A0A087V1U8	Requires Ontology	Process	IEA	GO:0006355
A0A087V1U8	Requires Ontology	Function	IEA	GO:0048872
A0A087V1U0	Requires Ontology	Function	IEA	GO:0003676
A0A087V1U0	Requires Ontology	Component	IEA	GO:0005622

Import Gene Annotation...

Gene AnnotationファイルはGO Consortiumデータベースのアンノテーションファイル (\*.gaf 形式)が推奨されます。

<http://geneontology.org/page/download-go-annotations>

Biognosys提供の下記のデモデータセットフォルダの中にもHumanアンノテーションファイル「goa\_human.gaf」が収録されています。

[files.biognosys.ch/058\\_Spectronaut/ReleaseMaterial/SNX\\_manual\\_dataset.zip](http://files.biognosys.ch/058_Spectronaut/ReleaseMaterial/SNX_manual_dataset.zip)

新しいフォルダー

名前	更新日時	種類	サイズ
ConditionSetup.xls	2018/10/26 14:15	Microsoft Excel ...	1 KB
goa_human.gaf	2018/10/26 14:15	GAF ファイル	57,813 KB

ファイル名(N): goa\_human.gaf

Supported Files (\*.gaf; \*.sfg)

開く(O) キャンセル

「Import Gene Annotation...」からGene Annotationファイルをインポートすることでファイルが追加されます。これでGO解析のセットアップは完了です。



The screenshot displays the Spectronaut Pulsar X software interface. The top navigation bar includes icons for Library, Analysis, Post Analysis, Report, QC, Pipeline, Databases, Settings, and About. The 'Library' tab is active, showing a list of Spectral Libraries on the left and a 'Set up Library Generation from Pulsar' dialog box in the center. The dialog box prompts the user to 'Choose an experiment name and select the raw files you want to search.' The experiment name 'demo\_lib\_gen' is entered. Below this, a list of four runs is shown, each with a checkbox and a file path. At the bottom of the dialog, there are buttons for 'Add Runs from File...' and 'Remove'. The 'Next' button is also visible at the bottom right of the dialog. Red arrows and numbered callouts (1-5) highlight the steps: 1. Clicking the 'Library' icon; 2. Viewing the 'Spectral Libraries' list; 3. Clicking the 'Generate Library from Pulsar...' button; 4. Clicking the 'Add Runs from File...' button; 5. Clicking the 'Next' button.

① 「Library」をクリックします。

② 「Spectral Libraries」には保存されたライブラリーが表示されます。

③ 「Generate Library from Pulsar…」からウィザードを開き、実験名を入力します。

④ 「Add Runs…」からライブラリー作成に使用するDDAデータをインポートします。(複数選択可)

⑤ 「Next」で次へ進みます。

**1.** Search...  
Import...

**2.** uniprot\_sprot\_2018-01-01\_HUMAN\_ISOFORMS  
42,288 Entries - (12.9 MB)

**3.** OK

Entries: 42258  
Date Created: 2018/10/29 16:51:54  
Date Modified: 2018/10/29 16:51:54  
Original File Name: uniprot\_sprot\_2018-01-01\_HUMAN\_ISOFORMS.fasta  
Organism: Homo sapiens  
Protein Id: Accession  
Description:

Set up Library Generation from  
Select the protein databases.  
Fasta files can be assigned per run or for all runs.

- [1] liver-cancer-p1-040min\_
- [2] liver-cancer-p1-040min\_
- [3] liver-cancer-p1-040min\_
- [4] liver-healthy-p1-040min\_
- [5] liver-healthy-p1-040min\_
- [6] liver-healthy-p1-040min\_

Fasta File...  
Previous Next Skip to Last

**1. Import:**  
ライブラリー作成に使用するFASTAファイルをインポートします。FASTAファイルはUniprotなどのデータベースからダウンロードできます。

**2.**  
インポートされたFASTAファイルが表示されます。使用するファイルのボックスにチェックを入れます。

**3.**  
選択が終われば「OK」から次へ進みます。

**1. Digest Type:**

- Specific: N末端とC末端の両方が次で指定する消化に従う。
- Semi-specific: 片側の末端が次で指定する消化に従う。
- Unspecific: 消化のルールなし

**2. Enzymes/Cleavage Rules:**  
消化酵素によるペプチドの切断タイプを選択します。

**3.**  
ペプチドの長さや許容する消化ミスなどを入力します。

Search settings...  
Previous Next Skip to Last

**1. Maximum Variable Modifications:**  
1つのペプチドで同時に起こる修飾の最大数を入力します。

**2. Select Modifications:**

- Fixed Modifications:  
アミノ酸が常に特定の修飾を含む場合に入力します。
- Variable Modifications:  
可能性のあるアミノ酸の修飾を入力します。

[1] liver-cancer-p1-040min\_MHRM\_R01\_TO  
[2] liver-cancer-p1-040min\_MHRM\_R02\_TO  
[3] liver-cancer-p1-040min\_MHRM\_R03\_TO  
[4] liver-healthy-p1-040min\_MHRM\_R01\_TO  
[5] liver-healthy-p1-040min\_MHRM\_R02\_TO  
[6] liver-healthy-p1-040min\_MHRM\_R03\_TO

Search settings...  
Previous Next Skip to Last

Set up Library Generation from Pulsar

Add previous searches to enrich your analysis.  
This allows you to add any previously searched data to further enrich the depth of your library.

