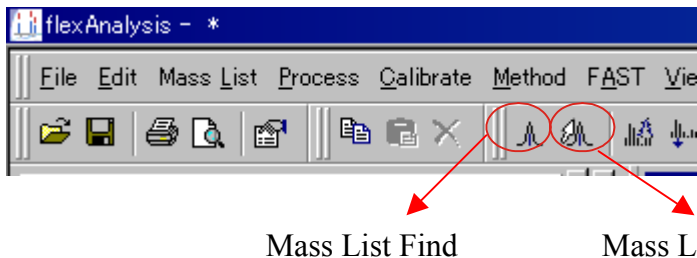


## Biotools簡易マニュアル

## 1. FlexAnalysisでスペクトルにラベルをつけます



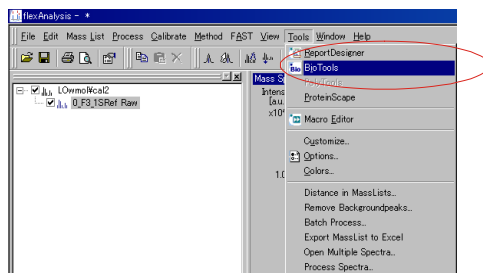
**Mass List Find**ボタンで全範囲にわたってピークピック、もしくは**Mass List Edit**ボタンでピーク一つずつマニュアルでピークピックします。  
(Autoflex日本語マニュアル・Ultraflex日本語マニュアル参照)

ただし、トリプシン自己消化物等のバックグラウンドピークはピックされていない状態にした方が良いでしょう。

もしくは、FlexAnalysis Methodのスクリプトを使用してソフトウェアにピークピックをさせる方法もあります。

## 2. データをBiotooolsに転送します

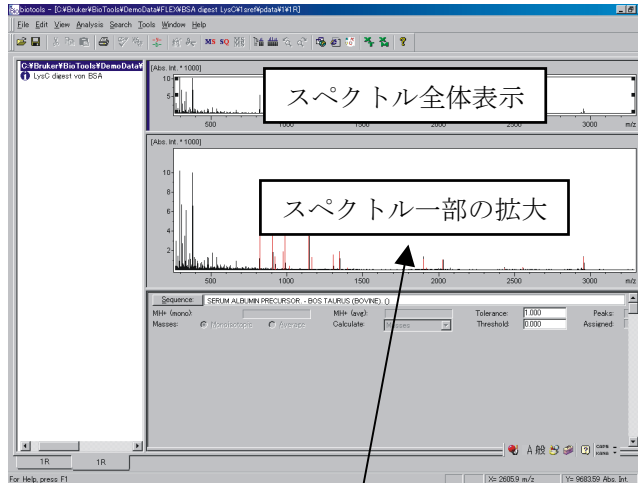
**Tools**メニューの**Biotoools**を選択します。



(FlexAnalysisからの転送ではなく、Biotooolsから直接読み込む場合には、FileメニューのOpenコマンドを使用し、任意のデータフォルダ内の「1r」ファイルを指定します。)

3. Biotooolsが起動してデータが読み込まれます。

赤い線で示されているピークは既にピックアップされたピークです。

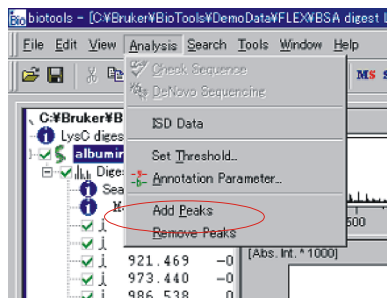


スペクトルを拡大するには、虫メガネカーソル状態でマウスをドラッグします。拡大を取消すにはクリックをします。

また、縦軸・横軸共、それぞれの目盛ラベル周辺にカーソルを合わせて（それによってカーソル形状が変化します）マウス左ボタンをドラッグすると移動、右ボタンをドラッグすると拡大・縮小することも可能です。

