



## Volcano plot

まとめ、または図の補足説明

→ 3-1 (P.34～)

日本語マニュアルの該当ページ  
×対応するスライド番号

←スライド番号

1



# Scaffold 5 トレーニング資料



■ Scaffold5 何ができるか

■ データ取り込み

■ 表示画面について

■ Samples画面

■ Proteins画面

■ menu選択項目

■ Gene Ontology, Pathway

■ Spectral Counting, 検定

■ その他の表示画面

■ Viewer

## Scaffold 5 何ができるか

→ 1-1 (P.1～)

■ Scaffold5 何ができるか

■ データ取り込み

■ 表示画面について

■ Samples画面

■ Proteins画面

■ menu選択項目

■ Gene Ontology, Pathway

■ Spectral Counting, 検定

■ その他の表示画面

■ Viewer

1. 同定タンパク質リスト  
1サンプルずつ → 表形式にまとめる事ができる
2. Gene Ontology 情報 で 機能 / 発現位置 がより分かりやすく
3. Pathway 描写
4. 少しでも定量情報を → Spectral Counting の適用
5. Viewer で シェアが容易

2



# 同定タンパク質リスト 1サンプルずつ → 表形式にまとめ

## Scaffold5 何ができるか

- 検索結果のまとめ・比較
- Gene Ontology
- Pathway
- Spectral Counting
- Viewer
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology, Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- Viewer

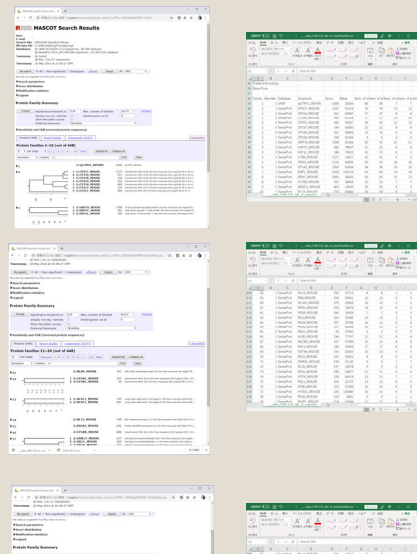
MASCOT Only

MASCOT + Scaffold

WT

KO\_1

KO\_2



**female-np female-p**

35	26	36
14	72	13
59		male-ns

Protein List (partial):

Accession	Protein Name	Molecular Weight	Protein Counting Availability
P02768	Albumin OS-Homo sapiens	66 kDa	1571 1250 1550
P02787	Serotransferrin OS-Homo s...	77 kDa	243 221 155
P01024	Complement C3 OS-Homo s...	187 kDa	158 81 84
P01009	Alpha-1-antitrypsin OS-H...	47 kDa	149 59 55
P06005	Immunoglobulin gamma-1 h...	49 kDa	108 63 39
P00015	Complement C4-B OS-Hom...	193 kDa	99 41 41
P00014	Complement C4-A OS-Hom...	193 kDa	98 39 39
P00450	Ceruloplasmin OS-Homo sa...	122 kDa	94 28 35
P10745	Retinol-binding protein 3 ...	135 kDa	
P01023	Alpha-2-macroglobulin OS...	163 kDa	
P00738	Haptoglobin OS-Homo sapi...	45 kDa	
P02774	Vitamin D-binding protein ...	53 kDa	
P02647	Apolipoprotein A-1 OS-Hom...	28 kDa	



# 同定タンパク質リスト フィルターリングも可能

## Scaffold5 何ができるか

- 検索結果のまとめ・比較
- Gene Ontology
- Pathway
- Spectral Counting
- Viewer
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology, Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- Viewer

**ペプチド同定基準**

Min # Peptides: 2 Peptide Threshold: (none)

リストにいないタンパク質を除去可

気になるタンパク質をチェックしておくことが可能

ペプチド本数

キーワードによるタンパク質 / ペプチド絞り込み選択

上記絞り込み条件に対応してリストがすぐに連動

各項目によるソート可能

Protein List (partial):

Accession	Protein Name	Molecular Weight	Protein Counting Availability
P02768	Albumin OS-Homo sapiens	66 kDa	1571 1250 1550
P02787	Serotransferrin OS-Homo s...	77 kDa	243 221 155
P01024	Complement C3 OS-Homo s...	187 kDa	158 81 84
P01009	Alpha-1-antitrypsin OS-H...	47 kDa	149 59 55
P06005	Immunoglobulin gamma-1 h...	49 kDa	108 63 39
P00015	Complement C4-B OS-Hom...	193 kDa	99 41 41
P00014	Complement C4-A OS-Hom...	193 kDa	98 39 39
P00450	Ceruloplasmin OS-Homo sa...	122 kDa	94 28 35
P10745	Retinol-binding protein 3 ...	135 kDa	
P01023	Alpha-2-macroglobulin OS...	163 kDa	
P00738	Haptoglobin OS-Homo sapi...	45 kDa	
P02774	Vitamin D-binding protein ...	53 kDa	
P02647	Apolipoprotein A-1 OS-Hom...	28 kDa	



### ■ Scaffold5 何ができるか

- 検索結果のまとめ・比較
- Gene Ontology
- Pathway
- Spectral Counting
- Viewer

### ■ データ取り込み

### ■ 表示画面について

### ■ Samples画面

### ■ Proteins画面

### ■ menu選択項目

### ■ Gene Ontology, Pathway

### ■ Spectral Counting, 検定

### ■ その他の表示画面

### ■ Viewer

# GO情報の表示 Gene Ontologyとは

各タンパク質について、以下の3種類の情報が定義されている

- Biological process
- Cellular component
- Molecular function

Biological Process	Cellular Comp.	Molecular Function
biological regulation		
cellular process		
developmental process		
immune system process		
localization		
locomotion		
metabolic process		
multi-organism process		
multicellular organismal process		
response to stimulus		
cytoplasm		
cytoskeleton		
intracellular organelle		
membrane		
organelle part		
plasma membrane		
binding		
catalytic activity		
transport		
molecular function		
molecular transducer activity		
motor activity		
structural molecule activity		

・知らないタンパク質についてわかりやすく知る事ができる  
 ・タンパク質の 機能/発現位置 の情報をまとめる事ができる



### ■ Scaffold5 何ができるか

- 検索結果のまとめ・比較
- Gene Ontology
- Pathway
- Spectral Counting
- Viewer

### ■ データ取り込み

### ■ 表示画面について

### ■ Samples画面

### ■ Proteins画面

### ■ menu選択項目

### ■ Gene Ontology, Pathway

### ■ Spectral Counting, 検定

### ■ その他の表示画面

### ■ Viewer

# GO情報の表示 タンパク質の機能/発現位置 がより分かりやすく

GO情報をまとめ  
カウントした  
円グラフ

同定リストと共に  
GO情報を表示

The screenshot shows the Scaffold5 interface with a protein list and a Gene Ontology (GO) summary. The protein list includes columns for Accession Number, Molecular Weight, Protein Grouping, and Ambiguity. The GO summary is divided into Biological Process, Cellular Comp., and Molecular Function. A pie chart is overlaid on the GO summary, showing the distribution of terms. A legend indicates the probability of terms: over 95% (green), 80% to 94% (yellow), 50% to 79% (orange), 20% to 49% (red), and 0% to 19% (dark red).

Biological Process	Cellular Comp.	Molecular Function	Int
developmental process			
anatomical structure development			
tissue development			
epidermis development			
multicellular organismal process			
multicellular organismal development			



### ■ Scaffold5 何ができるか

- 検索結果のまとめ・比較
- Gene Ontology
- Pathway
- Spectral Counting
- Viewer

### ■ データ取り込み

### ■ 表示画面について

### ■ Samples画面

### ■ Proteins画面

### ■ menu選択項目

### ■ Gene Ontology, Pathway

### ■ Spectral Counting, 検定

### ■ その他の表示画面

### ■ Viewer

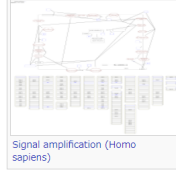
# Pathway 描写

## Find pathways

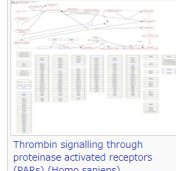
Search for:  ALL SPECIES Search

Tip: use AND, OR, \*, ?, parentheses or quotes

58 pathways found



Signal amplification (Homo sapiens)



Thrombin signalling through protease activated receptors (PARs) (Homo sapiens)



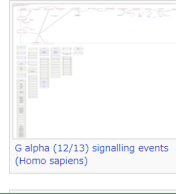
G-protein beta:gamma signalling (Homo sapiens)