- Biognosys Search Archives Online Repository  
2 Files, 1 Folder - Right Click to Download
- Published data  
2 Files, 0 Folders - Right Click to Download
  - Human Proteome (A draft map of...)  
(10.7 GB) - Right Click to Download
  - Plasma Profiling (Plasma proteome profiling to...)  
(518.1 MB) - Right Click to Download
- Search Archives  
0 Files, 0 Folders

Search...

[Import Search Archive...](#)

[Previous](#) [Next](#) [Skip to Last](#)

No Data to Display!

ここでは以前に検索したデータを追加して、ライブラリーの深度をさらに深めることができます。  
ライブラリーを作成すると「Search Archive」に結果が保存されます。アーカイブの追加は、最初から解析するよりも早い処理速度で、適切なFDR制御が行えます。

事前にGOアノテーション (\*.gaf)ファイルがインポートしてある場合、ここで選択することができます。  
GOアノテーションファイルを選択することでGene Ontology情報を含むライブラリーを作成することができます。

GOC Validation Date: 10/05/2016 \$  
Submission Date: 10/5/2016

The above "Submission Date" is when the annotation project provided this file to the Gene Ontology Consortium (GOC). The "GOC Validation Date" indicates when this file was last changed as a result of a GOC validation and filtering process.

Note: The contents of this file may differ from that submitted to the GOC. The identifiers and syntax of the file have been checked, rows of data not meeting the standards set by the GOC have been removed. This file may also have annotations removed because the annotations for the listed Taxonomy identifier are only allowed in a file provided by another annotation project. The original submitted file is available from: <http://www.geneontology.org/gene-associations/submission/>

For information on which taxon are allowed in which files please see: <http://www.geneontology.org/GO.annotation.shtml#script>

gaf-version: 2.0  
Project\_name: UniProt GO Annotation program (UniProt-GOA)  
URL: <http://www.ebi.ac.uk/GOA>  
Contact Email: [goa@ebi.ac.uk](mailto:goa@ebi.ac.uk)

Set up Library Generation from Pulsar

Choose settings for library generation.

Schemas  
BGS Factory Settings (d...)

BGS Factory Settings  
Tolerances  
Identification  
Protein Inference  
Spectral Library Filters  
Workflow  
iRT Calibration

Tolerance Parameters

Thermo IonTrap  
Calibration Search: Dynamic  
MS1 Correction Factor: 1  
MS2 Correction Factor: 1

Main Search  
MS1 Correction Factor: 1  
MS2 Correction Factor: 1

Thermo Orbitrap  
Calibration Search: Dynamic  
MS1 Correction Factor: 1  
MS2 Correction Factor: 1

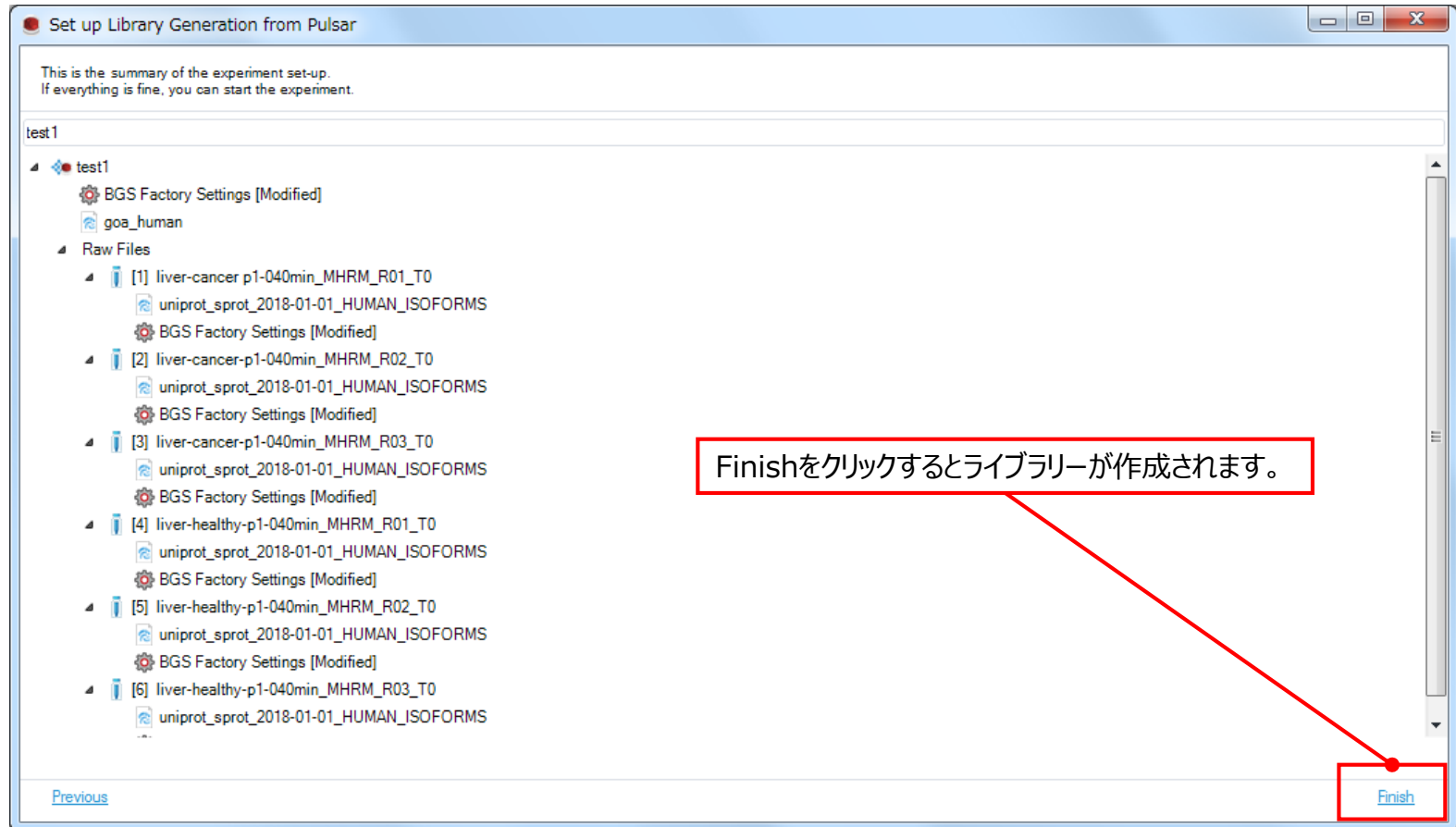
Main Search  
MS1 Correction Factor: 1  
MS2 Correction Factor: 1