4. Biotoools上でのピークピックアップについて

Analysisメニュー→Add Peaksを選択して



ピックアップしたいピークを跨ぐようにドラッグします。

Add Peaksモードから抜ける場合は、マウス右ボタンをクリックします。

ピックを取り消す場合にはRemove Peaksを選択します。後の手順は同様です。

\*この後のデータ解析（データベース検索を含む）は、ピックされているピークのみを考慮して行なわれます。

## 5. データベース検索 (PMF, FAST/LIFT共通)

MSボタン (FAST/LIFTの場合はMSMSボタン) をクリックすると



検索条件入力画面が現れますので、必要事項を入力します。

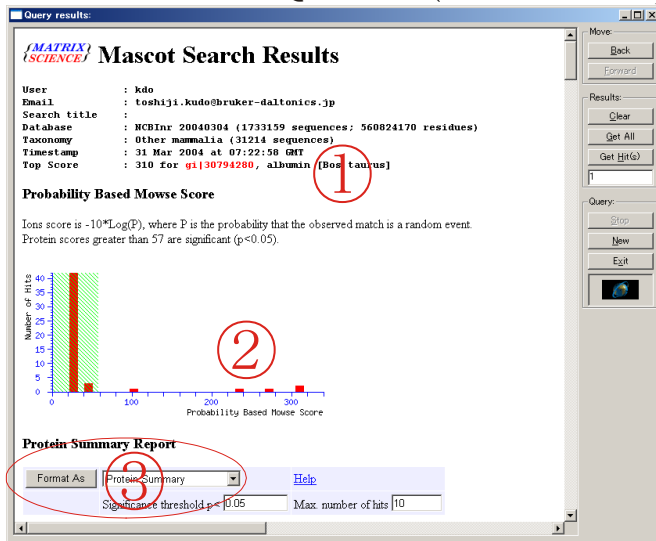
A screenshot of the 'MS/MS Ions Search' dialog box. The interface is filled with various input fields and dropdown menus, each marked with a red circle and a number from 1 to 14. 1: URL field (http://www.matrixscience.com/cgi/nph-mascot.exe?1). 2: User Name field (user). 3: Email field (user@bruker-daltonics.jp). 4: Search title field. 5: Taxonomy dropdown (All entries). 6: Database dropdown (NCBIInr). 7: Enzyme dropdown (Trypsin). 8: Fixed Modifications list (Acetyl (N-term), Amide (C-term), Biotin (K), Biotin (N-term), Carbamidomethyl (C)). 9: Variable Modifications list (AB\_old\_ICATd0 (C), AB\_old\_ICATd8 (C), Acetyl (K), Acetyl (N-term), Amide (C-term)). 10: Protein mass input field. 11: Missing cleavages max dropdown (1). 12: Peptide tol. ± input field (150 ppm). 13: MS/MS tol. ± input field (5 Da). 14: Instrument dropdown (Default). At the bottom, there are buttons for 'Copy Peaklist', 'Copy Masslist', 'Save as default', 'Start', and 'Exit'. A 'Peaklist' section contains a list of m/z values and their relative intensities.

- ① 検索に使用するMascotサーバのアドレス
- ② 検索をするユーザーの名前
- ③ 検索をするユーザーのメールアドレス
- ④ 検索の名前
- ⑤ サンプルの由来の種族
- ⑥ 検索に使用するデータベース
- ⑦ 使用した消化酵素の名前
- ⑧ 存在する修飾
- ⑨ 存在する可能性のある修飾
- ⑩ タンパクの質量数
- ⑪ Miss Cleavageの最大数
- ⑫ 質量数の許容誤差範囲 (通常100~150ppm程度、FAST/LIFTでは親イオンの誤差範囲)
- ⑬ (FAST/LIFTのみ) フラグメントイオンの質量数の許容誤差範囲
- ⑭ (FAST/LIFTのみ) MALDI-TOF-PSD (FAST)もしくはMALDI-TOF-TOF (LIFT)を選択  
(①③⑤⑥⑦⑧⑨⑪⑫⑬は必須)  
(\*修飾を複数個選択する場合、もしくは一度入力した修飾を削除する場合はCtrlキーを押しながら選択します)

全て入力したら**Start**ボタンをクリックして検索を開始します。

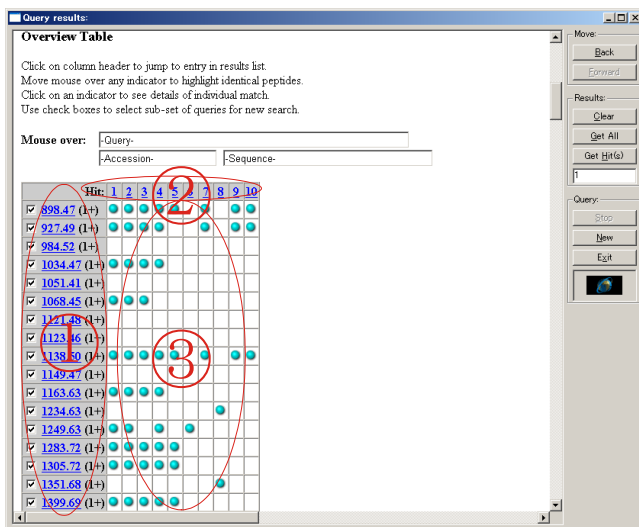
## 6. 検索結果

その1 (MASCOT version 2.0)



- ① トップスコアでヒットしたタンパク (ペプチド)
- ② 検索結果のグラフ (横軸はスコア、縦軸はヒットしたタンパクの数)
- ③ の部分でProtein Summary画面とPeptide Summary画面を切り替えることができます。PMFの場合はProtein、MS/MSサーチの場合はPeptide Summaryを選択して結果を閲覧することが推奨されています (プルダウンメニューから選択してFormat Asボタンをクリックします)。