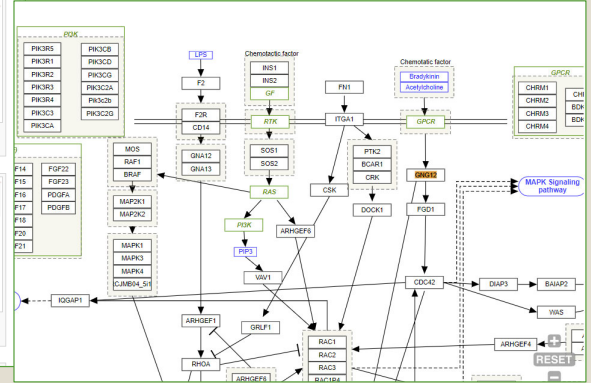
Activation of kainate receptors upon glutamate binding (Homo sapiens)



G alpha (z) signalling events (Homo sapiens)



G alpha (12/13) signalling events (Homo sapiens)



該当タンパク質を含む、登録パスウェイの一覧 (外部ページへのリンク)

パスウェイにおける、該当タンパク質の位置 (外部ページへのリンク)



### ■ Scaffold5 何ができるか

- 検索結果のまとめ・比較
- Gene Ontology
- Pathway
- Spectral Counting
- Viewer

### ■ データ取り込み

### ■ 表示画面について

### ■ Samples画面

### ■ Proteins画面

### ■ menu選択項目

### ■ Gene Ontology, Pathway

### ■ Spectral Counting, 検定

### ■ その他の表示画面

### ■ Viewer

# 定量情報 Spectral Counting プロテオミクス (DDA) の定量解析

## ■ Targeted

## ■ Untargeted

### □ labeled

- isotopic SILAC, AQUA etc.
- isobaric iTRAQ, TMT etc.

### □ non-labeled

- intensity based
- **spectral counting**



# 定量情報 Spectral Counting

## [Spectral Counting]

定量解析の実施は難しい

→ 簡便な指標として、「量が多いタンパク質は同定ペプチドも多く検出される」という経験則を出発点として考えられた定量指標

## [Quantitative value]

標準化アイデアのベースは、

- 「各サンプルの同定スペクトル数の総数は同じくらいの数になるはず」
- 実験誤差を吸収

Scaffold で採用している  
定量指標

#	Visible? Protein Starred?	Bio View: Identified Proteins (69)	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	female-np			female-p	male-ns
						female-np	female-p	male-ns	female-np	male-ns
1	✓	Alpha-amylase 1 precursor - Homo ... AMY1_HUMAN	68 kDa			16	23	20		
2	✓	Cystatin-S precursor - Homo sapie... CYTS_HUMAN	16 kDa			5	5	9		
3	✓	Mucin-5B precursor - Homo sapie... MUC5B_HUM.	590 kDa			13	37	37		
4	✓	Polymeric-immunoglobulin receptor ... PIGR_HUMAN	83 kDa			19	23	13		
5	✓	Lactotransferrin precursor - Homo ... TRFL_HUMAN	78 kDa			25	23	18		
6	✓	Cystatin-SN precursor - Homo sapi... CYTN_HUMAN	16 kDa			2	2	4		
7	✓	Serum albumin precursor - Homo sa... ALBU_HUMAN	69 kDa			15	17	24		
8	✓	Prolactin-inducible protein precurs... PIP_HUMAN	17 kDa			7	9	8		

Total Spectra
Total Spectra
Weighted Spectra
Average TIC
Total TIC
Top 3 TIC
Average Precursor Intensity
Total Precursor Intensity
Top 3 Precursor Intensity
emPAI
NSAF
iBAQ

各サンプルの同定スペクトル数(合計)

A B C

補正值(係数)

D/A D/B D/C

Average  
D

### ■ Scaffold5 何ができるか

- 検索結果のまとめ・比較
- Gene Ontology
- Pathway
- Spectral Counting
- Viewer
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology, Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- Viewer



# 無料のViewerで簡単にデータシェア

### ■ Scaffold5 何ができるか

- 検索結果のまとめ・比較
- Gene Ontology
- Pathway
- Spectral Counting
- Viewer
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology, Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- Viewer

Scaffold Q+S Evaluation - Samples - test

File Edit View Experiment Export Quant Window Help

Protein Threshold: (none) Min # Peptides: 2 Peptide Threshold: (none)

Display Options: Total Spectrum Count Req Mds: No Filter Search:

#	Visible? Protein Starred?	Bio View: Identified Proteins (382)	Accession Number	Alternate ID	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	WT	KO1	KO2
1	✓	Albumin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALB PE=1 SV=2	P02768	ALB	69 kDa		671	750	850
2	✓	Serotransferrin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TF PE=1 SV=3	P02787	TF	77 kDa		243	221	155
3	✓	Complement C3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C3 PE=1 SV=2	P01024	C3	187 kDa		158	81	84
4	✓	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	P01009	SER...	47 kDa		149	59	55
5	✓	Immunoglobulin gamma-1 heavy chain OS=Homo sapiens OX=9606 PE=1 SV=2	P0D0X5		49 kDa	*	108	63	39
6	✓	Complement C4-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4B PE=1 SV=2	P0C0L5	C4B	183 kDa	*	99	41	41
7	✓	Complement C4-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4A PE=1 SV=2	P0C0L4	C4A	193 kDa	*	98	39	39
8	✓	Ceruloplasmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CP PE=1 SV=1	P00450	CP	122 kDa	*	94	28	35
9	✓	Retinol-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBP3 PE=1 SV=2	P10745	RBP3	135 kDa		105	24	22
10	✓	Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=A2M PE=1 SV=3	P01023	A2M	163 kDa		70	30	35
11	✓	Haptoglobin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HP PE=1 SV=1	P00739	HP	45 kDa	*	53	25	40
12	✓	Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VDBP PE=1 SV=1	P00739	VDBP	45 kDa	*	53	25	40
13	✓	Apolipoprotein A-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOA1 PE=1 SV=1	P00739	APOA1	45 kDa	*	53	25	40

Protein Information: NCB (e.g. gl|351907|ALBU\_BO...)

Lookup Identifier In: P02768 ALB

382 Proteins at 0.0% Minimum 2 Min # Peptides 0.0% Prophet FDR 10828 Spectra at 0.0% Minimum 1.01% Prophet FDR

結果ファイルの取り込みはできませんが、

- 並べ替え
- フィルターリング
- タンパク質リストの整理
- ベン図、GO表示

など、取り込み以外はすべてできます。



■ Scaffold5 何ができるか

■ データ取り込み

- データ取り込みの概要
- データの階層構造
- dat ファイルの位置
- データ取り込み操作
- PASTAデータベースのセット

■ 表示画面について

■ Samples画面

■ Proteins画面

■ menu選択項目

■ Gene Ontology, Pathway

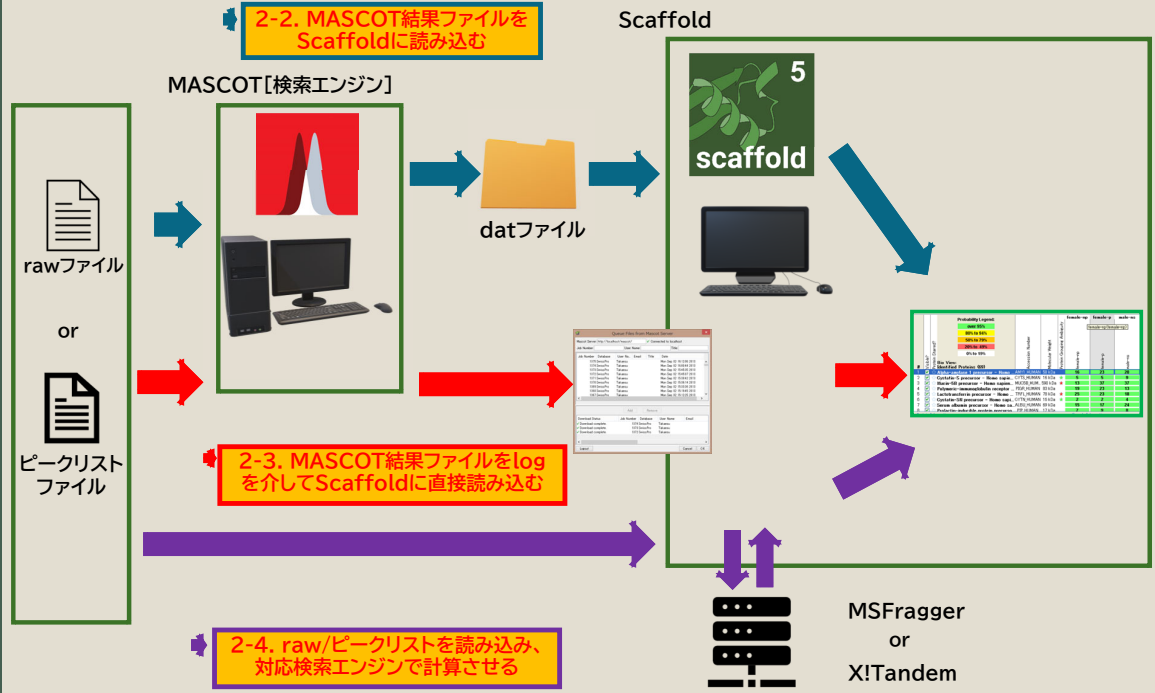
■ Spectral Counting, 検定

■ その他の表示画面

■ Viewer

# データ取り込み: データ取り込みの概要 1

→ 2-1 (P.4~)