TOF  
Calibration Search: Dynamic  
MS1 Correction Factor: 1  
MS2 Correction Factor: 1

Previous

Next Skip to Last

ここでは、PSM、ペプチド、およびタンパク質のFDR閾値などライブラリー作成に関する実験全体の設定が行えます。





The screenshot shows the Filgen software interface. At the top, there is a navigation bar with icons for Library, Analysis, Post Analysis, Report, QC, Pipeline, Databases, Settings, and About. The 'Analysis' icon is highlighted with a red box. Below the navigation bar, the main content area displays several options for setting up a DIA analysis:

- [Set up a DIA Analysis from File...](#)  
Start a classic DIA analysis using a targeted, library-based search.
- [Set up a directDIA Analysis...](#)  
Start a library-free DIA analysis using a protein database (FASTA) file as input.
- [Load a Spectronaut Experiment...](#)  
Open a previously saved Spectronaut experiment from a \*.SNE file.

Below these options is a section titled 'Recent Experiments'.

A red box highlights the 'Set up a DIA Analysis from File...' option, and a red arrow points from this box to a larger red box at the bottom of the slide containing the following text:

PerspectiveタブのAnalysis → 「Set up a DIA Analysis from File...」からライブラリーを使用するDIA解析が行えます。

# DIA解析 (Library-based)

The screenshot shows the 'Set up DIA Analysis' window. At the top, it says 'Specify all LC-MS/MS measurements that you want to include in this experiment and assign which spectral-libraries to use. Each run needs to have at least one spectral-library assigned in order to proceed.'

1. The text 'liver-healthy-p1-040' is entered in the top input field.

2. A list of files is shown under the folder 'liver-healthy-p1-040':  
[1] liver-cancer-p1-040min\_MHRM\_R01\_T0.htms  
[2] liver-cancer-p1-040min\_MHRM\_R02\_T0.htms  
[3] liver-cancer-p1-040min\_MHRM\_R03\_T0.htms  
[4] liver-healthy-p1-040min\_MHRM\_R01\_T0.htms  
[5] liver-healthy-p1-040min\_MHRM\_R02\_T0.htms  
[6] liver-healthy-p1-040min\_MHRM\_R03\_T0.htms

3. The 'Assign Spectral Library...' button is highlighted at the bottom.

1. 実験名を入力します。

2. 読み込んだDIAファイルが表示されます。

3. 「Assign Spectral Library...」からスペクトルライブラリーの選択を行います。

Next Skip to Last

The screenshot shows two overlapping windows. The top window, 'Choose Spectral Library', has a 'Browse...' button highlighted with a red box and the number 1. The bottom window, 'Set up DIA Analysis', has a list of files under the sample name 'liver-healthy-p1-040'. A blue box with the number 2 highlights this list. At the bottom right of the 'Set up DIA Analysis' window, a green box with the number 3 highlights the 'Next' and 'Skip to Last' buttons.

1. 「Browse...」から使用するライブラリーを指定します。

2. 読み込んだライブラリーがサンプル名の下に追加されます。

3. ライブラリーの追加が終われば「Next」で次へ進みます。

Set up DIA Analysis

Select the search and extraction settings schema for DIA analysis.