その2



- ① 検索に使用されたピークの質量数
- ② ヒットしたタンパク・ペプチド (スコア順)
- ③ 青い丸はマッチしていることを示しています。

その3

**Query results:**

**Index**

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 130794280</a>	71274	310	albumin [Bos taurus]
2. <a href="#">gi 11351907</a>	71244	310	Serum albumin precursor (Allergen Bos d 6)
3. <a href="#">gi 118694</a>	71221	279	serum albumin precursor [validated] - Bovine
4. <a href="#">gi 1229552</a>	68083	243	albumin
5. <a href="#">gi 1113582</a>	71139	97	Serum albumin precursor
6. <a href="#">gi 12304841</a>	9530	40	MHC class II DRB first extracellular domain [Felis catus]
7. <a href="#">gi 11351908</a>	70611	40	Serum albumin precursor (Allergen Fel d 2)
8. <a href="#">gi 14506179</a>	29822	38	proteasome alpha 1 subunit isoform 2; proteasome subunit
9. <a href="#">gi 1164318</a>	71348	36	albumin
10. <a href="#">gi 1113578</a>	71362	36	Serum albumin precursor

**Results List**

1. [gi|130794280](#) Mass: 71274 Score: 310 Expect: 3.1e-27 Queries match

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
898.47	897.46	897.47	-0.02	483	-	489	LCVLHEK
927.49	926.48	926.49	-0.01	161	-	167	YLVEIAR
1034.47	1033.46	1033.47	-0.01	123	-	130	NECFLSHK
1068.45	1067.44	1067.43	0.00	413	-	420	QNCDFEK
1138.50	1137.49	1137.49	-0.00	499	-	507	CCTESLVNR
1163.63	1162.62	1162.62	-0.01	66	-	75	LVNELTEFAK
1249.63	1248.62	1248.61	0.01	35	-	44	FKDLGEEHFK
1283.72	1282.71	1282.70	0.01	361	-	371	HPFYAVSVLLR
1305.72	1304.71	1304.71	0.00	402	-	412	HLVDEPNLIK
1399.69	1398.68	1398.69	-0.00	569	-	580	TVMENFVAFVDK
1419.70	1418.69	1418.69	0.00	89	-	100	SLHTLFGDELCK
1439.82	1438.81	1438.80	0.01	360	-	371	HPFYAVSVLLR
1479.81	1478.81	1478.79	0.02	421	-	433	LGEYGFQNALIVR
1554.66	1553.65	1553.65	0.00	387	-	399	DDPHACYSYTVDFK
1567.77	1566.76	1566.74	0.02	347	-	359	DAFLGSLFLEYSR
1576.78	1575.78	1575.76	0.02	139	-	151	LKPDNPNTLCDEFK

ヒットしたデータの一覧 (①) およびその詳細 (②)

各データの③のリンク (Accession) を辿ると、さらに詳細について閲覧することが出来ます (Protein View)。

**Mascot Search Results: Protein View - Microsoft Internet Explorer**

Hit to: [gi|130794280](#) Score: 310 Expect: 3.1e-27  
albumin [Bos taurus]

Nominal mass ( $M_n$ ): 71274; Calculated pI value: 5.82  
NCBI BLAST search of [gi|130794280](#) against nr  
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Bos taurus](#)  
Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:  
[gi|12190337](#) from [Bos taurus](#)  
[gi|13336842](#) from [Bos taurus](#)  
[gi|123307791](#) from [Bos taurus](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of RR unless next residue is P  
Number of mass values searched: 56  
Number of mass values matched: 30  
Sequence Coverage: 53%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MKVVTITSL LLFSSAYSRG VFRDTHSE IAHFKDLGE EHWKGLVIA
51 FSQYLQCCPF DEHKLVNEL IEFARTQVAD ESHAGCEKSL HILFGDELCK
101 VASLRETYGD NADCCERQEP ERNECFLSHK DSDPDLPKLK PDPNLTCDEF
151 KADEKFFVGR YLVEIARHP YFAPPELLY AHKYGQVFE CQAEKDGAC
201 LFKIETIHR FVLTSARQR LRCASIQRF ERALKAWVA RLSQRFPAE
251 FVVTIKLTDV LTKVHKCH GDVIFCDDK ADLAKYTCN GDTTSKIKR
    