■ Scaffold5 何ができるか

■ データ取り込み

- データ取り込みの概要
- データの階層構造
- dat ファイルの位置
- データ取り込み操作
- PASTAデータベースのセット

■ 表示画面について

■ Samples画面

■ Proteins画面

■ menu選択項目

■ Gene Ontology, Pathway

■ Spectral Counting, 検定

■ その他の表示画面

■ Viewer

# データ取り込み: データ階層構造

→ 2-1 (P.4~)

複数のdatをまとめたものが**Sample**、さらに複数の**Sample**をまとめたものが**Category**です。階層構造はデータ取り込み時に定義します。



Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	Int-1	Int-2	Un-1	Un-2
CH191 (F106230)	66 kDa	6	5	7	6	11
CH191 (F106230)	66 kDa	6	4	4	(0)	7
CH191 (F106231)	66 kDa	3	2	7	7	0
CH191 (F106232)	66 kDa	2	0	(0)	(0)	1
CH191 (F106234)	66 kDa	3	0	(0)	(0)	1
CH191 (F106235)	66 kDa	3	0	(0)	(0)	1
CH191 (F106236)	66 kDa	3	(0)	(0)	(0)	1

Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	Int-1	Int-2	Un-1	Un-2
CH191 (F106230)	66 kDa	6	5	7	6	11
CH191 (F106231)	66 kDa	6	4	4	(0)	7
CH191 (F106232)	66 kDa	3	2	7	7	0
CH191 (F106234)	66 kDa	2	0	(0)	(0)	1
CH191 (F106235)	66 kDa	3	0	(0)	(0)	1
CH191 (F106236)	66 kDa	3	(0)	(0)	(0)	1



# データ取り込み:datファイルの位置

■ Scaffold5 何が出来るか

## ■ データ取り込み

- データ取り込みの概要
- データの階層構造
- dat ファイルの位置
- データ取り込み操作
- PASTAデータベースのセット

■ 表示画面について

■ Samples画面

■ Proteins画面

■ menu選択項目

■ Gene Ontology,Pathway

■ Spectral Counting, 検定

■ その他の表示画面

■ Viewer

Submitted from 190628PASMCP X +

losगतos/mascot/cgi/master\_results\_2.pl?file=..%2Fdata%2F20191220%2FF001629.dat

Mascot search engi... Proteome Software... PassMark CPU Benc... 雨雲ス

**MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results**

User : takaesu  
E-mail :

**Search logの「Intermediate file」**

Job#	PID	dbase	User Name	Email	Intermediate file	Start time	Dur	Status
1384	5940	EST_huma	Monitor Test DB 1		/data/20090107/F001584.dat	Jan 07 15:36:41 2009	852	No ems setu
1383	2900	EST_huma	Monitor Test DB 0		/data/20090106/F001583.dat	Jan 06 23:55:24 2009	779	User mes
1382	2124	SwissPro			/data/20090106/F001582.dat	Jan 06 15:36:36 2009	8	User mes
1380	6008	SwissPro	HTakaesu		/data/20090106/F001580.dat	Jan 06 14:27:17 2009	99	User mes
1379	2716	SwissPro	HTakaesu		/data/20091217/F001576.dat	Dec 18 09:09:24 2008	840	No ems setu
1377	2380	SwissPro	HTakaesu		/data/20091217/F001577.dat	Dec 17 15:49:47 2008	5	User mes
1376	4332	SwissPro	HTakaesu		/data/20091217/F001576.dat	Dec 17 15:47:24 2008	8	User mes

**Daemonの「Result URL」**

Search	IP_Lh	Result URL	Start time
IP_Lh	IP_Lh	http://127.0.0.1/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20090410/F001377.dat	2009/04/20
IP_Lh	IP_Lh	http://127.0.0.1/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20090410/F001378.dat	2009/04/20
IP_Lh	IP_Lh	http://127.0.0.1/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20090410/F001390.dat	2009/04/20
IP_Lh	IP_Lh	http://127.0.0.1/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20090410/F001381.dat	2009/04/20



# データ取り込み: データ取り込み操作 ①

→ 2-2 (P.6~)

→ 2-3 (P.21~)

→ 2-4 (P.28~)

■ Scaffold5 何が出来るか

## ■ データ取り込み

- データ取り込みの概要
- データの階層構造
- dat ファイルの位置
- データ取り込み操作
- PASTAデータベースのセット

■ 表示画面について

■ Samples画面

■ Proteins画面

■ menu選択項目

■ Gene Ontology,Pathway

■ Spectral Counting, 検定

■ その他の表示画面

■ Viewer

Scaffold Q+S Evaluation - Load Data

**New ボタンを押し (またはCtrl+N) 取り込みを開始**

Scaffold Wizard

1. Welcome to Wizard  
2. Select Quantitative Technique  
3. Queue Files For Loading  
4. Add Another BioSample?  
5. Load and Analyze Data

Select Quantitative Technique

Choose Quantitative Technique:

- Spectral Counting (Standard)
- ITRAQ (4-plex)
- ITRAQ (8-plex)
- TMT (2-plex)
- TMT (6-plex)
- TMT (10-plex)
- TMT (11-plex)
- TMT (16-plex)
- Stable Isotope Labeling (Multiplex)
- Precursor Intensity (Standard)

New BioSample

1. Welcome to Wizard  
2. Select Quantitative Technique  
3. New BioSample  
4. Queue Files For Loading  
5. Add Another BioSample?  
6. Load and Analyze Data

Sample Name: Sample1  
Sample Category: Control  
Sample Description:

MUPRT Experiment (Combine Samples)

Sample Name, Category の欄を記入し「Next」ボタンを押します

定量データを含んでいない場合、「Spectral Conting(Standard)」を選択します。続いて「Next」ボタンを押します



# データ取り込み: データ取り込み操作 ②

→ 2-2 (P.6~)

→ 2-3 (P.21~)

→ 2-4 (P.28~)

■ Scaffold5 何が出来るか

## ■ データ取り込み

- データ取り込みの概要
- データの階層構造
- dat ファイルの位置
- データ取り込み操作
- FASTAデータベースのセット

■ 表示画面について

■ Samples画面

■ Proteins画面

■ menu選択項目

■ Gene Ontology, Pathway

■ Spectral Counting, 検定

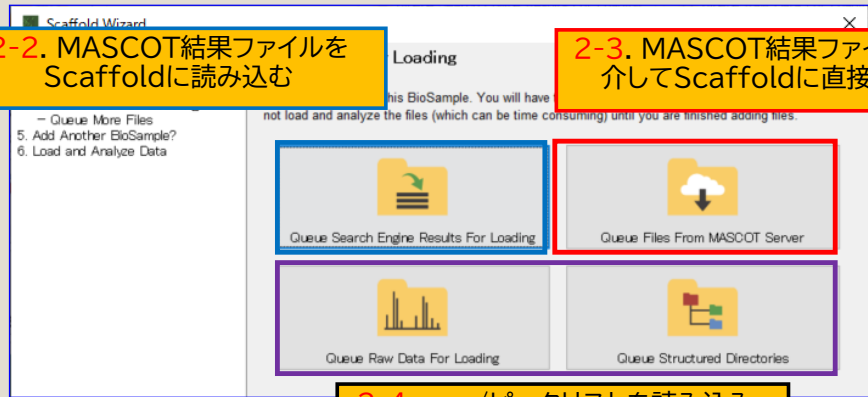
■ その他の表示画面

■ Viewer

Scaffold でデータ取り込み時に  
選択肢が現れます

2-2. MASCOT結果ファイルを  
Scaffoldに読み込む

2-3. MASCOT結果ファイルをlogを  
介してScaffoldに直接読み込む



2-4. raw/ピークリストを読み込み、  
対応検索エンジンで計算させる



# データ取り込み: データ取り込み操作 ③

→ 2-2 (P.6~)