Schemas

- BGS Factory Setting...
- HCP Cleanup Profiling

▲ BGS Factory Settings

- Data Extraction
- XIC Extraction
- Calibration
- Identification
- Quantification
- Workflow
- Protein Inference
- Post Analysis
- Reporting

MS1 Mass Tolerance Strategy

Correction Factor

Dynamic

1

MS2 Mass Tolerance Strategy

Correction Factor

Dynamic

1

Previous

Next Skip to Last

ここでは、PSM、ペプチド、およびタンパク質のFDR閾値などライブラリー作成に関する実験全体の設定が行えます。

Select the protein databases you want to include in this DIA search. In order to use protein databases in your experiment you need to first import them as FASTA file in the Databases perspective.

From Spectral Library  
2 Files

- iRT  
11 Entries
- uniprot\_sprot\_2015-08-28\_HUMAN  
20,203 Entries

From Recent  
1 File

- uniprot\_sprot\_2018-01-01\_HUMAN\_ISOFORMS  
42,258 Entries

From Database  
1 File, 0 Folders

- uniprot\_sprot\_2018-01-01\_HUMAN\_ISOFORMS  
42,258 Entries - (12.9 MB)

Entries:  
Date Created:  
Date Modified:  
Original File Name:  
Organism:  
Protein Id:  
Description:

ここでは、データベースサーチに使用するFASTAファイルを選択します。

Search...  
[Import...](#)

[Previous](#) [Next](#) [Skip to Last](#)

Set up DIA Analysis

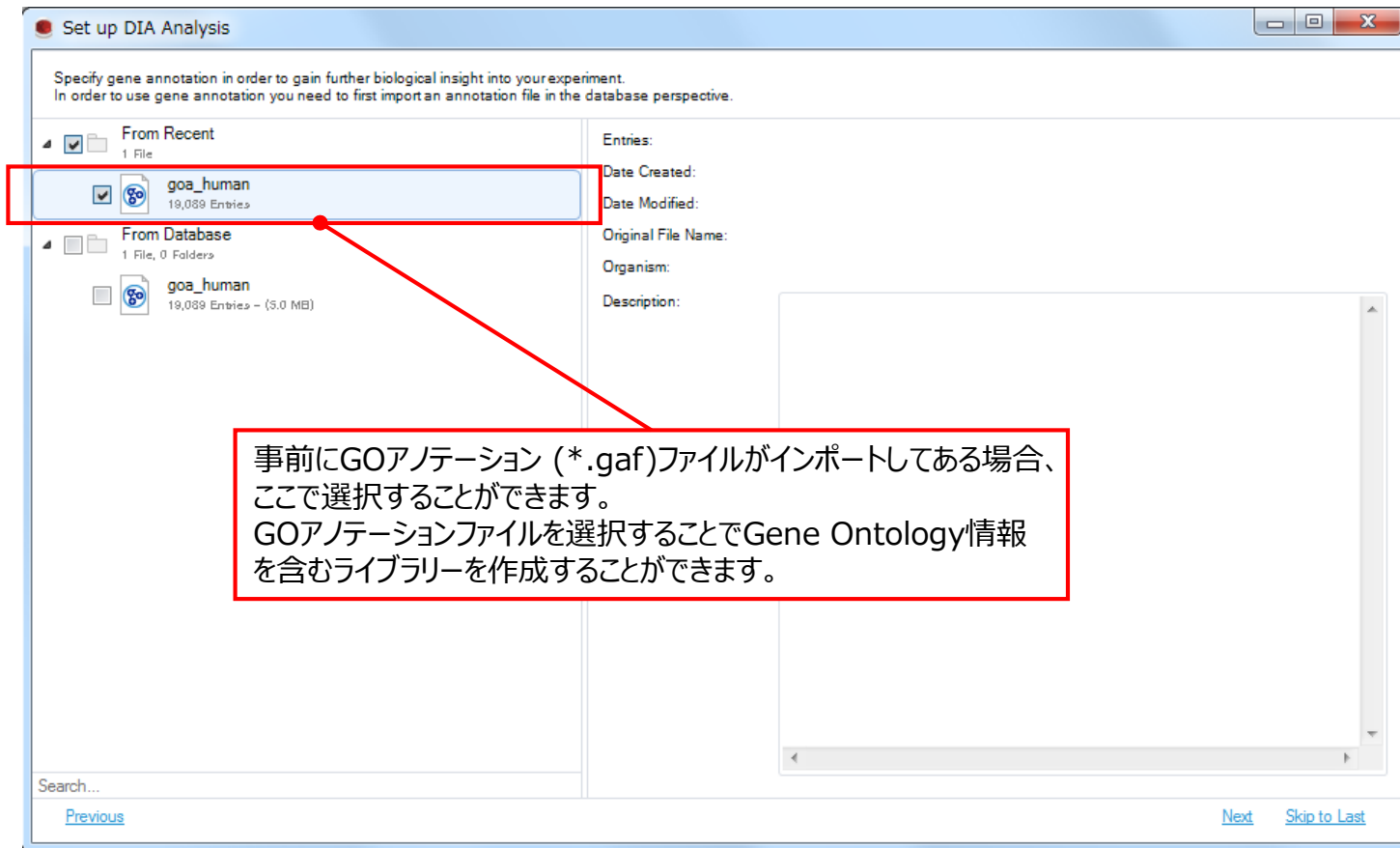
Specify conditions in order to perform statistical tests during post analysis.