```

Chordata: Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae;

Bovinae; Bos.

REFERENCE 1 (residues 1 to 607)  
AUTHORS Higer,C., Geigioni,F., De Beaufort,C., Michei,G., Freilinger,J. and Henzges,F.  
TITLE Differential binding of IgG and IgA antibodies to antigenic

## 7. (PMFの場合) 検索結果をBiotoolsに転送します

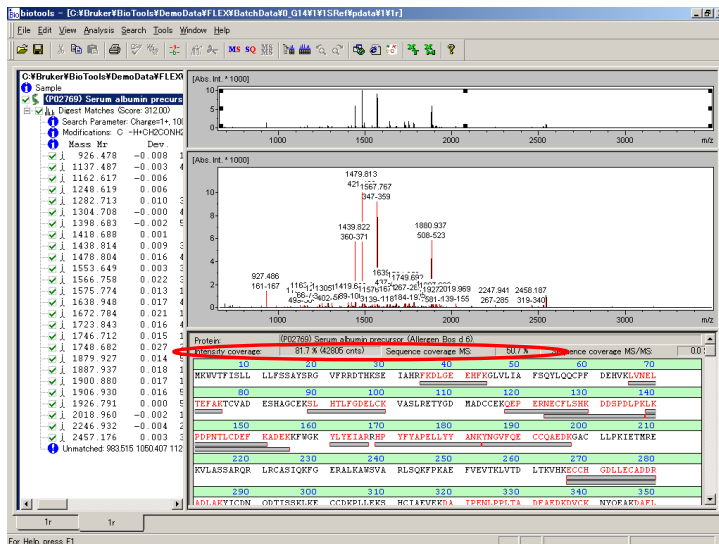


Get AllもしくはGet Hit(s)をクリックします。

Get allの場合はヒットしたすべてのデータを転送します。

Get Hit(s)はその下のダイアログに入力されているデータのみを転送します。「1」であれば第一位のデータのみ、「1,3」であれば第一位と第三位、「1-3」であれば第一位から第三位までです。ハイフンとカンマは組み合わせることも可能です。

そしてExitをクリックするとBiotoolsの画面に戻ります。



このように画面左側にデータが転送され、スペクトル画面にはラベル、その下にはシーケンスの情報が表示されます。赤字のシーケンスはマッチしていることを示し、その下のバーは色が濃いほどピーク強度が高いことを示しています。

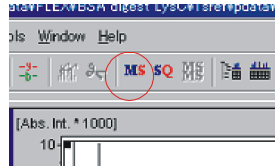
**Intensity Coverage:** マッチしたピークの強度の総和 ÷ ピックされているピークのピーク強度の総和 × 100

**Sequence Coverage MS:** タンパクの全シーケンス中、マッチしたシーケンスの割合

## 8. (PMFの場合) データ解析---二つ目のタンパクを探す---

一度検索を行い、Get All/HitでデータをBiotooolsに転送した後（複数のデータを転送した場合、さらにその中から「一つ目のタンパク」を選択し）、

5. データベース検索と同様に**MS**ボタンで  
もう一度検索画面を表示させます。

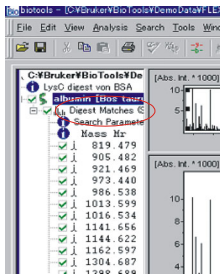
A screenshot of the 'MS/MS Ions Search' dialog box. The window title is 'MS/MS Ions Search'. It contains several input fields and dropdown menus. The 'URL' field is set to 'http://Djkt951s/mascot/cgi/nph-mascot.exe?1'. The 'Database' dropdown is set to 'NCBI nr'. The 'Enzyme' dropdown is set to 'None'. The 'Fixed Modifications' list includes 'Acetyl (K)', 'Acetyl (N-term)', 'Amide (C-term)', 'Biotinylated (K)', and 'Biotinylated (N-term)'. The 'Variable Modifications' list includes 'Acetyl (K)', 'Acetyl (N-term)', 'Amide (C-term)', 'Biotinylated (K)', and 'Biotinylated (N-term)'. The 'Protein mass' field is empty, and the 'Peptide tol. ±' is set to '150 ppm'. The 'Charge state' is set to '1+', and the 'm/z' is set to '2061.830100'. The 'Data file' field is empty. The 'Peaklist' field contains a list of m/z values: 60.010613 205.720000, 86.251503 145.580000, 101.154204 207.710000, 120.218970 136.770000, and 147.208625 99.770000. The 'Search unmatched peaks only' checkbox is checked and circled in red. The 'Results' section has 'Overview' checked and 'Report top' set to '10 hits'. There are buttons for 'Copy Peaklist', 'Copy Masslist', 'Save as default', 'Start', and 'Exit'.

**Search Unmatched Peaks Only**にチェックを入れて**Start**ボタンを押します。  
(その他の検索条件等は、サンプルや実験履歴を考慮して変更するか決めます。)

**Search Unmatched Peaks Only**にチェックを入れると、ピークリストから前回の検索でマッチしたもの、つまり「一つ目のタンパク」由来と考えられるピークがリストから除外されます。

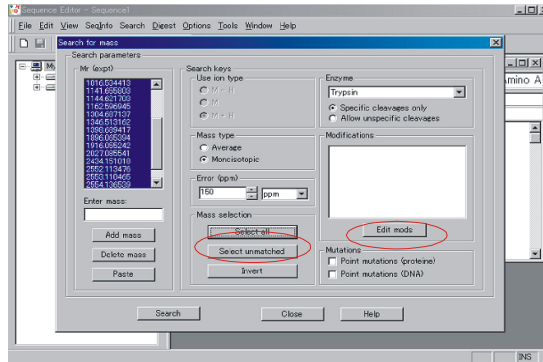


## 9. (PMFの場合) データ解析---修飾を探す---

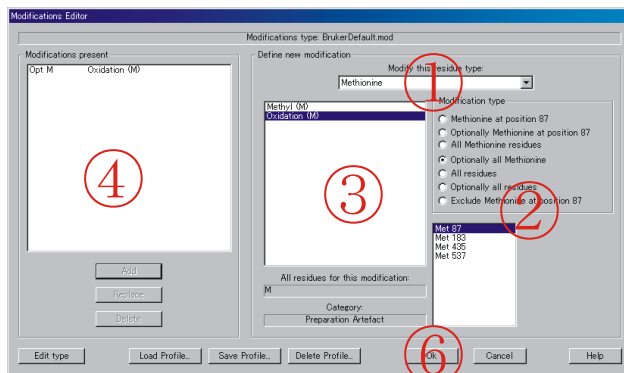


図中、赤丸の部分 (Digest Matches) をダブルクリックすると

Sequence Editorが起動し、さらにSearch for mass画面が現れます。



まず**Select Unmatched** (Mascot検索でマッチしなかった質量数のみ選択)、次に**Edit Mods** (修飾を入力する画面を呼び出します) をクリックします。

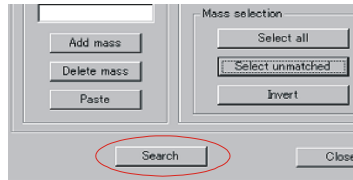


可能性のある修飾を全て入力します。

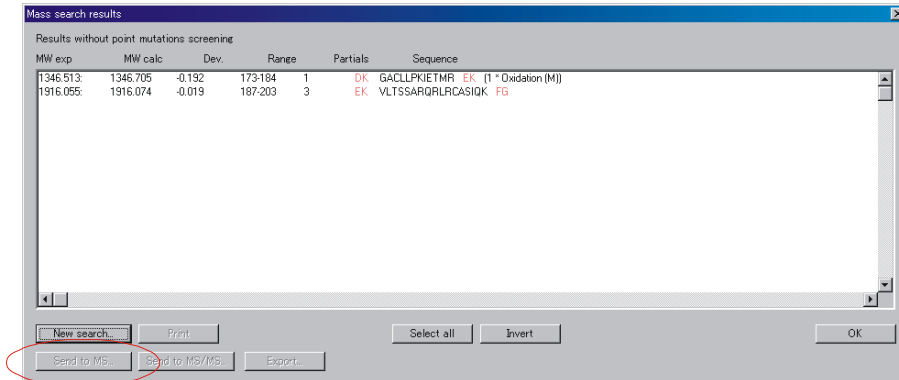
(可能性の無い修飾は入力するべきではありません)