→ 2-3 (P.21~)

→ 2-4 (P.28~)

■ Scaffold5 何が出来るか

## ■ データ取り込み

- データ取り込みの概要
- データの階層構造
- dat ファイルの位置
- データ取り込み操作
- FASTAデータベースのセット

■ 表示画面について

■ Samples画面

■ Proteins画面

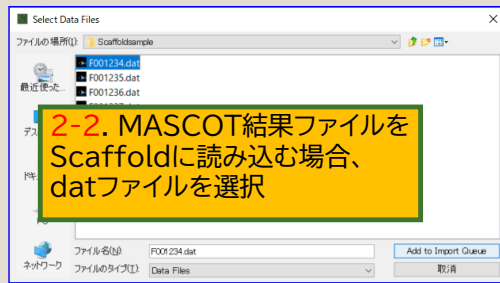
■ menu選択項目

■ Gene Ontology, Pathway

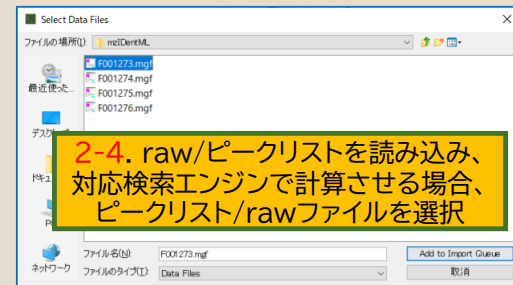
■ Spectral Counting, 検定

■ その他の表示画面

■ Viewer

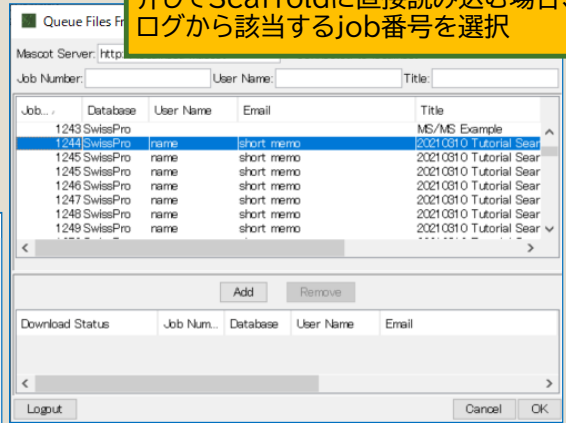


2-2. MASCOT結果ファイルを  
Scaffoldに読み込む場合、  
datファイルを選択



2-4. raw/ピークリストを読み込み、  
対応検索エンジンで計算させる場合、  
ピークリスト/rawファイルを選択

2-3. MASCOT結果ファイルをlogを  
介してScaffoldに直接読み込む場合、  
ログから該当するjob番号を選択







# データ取り込み: データ取り込み操作 ④

→ 2-2 (P.6~)

→ 2-3 (P.21~)

→ 2-4 (P.28~)

■ Scaffold5 何ができるか

## ■ データ取り込み

- データ取り込みの概要
- データの階層構造
- dat ファイルの位置
- データ取り込み操作
- FASTAデータベースのセット

■ 表示画面について

■ Samples画面

■ Proteins画面

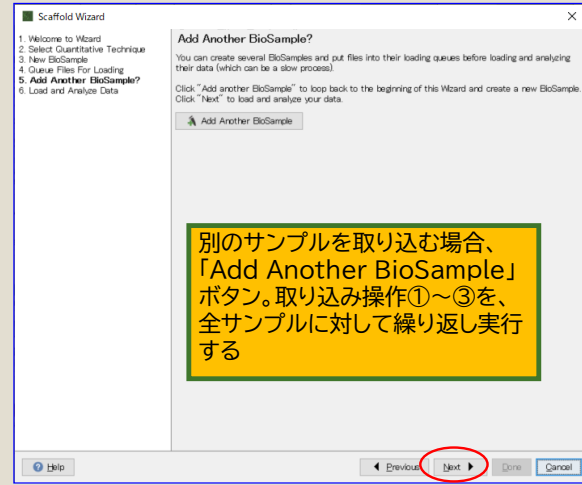
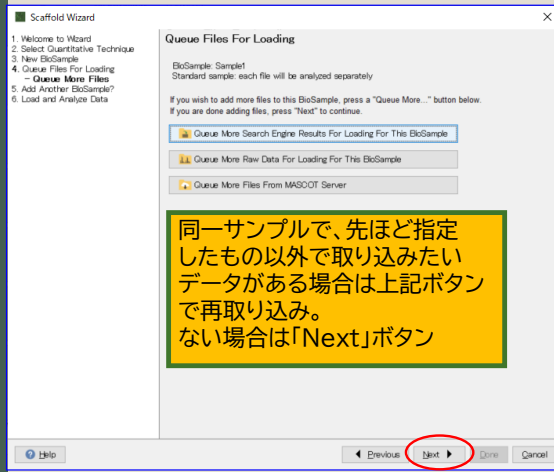
■ menu選択項目

■ Gene Ontology, Pathway

■ Spectral Counting, 検定

■ その他の表示画面

■ Viewer



# データ取り込み: データ取り込み操作 ⑤

→ 2-2 (P.6~)

→ 2-3 (P.21~)

→ 2-4 (P.28~)

■ Scaffold5 何ができるか

## ■ データ取り込み

- データ取り込みの概要
- データの階層構造
- dat ファイルの位置
- データ取り込み操作
- FASTAデータベースのセット

■ 表示画面について

■ Samples画面

■ Proteins画面

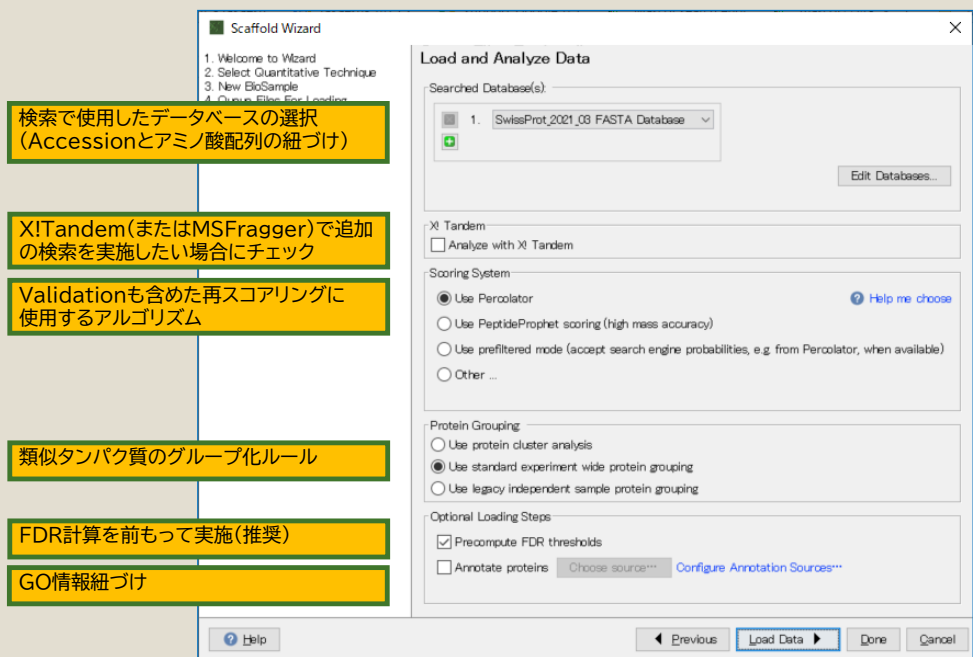
■ menu選択項目

■ Gene Ontology, Pathway

■ Spectral Counting, 検定

■ その他の表示画面

■ Viewer





■ Scaffold5 何が出来るか

■ データ取り込み

- データ取り込みの概要
- データの階層構造
- .dat ファイルの位置
- データ取り込み操作
- FASTAデータベースのセット

■ 表示画面について

■ Samples画面

■ Proteins画面

■ menu選択項目

■ Gene Ontology, Pathway

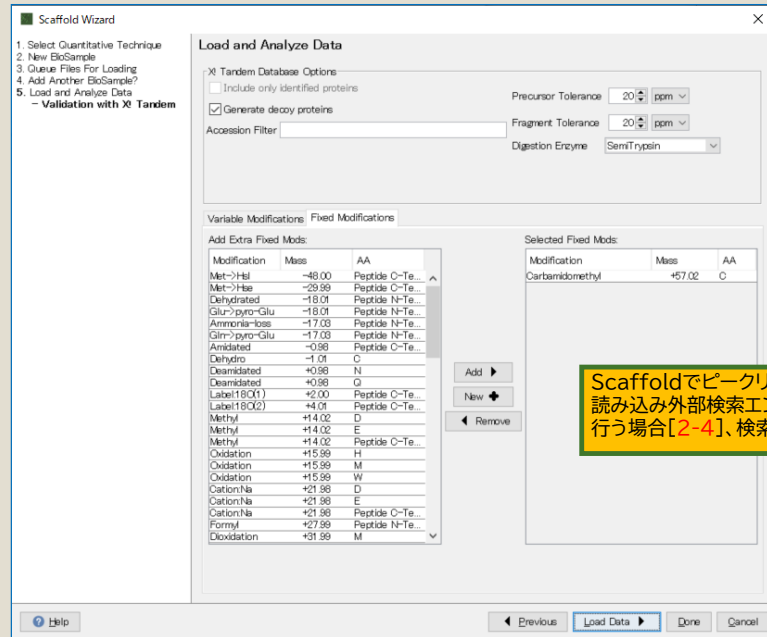
■ Spectral Counting, 検定

■ その他の表示画面

■ Viewer

# データ取り込み: データ取り込み操作 ⑥

→ 2-4 (P.28~)