#	Is Reference	Run Label	Condition	Fraction	Replicate	Quantity Correcti..	Label	Color	File Name
1	<input type="checkbox"/>	liver-cancer p1-0..	Cancer	NA	1	1	C1	Color [A=2..	liver-cancer p1-0..
2	<input type="checkbox"/>	liver-cancer-p1-0..	Cancer	NA	2	1	C1	Color [A=2..	liver-cancer-p1-0..
3	<input type="checkbox"/>	liver-cancer-p1-0..	Cancer	NA	3	1	C1	Color [A=2..	liver-cancer-p1-0..
4	<input checked="" type="checkbox"/>	liver-healthy-p1-0..	Healthy	NA	1	1	C2	Color [A=2..	liver-healthy-p1-0..
5	<input checked="" type="checkbox"/>	liver-healthy-p1-0..	Healthy	NA	2	1	C2	Color [A=2..	liver-healthy-p1-0..
6	<input checked="" type="checkbox"/>	liver-healthy-p1-0..	Healthy	NA	3	1	C2	Color [A=2..	liver-healthy-p1-0..

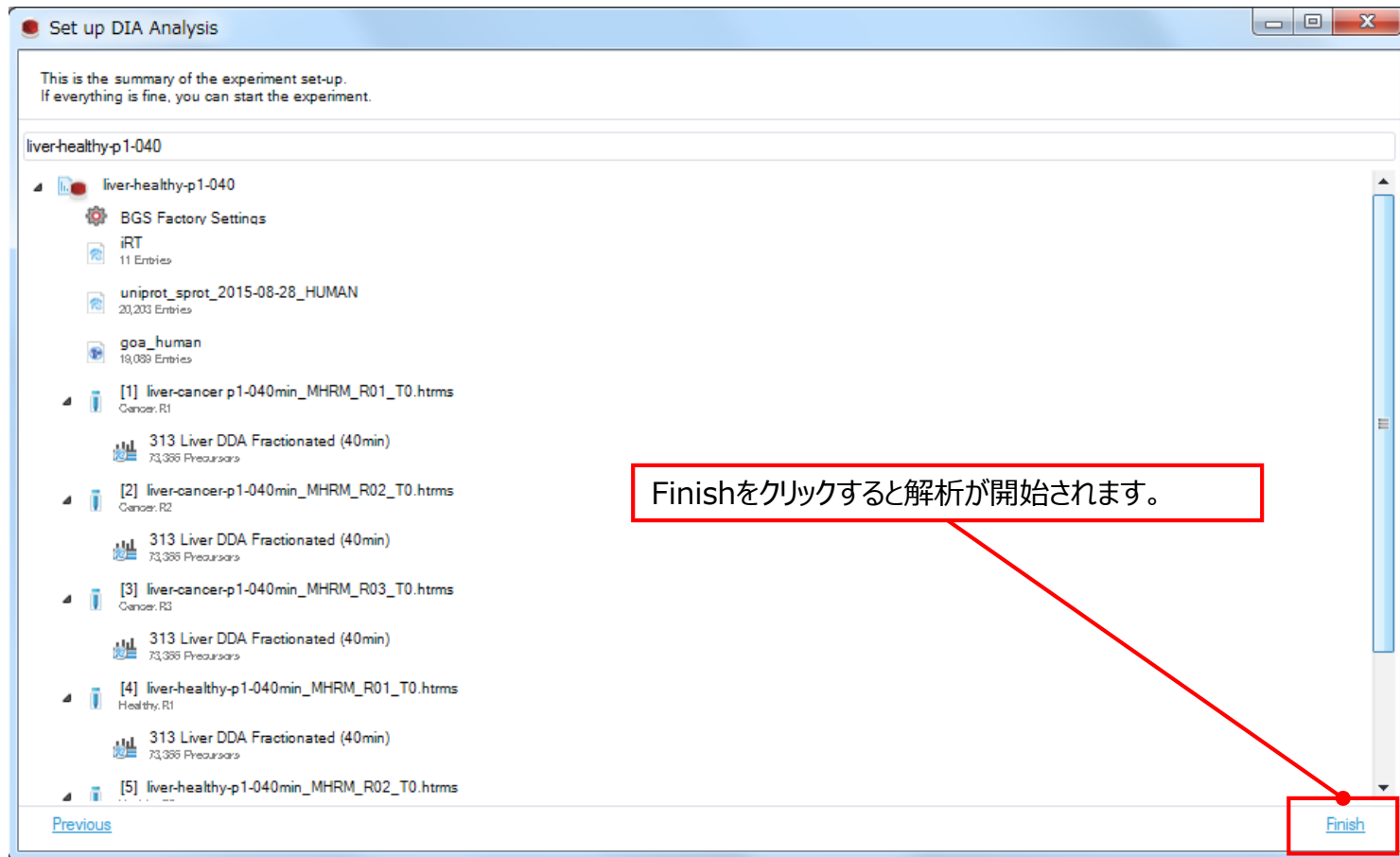
ここでは、統計処理を行うための条件を設定します。

[Import Condition Setup...](#) [Export Condition Setup...](#)