- ①アミノ酸を選択
- ②位置を選択
- ③修飾を選択
- ④Addをクリックして登録
- ⑤必要な分だけ①から④を繰り返します。
- ⑥全て入力したらOKをクリックします。

Searchをクリックすると

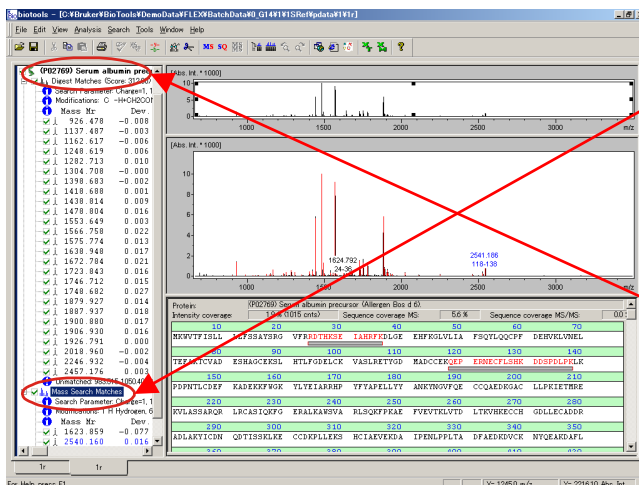


検索結果が表示されます。



それぞれの結果をチェックし、間違いが無ければ（妥当なら）選択します。複数を選択するにはCtrlキーを押しながらクリック、全てを選択するにはSelect Allをクリックします。

Send to Msをクリックすると選択されたデータがBiotooolsに転送されます。Biotooolsでは画面左側に新たなツリーが追加されます。



新たに追加されたツリーをクリック（選択）すると、新たに見つかった情報のみでスペクトルにマッチングがかかります。

ツリーのルート（一番上）の部分を選択するとMASCOTでの検索結果と併せてマッチング表示させることができます。

## 10. (FAST/LIFTの場合) 検索結果をBiotoolsに転送します

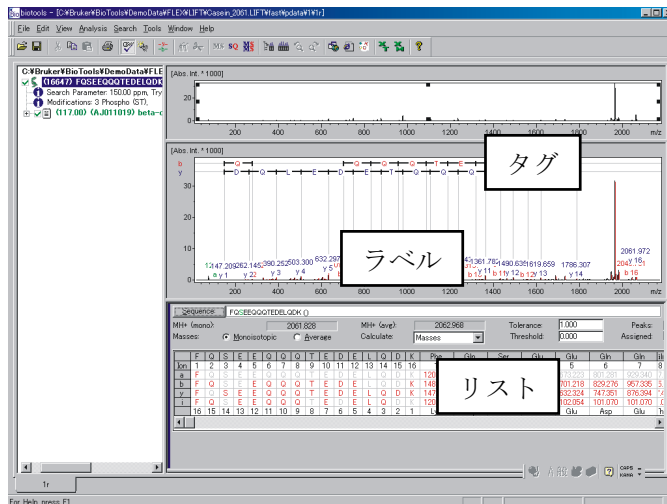


Get AllもしくはGet Hit(s)をクリックします。

Get allの場合はヒットしたタンパク全てのデータを転送します。

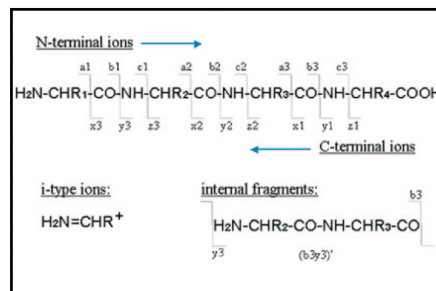
Get Hit(s)はその下のダイアログに入力されているデータのみを転送します。「1」であれば第一位のデータのみ、「1, 3」であれば第一位と第三位、「1-3」であれば第一位から第三位までです。ハイフンとカンマは組み合わせて使用することも可能です。

そしてExitをクリックするとBiotoolsの画面に戻ります。



このように画面左側にシークエンスのデータが転送され、スペクトル画面にはラベルとタグ、その下にはシークエンスとフラグメントイオンの質量数等の情報（リスト）が表示されます。赤字はマッチしていることを示し、灰色の文字はマッチしていない理論値を示しています。この灰色表示の数値を基にピークピックの再確認を行うことも可能です。

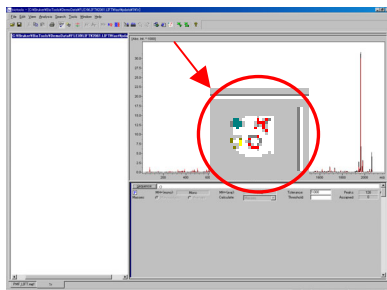
フラグメントイオンの名称



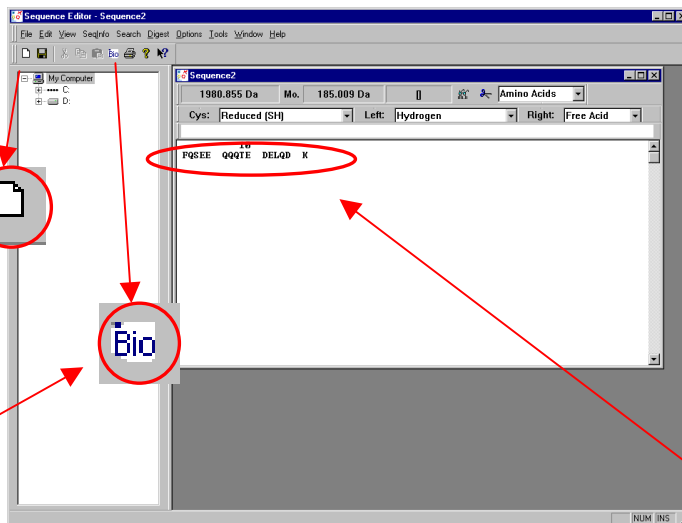
## 10. (FAST/LIFTの場合) SequenceEditorからシーケンスを入力

測定したペプチド断片のシーケンスに予め見当がついている場合は、そのシーケンスを直接手入力してスペクトルにマッチングをかけることができます。

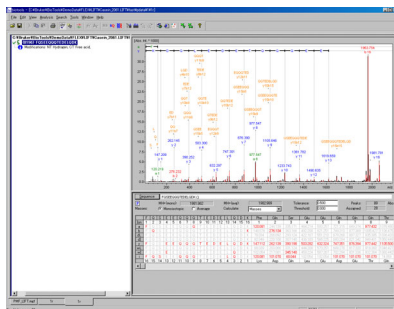
**SequenceEditor**ボタンを押すと



SequenceEditorが起動します。



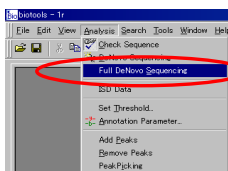
**New**ボタンを押して新しいウインドウを表示させて、シーケンスを**手入力**し、**Bio**ボタンを押すとそのシーケンスがBiotoolsに転送され、そのシーケンスをスペクトルにマッチングさせることができます。



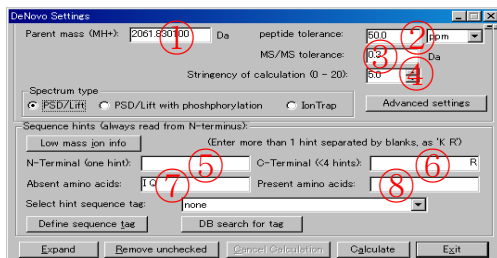