Scaffoldでピークリスト/RAWファイルを読み込み外部検索エンジンへの橋渡しも行う場合[2-4], 検索パラメータを指定



■ Scaffold5 何が出来るか

■ データ取り込み

- データ取り込みの概要
- データの階層構造
- .dat ファイルの位置
- データ取り込み操作
- FASTAデータベースのセット

■ 表示画面について

■ Samples画面

■ Proteins画面

■ menu選択項目

■ Gene Ontology, Pathway

■ Spectral Counting, 検定

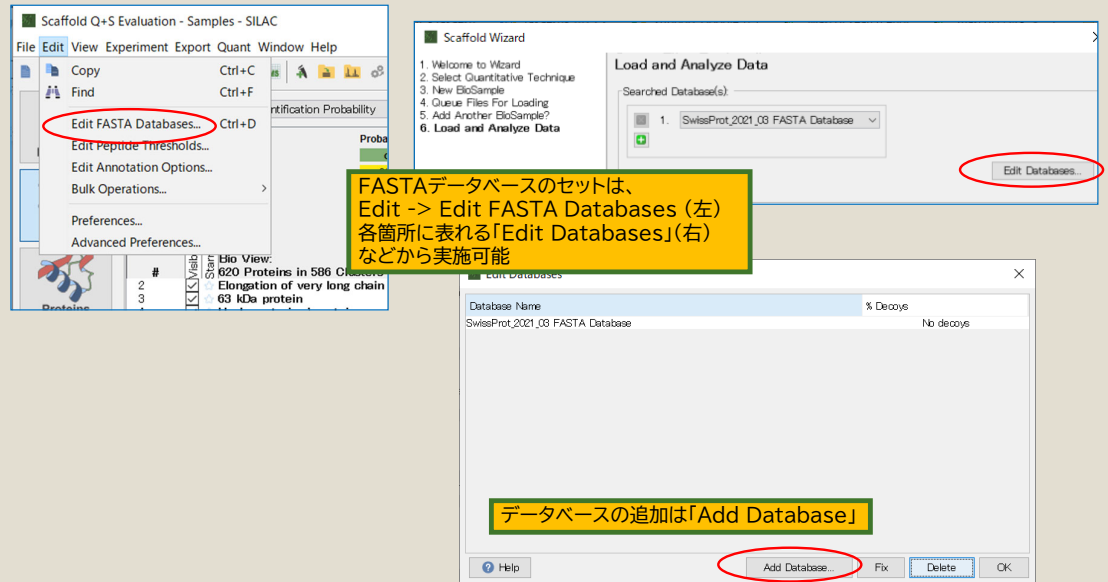
■ その他の表示画面

■ Viewer

# データ取り込み: FASTAデータベースのセット ①

→ 2-5 (P.37~)

Accessionからタンパク質の配列を探してきてScaffold 内に取り込ませるため、検索で使ったデータベースをScaffold上で登録する必要があります。



FASTAデータベースのセットは、Edit -> Edit FASTA Databases (左) 各箇所に表れる「Edit Databases」(右) などから実施可能

データベースの追加は「Add Database」



# データ取り込み: FASTAデータベースのセット ②

■ Scaffold5 何ができるか

■ **データ取り込み**

- データ取り込みの概要
- データの階層構造
- dar ファイルの位置
- データ取り込み操作

- **FASTAデータベースのセット**

■ 表示画面について

■ Samples画面

■ Proteins画面

■ menu選択項目

■ Gene Ontology, Pathway

■ Spectral Counting, 検定

■ その他の表示画面

■ Viewer

1. 「Add Database」

2. FASTAファイルを選択

3. Accession, DescriptionをFASTAファイルから認識し情報を抜き出す処置の方法を選択。こたわりがない場合、「Auto Parse」を選択

4. 「リストに新たなデータベースが追加される



# 表示画面について

■ Scaffold5 何ができるか

■ データ取り込み

■ **表示画面について**

■ Samples画面

■ Proteins画面

■ menu選択項目

■ Gene Ontology, Pathway

■ Spectral Counting, 検定

■ その他の表示画面

■ Viewer

Scaffold5がもつ各種機能の画面が「View」。パネルをクリックすると画面が切り替わります

- Load Data
- Samples [Default]
- Proteins
- Similarity
- Quantify
- Publish
- Statistics

Accession Number	Alternate ID	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity		
			WT	KO1	KO2
P02768	ALB	69 kDa	671	750	650
P02787	TF	77 kDa	243	224	155
P01024	C3	187 kDa	158	81	84
P01009	SER...	47 kDa	149	59	55
P00025		49 kDa	108	63	39
P00015	C4B	193 kDa	99	41	41
P00014	C4A	183 kDa	98	39	39
P00450	CP	122 kDa	94	28	35
P10745	RBP3	135 kDa	105	24	22
P01023	A2M	163 kDa	70	30	35
P00730	HP	45 kDa	52	36	40
P02774	GC	53 kDa	60	28	25
P02647	APOA1	31 kDa	46	30	36
P01859	IGHG2	96 kDa	45	36	27
P01011	SER...	46 kDa	53	24	30
P01960	IGHB3	41 kDa	38	39	30
P00751	CFB	86 kDa	47	25	28
P02766	TTR	16 kDa	48	29	21
P00747	PLG	81 kDa	41	26	26
P02780	HPX	52 kDa	53	20	19



- Scaffold5 何かできるか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology, Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- Viewer

# Samples画面

→ 3-1 (P.41~)

**The Display pane**  
Samples table で表示する数値の設定  
→ 3-2-1(P.43)

**Filtering Samples**  
表示タンパク質 / ペプチドの絞り込み条件  
→ 3-2-2(P.45)

**Display Options**  
Total Spectrum Count  
→ 3-2-3(P.47)

**Samples Table**  
同定タンパク質情報

**Information Pane**  
類似タンパク質、GO/Pathway の階層/リスト情報など  
→ 3-2-4(P.49)

同定されたタンパク質の一覧、Gene Ontologyなどタンパク質の関連情報が表示

解析結果の概要を確認する上で主体となる 画面

Protein ID	Protein Name	Accession	MW (kDa)	pI	Abundance
P02768	ALB	69	67.1	7.00	850
P02767	TF	77	243	221	155
C3	C3	187	158	81	84
P01009	SER...	47	149	59	55
P00305	SER...	49	168	83	39
P00015	C4B	193	99	41	41
P00014	C4A	193	98	39	39
P00450	CP	122	84	28	35
P10745	RBP3	135	105	24	22
P01023	A2M	163	70	30	35
P00738	HP	45	52	36	40
P02774	GC	53	60	28	25
P02647	APOA1	31	46	30	36
P01859	IGH2	35	45	36	27
P01011	SER...	49	53	24	36
P01860	IGH3	41	38	39	30
P00751	CFB	89	47	25	28
P02766	TTR	16	48	28	21
P00747	PLG	91	41	26	26

# 表示される数値 [Display Options]

→ 3-2-1 (P.43~)

Display Options:

- Total Spectrum Count
- Protein Identification Probability
- Percent Coverage
- Percentage of Total Spectra
- Exclusive Unique Peptide Count
- Exclusive Unique Spectrum Count
- Exclusive Spectrum Count
- Total Spectrum Count
- Quantitative Value

## Protein Identification Probability

タンパク質の同定確率 (Protein prophetで計算)