[Previous](#) [Next](#) [Skip to Last](#)

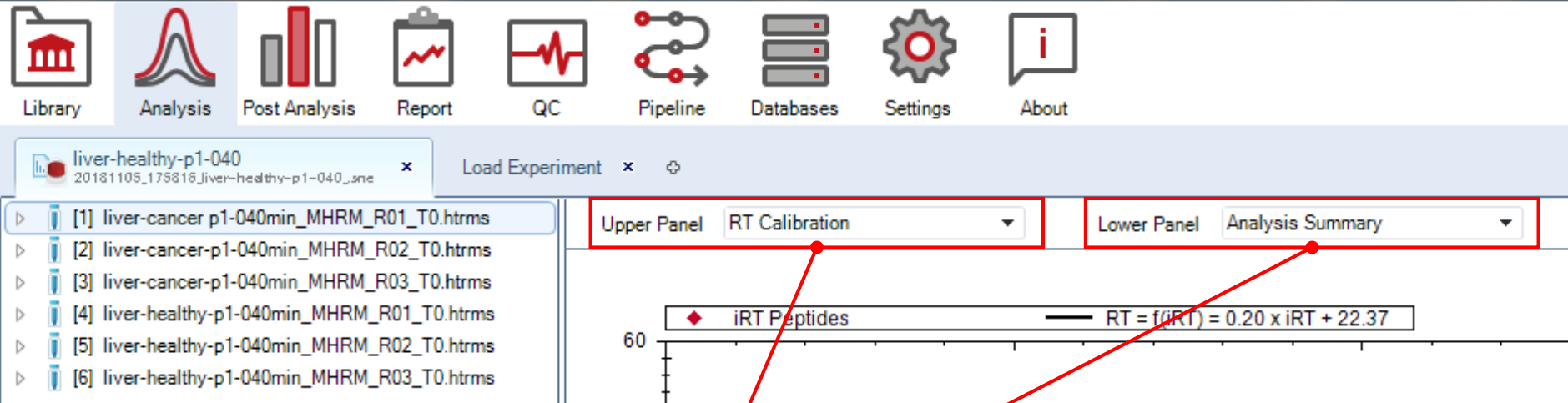


# DIA解析 (Library-based)





# 解析結果 (Analysis)



ダウンドロップリストからソフトウェア画面上段と下段に表示させるデータの種類を選択できます。

# 解析結果 (Analysis)

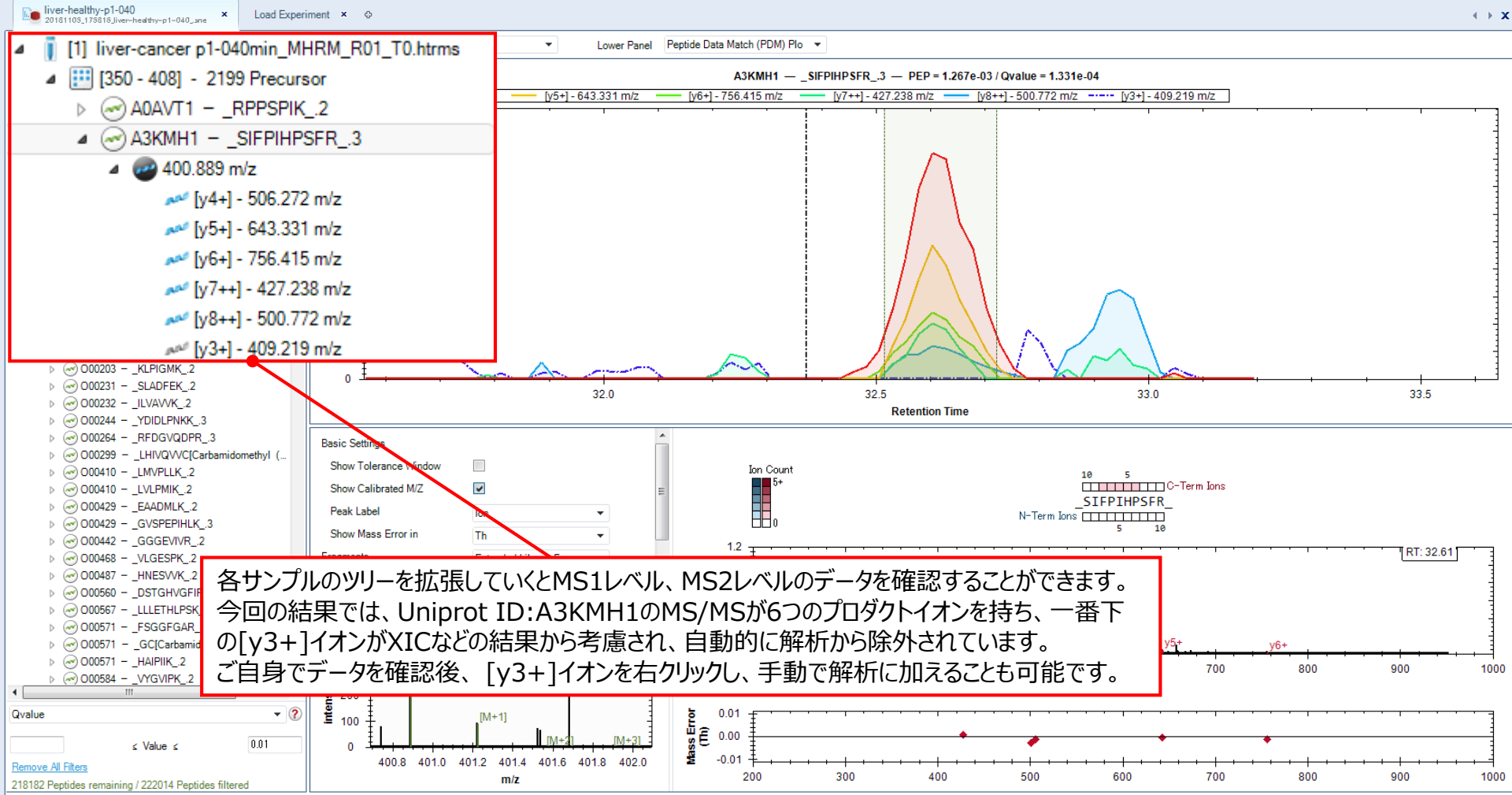
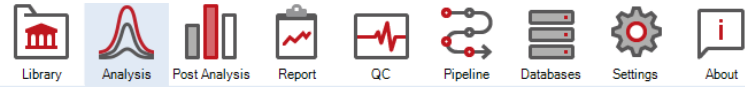
Parameter	Value
▶ Precursors	32,129 of 50,689 (73,366)
Modified Peptides	25,983 of 40,136 (57,975)
Peptides	25,317 of 38,764 (55,423)
Protein Groups	2,811 of 3,098
Proteins	2,854 of 3,154
Protein Inference	Unknown
AVG Peptides per Protein Group	10
AVG Precursor per Protein Group	13.2
AVG Missed Cleavages	0.3
% Missed Cleavages	26.2%
Median XIC Width	1.2 min
Median Absolute Delta iRT	0.34
MS1 Average Delta (ppm)	2.30
MS2 Average Delta (ppm)	4.75