## 11. (FAST/LIFTの場合) RapiDenovo (☆RapiDenovo専用の別ライセンスが必要です)

- ・まずはMASCOTによる検索を試みることを推奨いたします。
- ・ある程度スペクトル全域にわたってシグナルが得られている必要があります。  
ある一部（領域）に全くシグナルが無いという状態では計算できない可能性があります。
- ・FlexAnalysisのスクリプトやMass List Findコマンドによるピークピックでは不十分な場合があります。マニュアルでピックの状況を確認・修正することを推奨します。
- ・このテキストは飽くまで簡易版です。  
RapiDenovoを使用する前に“Biotoools User Manual”の関連部分をご一読下さい。  
PDF形式のファイルがPCにインストールされており、BiotooolsのHelpメニュー  
→Open biotoools Manualから見る事ができます。

FAST/LIFTのデータを読み込んでおき、  
**Analysis**メニューの**Full DeNovo Sequencing**を選択します。



RapiDenovoの設定画面が現れますので、必要事項を入力します。



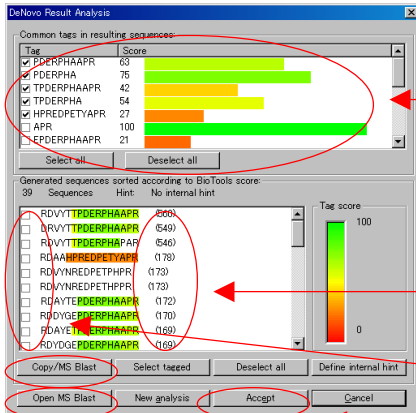
- ①親イオンの質量数（自動入力）
- ②親イオン質量数の許容誤差範囲
- ③フラグメントイオン質量数の許容誤差範囲
- ④計算で得られる候補シークエンスの評価判定基準（大きな数値ほど厳しい）
- ⑤計算時のヒント：N端のアミノ酸が判明しているときに入力
- ⑥計算時のヒント：C端のアミノ酸が判明しているときに入力
- ⑦計算時のヒント：シークエンス中には無いことが判明しているアミノ酸を入力
- ⑧計算時のヒント：シークエンス中にその存在が判明しているアミノ酸を入力

②～④を入力したら、**Low mass ion info**をクリックします。  
それによりRapiDenovoがスペクトルの低分子量領域（つまりimmonium ion等）  
をチェックして、⑤～⑥が自動入力されます。  
ただし、スペクトルやピークピックの状況などによっては間違っている場合  
もありますので必ずチェックします。  
文字はマニュアルでも入力・削除可能です。（通常、⑦のIとQは消しません）

全て入力したら**Calculate**ボタンを押します。  
これにより計算が始まり、計算中は**Cancel Calculation**ボタンが押せるようになります。  
（もし計算結果無しの場合は、このCancel Calculationボタンがまた押せない状態に  
なるだけですのでご注意ください）

## 計算結果

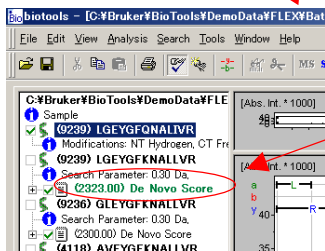
最終的に得られたシーケンス候補の数が多かった場合、以下のウィンドウが表示されます。（少ない場合は表示されません。シーケンスがそのままBiotoolsに転送されます）



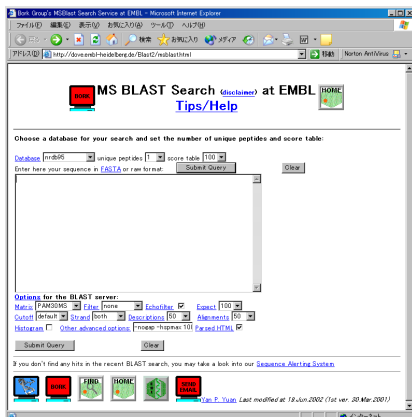
部分的なシーケンス候補とそのスコア（最高100）  