## Percent Coverage

タンパク質全長 (残基長) に対し、アサインされたペプチド残基数の割合

## Percentage of Total Spectra

サンプル内全スペクトルに対して、タンパク質にアサインされたスペクトル数の割合

## Exclusive と Total

**Exclusive** : 該当タンパク質のみに存在するペプチド / スペクトル

**Total** : Exclusive + シェアペプチド / スペクトル

## Unique peptides / Unique spectra / Spectrum

**Unique peptides** : タンパク質にアサインされたペプチド数。修飾のあるなし、電荷の総意に関係なく同じ配列のペプチドは1つにまとめてカウント

**Unique Spectra** : Unique peptides と似ているが、電荷/修飾の違うペプチドは別にカウント

**Spectrum** : まとめる処理をしない



# Proteins 画面

→ 6-1 (P.81~)

■ Scaffold5 何が出来るか

■ データ取り込み

■ 表示画面について

■ Samples画面

■ Proteins画面

■ menu選択項目

■ Gene Ontology, Pathway

■ Spectral Counting, 検定

■ その他の表示画面

■ Viewer

ペプチド/タンパク質の定性結果をより詳細に検証

Sample画面でタンパク質をダブルクリックするか、タンパク質を選択状態で左フレーム「Proteins」をクリックすると表示

**Proteins Pane** → 6-2(P.82)

**Peptides pane** → 6-3(P.83)

**Spectrum Pane** → 6-4(P.86)

27

# Proteins pane, Peptide Pane 拡大

Sequence Coverage	Protein	Accession	Category	Bio Samp...	Prob	%Spec	#Pep	#Uni...	#Spec	%Cov	m.w.
	Keratin, ty...	gi 547749	Int	Int-1	100%	3.5%	9	11	17	13%	60 kDa
	Keratin, ty...	gi 547749	Int	Int-2	100%	3.9%	10	10	16	16%	60 kDa
	Keratin, ty...	gi 547749	Un	Un-1	100%	2.8%	6	6	8	8.6%	60 kDa
	Keratin, ty...	gi 547749	Un	Un-2	100%	0.53%	1	1	1	1.7%	60 kDa

Proteins Pane (画面左上)  
同定タンパク質の情報 [各サンプル別]

→ 6-2(P.82)

Valid ...	Sequence	Prob	Masc...	Masc...	Masc...	NTT	Modifications	Observed	Actual M...	Char...	Delta...	Delta...	Ret...	Intensity	TIC	Start	Stop	# Ot...	Other Pr...	Spectrum ID
✓	(K)GSLGGGFSGGFSGGFS	100%	144.0	46.7	0.0	2		854.39	1,708.77	2	0.00059	0.34		5008	5008	41	59	0		Sum of 3 scan...
✓	(K)GSLGGGFSGGFSGGFS	100%	124.2	46.7	0.0	2		854.40	1,708.78	2	0.016	9.2		7500	7500	41	59	0		Sum of 3 scan...
✓	(K)VTMQLNDR(L)	98%	53.9	47.6	0.0	2		545.79	1,089.57	2	0.044	4.0		8194	8194	148	156	0		Sum of 3 scan...
✓	(K)VTMQLNDR(L)	96%	48.9	47.3	0.0	2	Oxidation (+16)	553.78	1,105.55	2	0.027	2.4		1764	1764	148	156	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)ALEESNYELGK(I)	100%	83.7	46.8	0.0	2		691.32	1,380.63	2	-0.016	-1.1		9483	9483	166	177	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)ALEESNYELGK(I)	100%	74.6	46.8	0.0	2		691.32	1,380.63	2	-0.092	-6.7		44390	44390	166	177	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)LYENEVALR(Q)	99%	63.8	47.2	0.0	2		617.82	1,233.62	2	-0.062	-4.2		30440	30440	236	245	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)LYENEVALR(Q)	96%	48.2	47.2	0.0	2		617.83	1,233.64	2	-0.028	-2.2		4331	4331	236	245	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)LYENEVALR(Q)	96%	48.3	47.3	0.0	2		497.29	992.56	2	0.066	6.6		3751	3751	238	245	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)MLDELTLTK(A)	99%	59.5	47.3	0.0	2		516.30	1,030.59	2	-0.000...	-0.73		25690	25690	258	266	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)MLDELTLTK(A)	98%	55.9	47.3	0.0	2		516.30	1,030.59	2	-0.035	-3.4		7787	7787	258	266	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	71.9	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	-0.028	-2.0		22940	22940	323	333	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	63.8	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		5461	5461	323	333	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		2656	2656	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063	323	334	0		Sum of 3 scan...
✓	(R)SDYQLAEQNR(K)	100%	60.6	46.8	0.0	2		683.31	1,364.60	2	0.014	1.0		6063	6063					



- Scaffold5 何ができるか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology, Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- Viewer

# menu選択項目 ①

→ 4-1 (P.52~)

**File**  
解析ファイルの作成、  
セーブなど

New	Ctrl+N
Batch Job Queue...	Ctrl+J
Open	Ctrl+O
Merge...	Ctrl+M
Close	
Save	Ctrl+S
Save As...	
Save Condensed Data...	Ctrl+T
Print...	Ctrl+P
Print Preview...	
Exit	

→ P.52

Save → P.56

Merge → P.57

**Edit**  
Scaffold 設定の変更、  
データベースやGO、Pathway  
に関する設定など

Copy	Ctrl+C
Find	Ctrl+F
Edit FASTA Databases...	Ctrl+D
Edit Peptide Thresholds...	
Edit Annotation Options...	
Bulk Operations...	>
Preferences...	
Advanced Preferences...	

→ P.52

Edit Annotation Options → P.59,69

Preference → P.66

Advanced Preference → P.68

**View**  
Samples画面の表示内容に  
関する切り替えなど

<input checked="" type="checkbox"/> Navigation Pane	Ctrl+0
Switch Sample View	>
Switch Display Options	>
Show Entire Protein Clusters	
<input checked="" type="checkbox"/> Show Lower Scoring Matches	
<input checked="" type="checkbox"/> Show <5% Probabilities	
<input checked="" type="checkbox"/> Show Sample Notes	
Show Hidden Proteins	
<input checked="" type="checkbox"/> Show Alternate ID	
<input checked="" type="checkbox"/> Show GO Annotations	
Navigate	>

→ P.53



- Scaffold5 何ができるか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology, Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- Viewer

# menu選択項目 ②

→ 4-1 (P.53~)

**Experiment**  
データの紐づけ/階層構造、  
validation設定や検定など

Edit Experiment...	
Edit BioSample...	Ctrl+E
Add BioSample...	Ctrl+B
Delete Biological Sample	
Queue Search Engine Results For Loading	Ctrl+R
Queue Raw Data For Loading	
Queue Files From MASCOT Server...	Ctrl+L
Queue Structured Directories For Loading...	
Apply New Database...	
Extract Alternate IDs...	
Apply Protein Annotation Preferences...	
Load and Analyze Queue	Ctrl+A
Reset Peptide Validation...	
Add or Edit Annotations...	
Quantitative Analysis...	

→ P.53

**Export**  
解析結果のファイル出力

Subset Database...	
Spectra...	
BLIB...	
ProtXML...	
mzIdentML...	
SFDB...	
Scaffold Batch...	
Scaffold Batch Archive...	
<input checked="" type="checkbox"/> Publication Report...	
<input checked="" type="checkbox"/> Samples Report...	
<input checked="" type="checkbox"/> Spectrum Reports	>
<input checked="" type="checkbox"/> Peptide Reports	>
<input checked="" type="checkbox"/> Protein Reports	>
PSEA-Quant Report...	
<input checked="" type="checkbox"/> Current View...	
<input checked="" type="checkbox"/> Complete...	