Unique precursors: 50,689 of 73,366 | modified peptides: 40,136 of 57,975 | peptides: 38,764 of 55,423 | protein groups: 3,098 in the experiment (Qvalue <= 0.01)

画面右下には、実験全体の結果が表示されます。  
[of]で区切られた右側の数字はライブラリー内と実験内の両方を含めた数です。  
[of]で区切られた左側の数字は実験内のみの数です。

「Analysis Summary」では、サンプルごとの同定結果を確認することができます。  
カッコ内の数字はライブラリー内と実験内の両方を含めた数です。  
[of]で区切られた右側の数字は実験内のみの数です。  
[of]で区切られた左側の数字は選択された実験内のみの数です。

# 解析結果 (Analysis)



各サンプルのツリーを拡張していくとMS1レベル、MS2レベルのデータを確認することができます。今回の結果では、Uniprot ID:A3KMH1のMS/MSが6つのプロダクトイオンを持ち、一番下の[y3+]イオンがXICなどの結果から考慮され、自動的に解析から除外されています。ご自身でデータを確認後、[y3+]イオンを右クリックし、手動で解析に加えることも可能です。

# 解析結果 (Post Analysis)

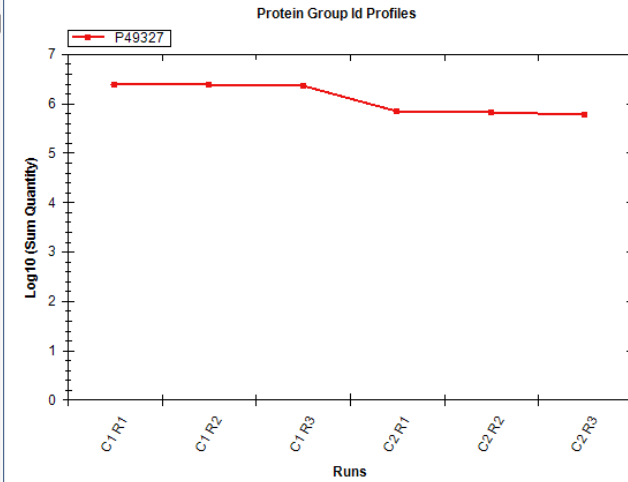


liver-healthy-p1-040

Analysis Overview

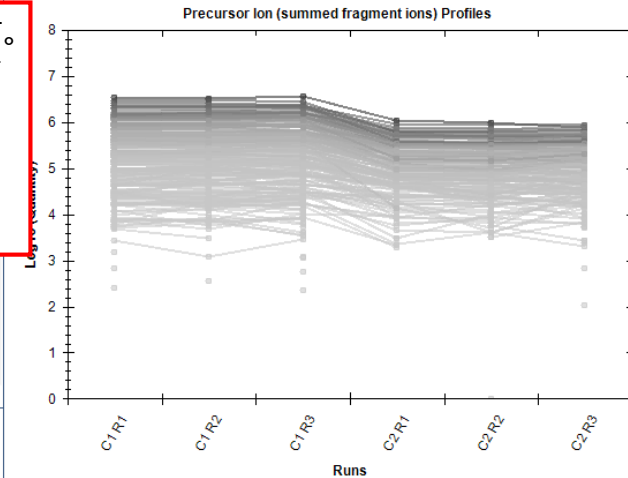
ProteinGroups AV

ProteinGroups	AV	Absolute AVG Log2 Ratio	Qvalue
Contains: Equ		GreaterThanOrEqu... 0.58	LessThanOrEqu... 0.05
P49327	-1.3	1.90622007393104	7.50411371740891E-232
P31327	0.0		
P02751	-3.4		
P21333	-1.1		
P98160	-2.06536440743...	2.06536440743055	1.23684504502916E-98
P35573	2.97997497878645	2.97997497878645	5.84420120132505E-84
P06737	3.00964362212629	3.00964362212629	2.55170396299769E-93
P00367	2.36419840783078	2.36419840783078	1.72556035579643E-82
P11586	1.49572362513...	1.49572362513252	7.29366887095162E-81
Q13576	1.54000347144...	1.54000347144714	4.35740036340655E-80
Q06278	1.32097796406...	1.32097796406202	6.8017953249957E-76
Q99798	-1.20371662747...	1.20371662747378	6.51982332387474E-73
P24752	2.64105971135...	2.64105971135333	1.39690655997579E-72
P42765	1.74629848336...	1.74629848336524	1.53556365766284E-67
Q16851	2.20157539314...	2.20157539314118	3.05070339490825E-67



Post AnalysisタブのCandidatesでは、自動的に有意差のある変動タンパク質群が抽出されます。デフォルトでは「Absolute AVG Log2 Ratio  $\geq 0.58$  かつ Qvalue  $< 0.05$ 」の条件を満たすタンパク質群が抽出されます。

「Absolute AVG Log2 Ratio  $\geq 0.58$ 」は、Ratioに置き換えると、およそ「Ratio  $\geq 1.5$ , Ratio  $\leq 0.66$ 」となります。



P02545	-0.77301846299...	0.773018462997989	3.10423346234462E-57	161	P02545	LMNA	Prelamin-A/C