チェックの有無で下の表示が変化します。

最終的に得られたシーケンス候補とそのBiotoolsスコア（括弧書きの数字）

チェックを入れたシーケンスをBiotoolsに転送することができます。（チェックを入れてAcceptボタン）  
転送後は、Biotoolsスコアの外に、Denovoスコアも表示されます。



☆計算結果を基にホモロジー検索で同定を試みる場合  
（\*PCが直接インターネットに接続されている必要があります）

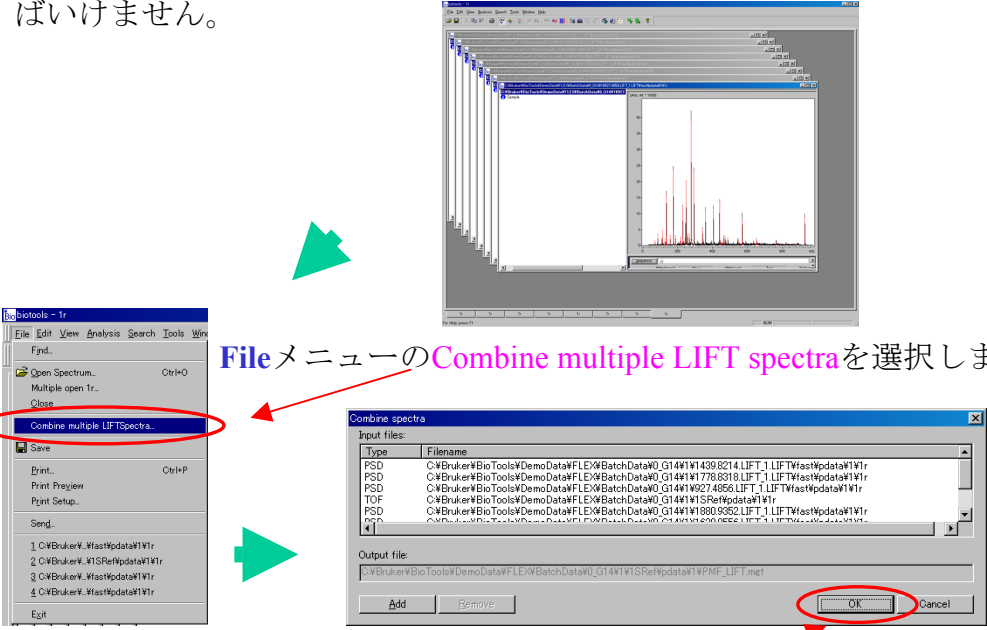


シーケンスにチェックを入れ、Copy/MS Blastボタン（チェックの入ったシーケンスがコピーされます）、続いてOpen MS Blastボタンを押すとInternet Explorerが起動し、MS Blast Searchのホームページが表示されます。そこでペーストをし、Submit Queryボタンをします。

## 12. (LIFTの場合) コンバインサーチ

一つのサンプルから、一つのMSスペクトル (PMF)と一つもしくは複数のFAST/LIFTスペクトルを測定した場合、それら複数のデータを一つのデータにまとめて一度に検索を行うことができます。これによって検索の制度が向上する可能性があります。

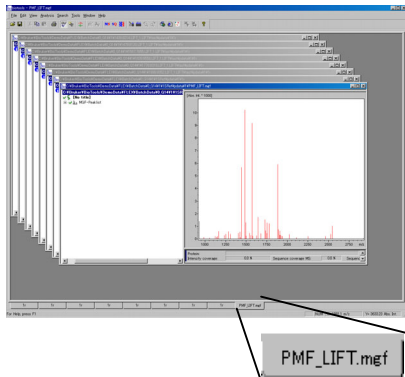
一つにまとめようとするデータ「のみ」を全てBiotoolsに読み込みます。それらは必ず「一つのPMFと一つもしくは複数のFAST/LIFT」でなければいけません。



The image shows the Biotools software interface. On the left, the 'File' menu is open, and 'Combine multiple LIFT spectra...' is highlighted with a red circle. A green arrow points from this menu item to the 'Combine spectra' dialog box on the right. The dialog box has 'Input files' and 'Output file' sections. The 'OK' button is circled in red. A green arrow points from the 'OK' button to the 'Combine Spectra' text below.

FileメニューのCombine multiple LIFT spectraを選択します。

Combine Spectra画面が現れますのでOKをクリックします。



The image shows the Biotools software interface with a green arrow pointing to the 'PMF\_LIFT.mgf' file name in the bottom right corner of the window.

PMF\_LIFT.mgf

PMF\_LIFT.mgfというデータが作成されます。

後は通常のMS/MSサーチと同様にMSMSボタンを押して検索を行います。