→ P.54



# menu選択項目 ③

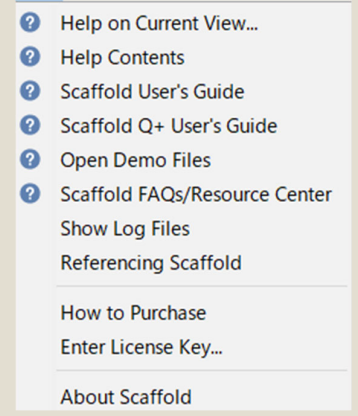
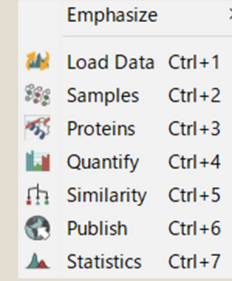
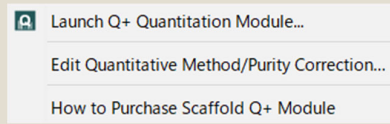
→ 4-1 (P.54~)

- Scaffold5 何が出来るか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology, Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- Viewer

**Quant**  
Q+/Q+Sモジュールへの切替

**Window**  
View 画面の切替

**HELP**  
各種HELPページ、デモファイル、licenseに関する情報



→ P.54

→ P.54

→ P.55



# Gene Ontologyの設定 GOAファイルのセット

→ 4-5 (P.59~)

Gene Ontology 情報を利用するためには、ローカルにファイルをダウンロード・セットする必要があります

- Scaffold5 何が出来るか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology, Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- Viewer

**1. Menu Edit**  
-> Edit Annotation Options

**2. Add**

**3-a. ファイル取得も同時に行う場合**  
「Source」でターゲットの生物種を選択すると、GOAファイルを取得しScaffold 用に変換したデータベースを作成します

**3-b. 予めファイル取得を行う場合**  
「Source」で「Other File」を選択し、予めダウンロード・解凍しておいたgafファイルを選択





- Scaffold5 何が出来るか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- **Gene Ontology, Pathway**
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- Viewer

# Gene Ontologyの設定 自動選択による表示項目の選定

→ 4-5 (P.59~)

表示するGene Ontology 項目の最適な組み合わせでの選定を、PSEA Quant というプログラムを使って自動で行う場合

**1. Menu Experiment  
-> Add or Edit Annotations**

**2. PSEA-Quantによる自動選定を行う場合**  
「Annotation Source」で「GO Terms」を選択します。  
また、「Displayed Annotation Selection」で「Automatically select with a PSEA-Quant analysis」を選択します。  
選択後、「OK」ボタンを押します

**3. PSEA-Quant 解析のパラメータを選択し、「Apply」を押します**



- Scaffold5 何が出来るか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- **Gene Ontology, Pathway**
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- Viewer

# Gene Ontologyの設定 手動選択による表示項目の選定

→ 4-5 (P.59~)

表示するGene Ontology 項目の選定を手動で行う場合

**1. Menu Experiment  
-> Add or Edit Annotations**

**2. 手動選定を行う場合**  
「Annotation Source」で「GO Terms」を選択します。  
また、「Displayed Annotation Selection」で「Manually select」を選択します。  
選択後、「OK」ボタンを押します

**3. 上段がGOリスト、下段が「Selected GO Terms」が選択項目です。「Add」または「Remove」で選択項目を調整します。選択後、ダイアログ最下部の「Select」ボタンを押します。**



# Gene Ontology 情報の表示

- Scaffold5 何が出来るか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- **Gene Ontology, Pathway**
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- Viewer

Probability Legend:  
 over 95%  
 80% to 94%  
 50% to 79%  
 20% to 49%  
 0% to 19%

Display Options: Exclusive Spectrum Count    Req Mods: No Filter    Search:

Biological Process    Cellular Comp.    Molecular Function    Int

Selected GO information is displayed on the Samples screen.

Information panel displays the hierarchical structure of GO for the selected protein.



# Pathwayの設定 : ID

→ 4-8-1 (P.69~)

Pathway情報を利用するためには、タンパク質の特定情報 (ID)に気を付ける必要があります

- Scaffold5 何が出来るか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- **Gene Ontology, Pathway**
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- Viewer

WikiPathways		Reactome
“gene name”が必要	ID	Uniprotの”Accession”が必要 × ALBU_BOVIN ○ P02769
“gene name”情報を後から追加・表示する事が可能 [menu] Experiment -> Extract Alternate IDs	対処法	最初からUniprotのAccession が定義されたデータベースで検索を実行する必要がある



# Pathway表示のための操作

→ 4-8-2 (P.69~)

Pathway情報の表示項目選択はGO同様自動選択と手動選択があります

- Scaffold5 何かができるか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology, Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- Viewer

1. Menu Experiment  
-> Add or Edit Annotations

2. 「Annotation Source」で Pathwayを選択し、「reactome」が「Wikipathways」を選択します。

3. 「Displayed Annotation Selection」で、表示するPathway項目について、PSEA-Quantによる自動選択か手動選択かを選びます。

4-a.自動取選択[PSEA-Quant]の場合

Protein Set Source  
 GO Terms  
 Star Color  
 Pathways

Analysis Scope  
 Experiment-Wide  
 One Category  
 Two Category

Quantitative Value: Normalized Total Spectra  
 Save a copy of the PSEA-Quant Report

4-b.手動選択の場合

Configure Reactome

Resource: UniProt

Species

- Alphagalbanaeus 9
- Anacostia nana
- Bacillus anthracis
- Bos taurus
- Caenorhabditis elegans
- Candida albicans
- Canis familiaris
- Canis lupus familiaris
- Ceratopithecus szechuanensis
- Chlorella trichosporia
- Chlorella vulgaris
- Clostridium botulinum
- Clostridium perfringens
- Clostridium tetani
- Commersonia bartramia
- Coriaria alliodora
- Cratichneumon vindex
- Cratichneumon vindex
- Cratichneumon vindex



# Pathway 表示 1

Scaffold ではGOのように、該当項目にマークがついた形で表示されるのみです。 Scaffold 上で Pathway描写は行われません。

各タンパク質の Pathway情報が表示されます

#	Protein Name	Accession Number	Molecular Weight	MS/MS
2	Clathrin heavy chain 1	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cltc PE=1 SV=3	192 kDa	67
3	ATP-citrate synthase	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acly PE=1 SV=1	120 kDa	59
4	Cluster of Tubulin beta-5 chain	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tubt5 PE=1 SV=1 (TBES_MOUSE)	50 kDa	46
5	Cluster of Ras-related protein Rab-14	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rab14 PE=1 SV=3 (RAB14_MOUSE)	24 kDa	92
6	Endoplasmic reticulum chaperone BIP	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hsp90b1 PE=1 SV=2	82 kDa	50
7	Endoplasmic reticulum chaperone BIP	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hsp90 PE=1 SV=3	82 kDa	46
8	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sptn1 PE=1 SV=4	226 kDa	78
9	Myosin-9	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Myt9 PE=1 SV=4	226 kDa	68
10	Cluster of Heat shock cognate 71 kDa protein	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hspa8 PE=1 SV=1 (HSP7C_MOUSE)	71 kDa	48
11	Cluster of Alpha-actinin-4	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Actn4 PE=1 SV=1 (ACTN4_MOUSE)	105 kDa	59
12	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Iqgap1 PE=1 SV=2	189 kDa	55
13	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Vop PE=1 SV=4	69 kDa	44
14	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sptn1 PE=1 SV=2	274 kDa	57
15	Neutral alpha-glucosidase AB	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Canab PE=1 SV=1	107 kDa	41
16	Hypoxia up-regulated protein 1	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hyoul PE=1 SV=1	111 kDa	57
17	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1	OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ugt1 PE=1 SV=4	176 kDa	55

Protein Information: Wikipathways (e.g. Gene Name) BIP\_MOUSE Hspa8

Annotation: Prion disease pathway (Homo sapiens)

スライド39 ①

スライド39 ②

# Pathway 表示 2

実際のPathway情報は外部リンクから確認する事ができます

Find pathways

Search for: Hspa5

11 pathways found

Prion disease pathway (Homo sapiens)

Lot van de Wouw, Friederike Ehrhart, Kristina Hanspers, Egon Willighagen, et al.

② Pathway表示

ページ内検索で該当タンパク質を探します

① 該当タンパク質が含まれるPathway一覧

5 scaffold

- Scaffold5 何かができるか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology, Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- Viewer

## Spectral Counting, 検定

→ 11 (P.119~)

定性解析(ペプチド同定、タンパク質同定)の結果から、タンパク質の存在量を反映させる数値(指標)を計算し表示させることができます

Display Options

Quantitative Value

“Display Options”の中から選択

Statistical Test

各種検定も実施可能

対応するSpectral Counting

- Total Spectra
- Weighted Spectra
- emPAI
- NSAF
- iBAQ



# その他の表示画面:Load Data

→ 5 (P.77~)

サンプルに対して取り込みデータの追加や削除したり、サンプル自体を追加/削除/改名 などをすることができます

**追加でdatを取り込む際の選択**

**サンプルの追加**

**サンプル名**

**BioSampleに 取り込み予定の dat**

**BioSampleに 取り込み済の dat**

**検索条件**

Analysis Information:  
 Peptide Tolerance: Unknown  
 Fragment Tolerance: 0.50 Da (Monoisotopic)  
 Digestion Enzyme: stricttrypsin  
 Searched Database: the SILAC-demo database (0 entries)  
 Original Search Date: MsQuant-03/23/2013  
 Scaffold Version: Scaffold5.0.0-staging22