P08238	-1.15579833093...	1.15579833093756	1.63795675647115E-56	146	P08238	HSP90AB1	Heat shock prote
P23378	3.1445333149665	3.1445333149665	9.23471959570272E-56	97	P23378	GLDC	Glycine dehydro
D11509	2.12444067172996	2.12444067172996	1.67119607172996E-55	107	D11509	CYP27A1	Cholesterol 24E

Export Table...  
Export Profile Plots...

# 解析結果 (Post Analysis)



liver-healthy-p1-040

Analysis Overview  
Overview  
Data Completeness

Group by: Comparison (condition 1 / condition 2) Namespace

Comparison No.	GO Name	GO Id	Representation	Pvalue	Fold Enrichment
Comparison (condition 1 / condition 2): Healthy / Cancer					
Namespace: Component					
1	membrane	GO:0016020	UnderRepresentation	0.003	0.463
1	mitochondrion	GO:0005739	OverRepresentation	0.022	0.676
1	plasma membrane	GO:0005886	UnderRepresentation	0.012	0.422
1	eukaryotic translation initiation factor 3 complex	GO:0005852	UnderRepresentation	0.001	0.676

Volcano Plot

1	focal adhesion	GO:0005925	UnderRepresentation	4.396E-04	0.439
1	proteasome complex	GO:0000502	UnderRepresentation	0.011	1.000
1	proteasome accessory complex	GO:0022624	UnderRepresentation	0.039	1.000
1	organelle membrane	GO:0031090	OverRepresentation	0.028	1.000
1	synapse	GO:0045202	UnderRepresentation	0.012	1.000
1	basement membrane	GO:0005604	OverRepresentation	0.006	1.000
1	cytosolic small ribosomal subunit	GO:0022627	UnderRepresentation	0.010	1.000

Export Table...

GO Enrichmentでは、変動のあったタンパク質群がどのような生物学的機能(GO Term)を有意に持っているかを確認することができます。

あらかじめ予測された頻度よりも、与えられたデータセットの方が頻度が多かった場合、有意確率(Pvalue)は小さくなり、有意な機能であるかどうかのチェックが行えます。デフォルトではPvalueは0.05でカットオフされます。



詳細は、以下サイトをご覧ください。

弊社Webサイト（Biognosysソフトウェア）：

<https://filgen.jp/Product/BioScience21-software/Biognosys/index.html#Pulsar>

弊社Webサイト（Biognosys試薬）：

<https://filgen.jp/Product/Bioscience4/Biognosys/index.html>

弊社Webサイト（Biognosys受託サービス）：

<https://filgen.jp/Product/BioScience22-MS/Biognosys/>

メーカーサイト：

<https://biognosys.com/>

お問い合わせ先: フィルジェン株式会社

TEL 052-624-4388 (9:00~17:00)

FAX 052-624-4389

E-mail: [biosupport@filgen.jp](mailto:biosupport@filgen.jp)