Fixed Modifications:  
 Modification: Miss AA  
 Carbamidomethyl 57.02 C

Variable Modifications:  
 Modification: Miss AA  
 Label13C(6) 6.02 R  
 Label13C(6)15N(4) 10.01 R  
 Oxidation 15.99 M  
 Acetyl 42.01 Peptide N-T

- Scaffold5 何が出来るか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology,Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
  - Load Data
  - Similarity
  - Quantify
  - Publish
  - Statistics
- Viewer



# その他の表示画面:Similarity

→ 7 (P.89~)

シェアペプチドを持つタンパク質の重複具合をチェックできます

ユニークなペプチドは、「Exclusive To」で色分け表示されます

**タンパク質 リスト**

**ペプチド リスト**

Index	Peptide	Prob	Exclusive	Valid
1	AGFAGDQAPR	100%		
2	AVFPSIVGR	83%		
3	AVFPSIVGRPR	100%		
4	CDVDIRKDLVANTVLS	9%	Uncharacteristic	1.00
5	QPEALFQPSFLGMESC	100%		0.44
6	QPEALFQPSFLGMESC	100%	Uncharacteristic	0.44
7	DLVANTVLSGGTMTMP	100%	Uncharacteristic	1.00
8	DSYVGDEAGSK	85%		0.37
9	EEEAALVIDNGSGMCK	100%	Uncharacteristic	0.47
10	EITALAPSTMK	100%		0.37
11	EKLQYVALDFEDEMAT	100%		0.16
12	PROPEALFQPSFLGMESC	73%		0.44
13	GILTLKPIEHSITND	25%	Uncharacteristic	0.44
14	GVSETTAPR	100%		1.00

Identifications | Spectrum | Spectrum/Model Error | Fragmentation Table

Sequence	Prob	P-sc...	NTT	Modifications	Observed	Actual M...	Char...	Delta...	Delta...	Ret...	Intensity	TIC	Spectrum ID
M EDDCIAALVVDNGSGMCK	100%	259.88	1	Acetyl (+42) C	911.40	1,820.79	2	+0.000	-0.18			228200	Tutorial_Triplex...
(M)DDCIAALVVDNGSGMCK	100%	294.52	1	Acetyl (+42) C	911.40	1,820.79	2	-0.000	-0.18			345400	Tutorial_Triplex...
(M)DDCIAALVVDNGSGMCK	100%	212.86	1	Acetyl (+42) C	919.40	1,836.79	2	-0.000	-0.18			1223000	Tutorial_Triplex...
(M)DDCIAALVVDNGSGMCK	100%	256.45	1	Acetyl (+42) C	919.40	1,836.79	2	-0.000	-0.18			843600	Tutorial_Triplex...



# その他の表示画面:Quantify

→ 8 (P.102~)

- Scaffold5 何が出来るか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology,Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
  - Load Data
  - Similarity
  - **Quantify**
  - Publish
  - Statistics
- Viewer

**定量値の棒グラフ**  
→ 8-2 (P.103~)

**定量値の散布図**  
→ 8-3 (P.103~)

**GO/Pathway の項目を数え、円グラフなど**  
→ 8-5 (P.107~)

**同定タンパク質/ペプチドのサンプル間比較[ベン図]**  
→ 8-4 (P.107~)

Quantify view includes lower scoring matches.

Un/Int Scatterplot (T-Test, p <= 0.05, No Correction)

Gene Ontology Terms

620 Proteins at 99.0% Minimum  
2 Min # Peptides  
12304 Spectra at 95.0% Minimum  
0.80% Decoy FDR



# その他の表示画面:Publish

→ 9 (P.109~)

- Scaffold5 何が出来るか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology,Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
  - Load Data
  - Similarity
  - Quantify
  - **Publish**
  - Statistics
- Viewer

**解析の手法の記述を補助**

左側にソフトウェアのバージョンなどを記入すると、右側にその内容に従った文章が表示されます

Experiment Methods

Parameter Value

Experiment: SILAC

Peak List Generator: [ ]

Version: [ ]

Charge States Calculated: [ ]

Disulfoxide: [ ]

Textual Annotation: [ ]

Database Set: 1 Database

Database Name: the SILAC-demo database

Version: [ ]

Taxonomy: All Entries

Number of Proteins: 0

Explain Database w/ < 1000 entries: [ ]

Does database contain common contigs: [ ]

Search Engine Set: 1 Search Engine

Search Engine: MaxQuant

Version: 1.3.0.5

Samples: All Samples

Fragment Tolerance: 0.50 Da (Monoisotopic)

Parent Tolerance: 1.0kDa

Fixed Modifications: +H7 on C (Carbamidomethyl)

Variable Modifications: +6 on R (Label13C6), +10 on R (Label13C6/15N4)

Database: the SILAC-demo database (unknown version, 0 entries)

Digestion Enzyme: trypsin

Max Missed Cleavages: 2

Probability Model: [ ]

MAScaffold Data Tutorial.Trip: [ ]

LFR Model Classifier data: Bayes, Good (70%) P-sco

Version: Scaffold.5.1.0

Modification Metadata Set: 1541 modifications

Source: C:\Program Files\Scaffold 4-820\parameters\unimod

Comment: [ ]

Protein Grouping Strategy: Experiment-wide grouping with protein cluster analysis

Protein Thresholds: 95.0% minimum

Peptide Thresholds: 99.0% minimum and 2 peptides minimum

Protein FDR: 0.0% (Decoy)

Pathway Annotation Source(s): [ ]

Alternate ID Source(s): [ ]

Export Protein Report

Export Peptide Report

Export Publication Report

DATABASE SEARCHING-- Tandem mass spectra were extracted by [unknown] version [unknown]. Charge state deconvolution and deisotoping were not performed. All MS/MS samples were analyzed using MaxQuant (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany, version 1.3.0.5). MaxQuant was set up to search the SILAC-demo database (unknown version, 0 entries) assuming the digestion enzyme stictrypsin. MaxQuant was searched with a fragment ion mass tolerance of 0.50 Da and a parent ion tolerance of Unknown. Carbamidomethyl of cysteine was specified in MaxQuant as a fixed modification. Label 13C6 (6) of arginine, label 13C6/15N4 (4) of arginine, oxidation of methionine and acetyl of the n-terminus were specified in MaxQuant as variable modifications.

CRITERIA FOR PROTEIN IDENTIFICATION-- Scaffold (version Scaffold\_5.1.0, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0% probability by the Scaffold Local FDR algorithm. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 99.0% probability and contained at least 2 identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm (Ilievschi, et al. Anal. Chem. 2003,75(17):4645-58). Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. Proteins sharing significant peptide evidence were grouped into clusters.

• 文章は論文などで利用可能

• Scaffoldを利用した解析では参考文献にもScaffoldの論文引用をお願いしています



# その他の表示画面:Statistics

→ 10 (P.112~)

- 主にScaffold で算出しているペプチド/タンパク質の同定確率や、FDRに関するグラフ
- 複数検索エンジンの結果を取り入れた際の結果比較も可能

**主にFDRに関連するグラフ** → 10-3 (P.113)

**グラフ表示する Sampleを選択** → 10-2 (P.112)

**複数検索エンジンでの結果比較ができる散布図** → 10-4 (P.117)

**入力データのペプチドスコア分布** → 10-5 (P.117)

Category	BiO Sample	MS/MS Sample	#Prot	#IDs	#Spec	%IDs
AA	c1	control_071904_01 (P001807)	15	190	207	27%
AA	c2	control_071904_02 (P001808)	20	192	711	27%
BB	c3	control_071904_03 (P001809)	15	198	726	27%
BB	c4	control_071904_04 (P001810)	16	191	723	26%
CC	c5	control_071904_05 (P001811)	16	206	732	26%

- Scaffold5 何が出来るか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology, Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
  - Load Data
  - Similarity
  - Quantify
  - Publish
  - **Statistics**
- Viewer



# Viewer

Viewerでは、データ取り込み以外のほぼすべての操作が可能

Viewer入手先

<https://www.proteomesoftware.com/products/scaffold-5>

Viewerインストール要件 (推奨)

- OS : Windows10 以上, Mac OS (最新版) , Linux Ubuntu 16.04
- Memory : 4GB以上、16GB 以上推奨
- Disk : 空き容量 最低 35GB以上

シェアの方法

ファイル保存 → Sf3 ファイル (Scaffold のフォーマット)を人に渡す → viewer で開く

- Scaffold5 何が出来るか
- データ取り込み
- 表示画面について
- Samples画面
- Proteins画面
- menu選択項目
- Gene Ontology, Pathway
- Spectral Counting, 検定
- その他の表示画面
- **Viewer**