

結果報告書

(作業完了報告書)

HuPEX®網羅型タンパク質アレイ受託解析

プロテオ大学

プロテオ 太郎 先生

検査依頼書 No. 12345

提出日 YYYY年MM月DD日

プロテオブリッジ株式会社

東京都江東区有明3丁目7-26 有明フロンティアビルB棟9階

使用したヒトタンパク質アレイ

今回のヒト血清中に存在する自己抗体を網羅的に解析するために使用したヒトタンパク質アレイは、2枚のグルタチオン(GSH)結合ガラス基板(78mm×120mm)上に、合計で約1.35万種類のN末端GST融合タンパク質が、2スポットずつ、未変性構造を維持した非乾燥の状態を搭載されています。これら約1.35万種類のタンパク質は、約1.35万種のcDNAクローンHuPEX®からコムギ胚芽無細胞系によりプロテオームワイドに合成しています。

試験方法

試験は血清1検体につきNo.1アレイおよびNo.2アレイの2枚を用いて行いました。各検体はそれぞれアレイ1枚につき、45 μ Lを15mLに希釈して、HuPEX®網羅型ヒトタンパク質アレイに室温で1時間反応させました。その後、アレイ上の抗原タンパク質に反応した血清中の自己抗体を検出するためにアレイをTBSTで洗浄後、これら抗体のIgGサブクラスすべてが検出可能である蛍光標識抗Human IgG抗体(Goat anti-Human IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647, Invitrogen, A-21445)を添加し、室温で1時間反応させました。最後にアレイをTBSTとD.W.で洗浄後、乾燥させ、蛍光スキャナーにより蛍光画像を取得しました。

データ解析方法

スポットの定量化

まずは取得した蛍光画像からArray-Pro Analyzer (Meyer Instruments社製)を用いて、タンパク質スポットにグリッドを当てはめ、その範囲を定量化しました。定量値(Net intensity)は、スポットの中央値(Raw intensity)からバックグラウンドの中央値(Local corners)を引いた値になります。

各抗原のシグナル値の算出

定量化後、基板上における全Mock(ネガティブコントロール_mRNAを含まないタンパク質合成溶液)のNet intensityの平均を算出しました。算出したMockの平均値を各スポットのNet intensityから差し引いたものを真のシグナル値としました。

抗原は1種類につき2スポットずつ存在するので2スポットの真のシグナル値から平均値を求め、その抗原のシグナル値としました。

Index値の算出

基板間での比較を可能とするために、各スポットについて以下の方法でIndex値を算出しました。

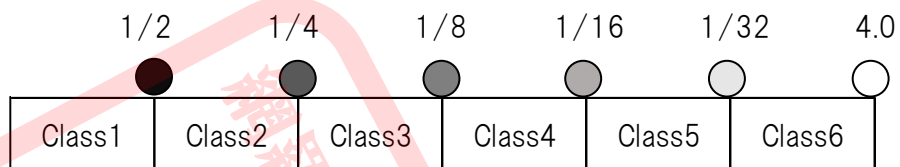
各IGHG1希釈系列(1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32)におけるNet intensity各8スポットずつの平均値を求め、そこからMockの平均値を差し引き真のシグナル値を算出しました。その後各スポットの真のシグナル値をIGHG1(1/2)の真のシグナル値で除した値に100を掛けたものをIndex値としました。Index値も1抗原につき2スポットずつ存在するので、2スポットの平均値を求めその抗原のIndex値としました。

陽性判定

陽性判定は、抗原の Index 値 4.0 以上を閾値としました。さらにこれら陽性の抗原について、ポジティブコントロール IGHG1 の希釈系列 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) の Index 値との比較を行い、Class 1 ~ 6 の半定量的な評価を行いました。

半定量判定の模式図

ポジティブコントロール



解析検体一覧

表1.解析検体とアレイ

検体名	No. 1 アレイ番号	No. 2 アレイ番号
XXXXX	012345_001	012345_002

計1検体

解析結果

XXXXX 検体については問題なく解析することができました。

各検体における Class 別陽性抗原数と陽性抗原を抽出したリストを作成し、以下に貼り付けました。

Class 別陽性抗原数

各検体において陽性判定および Class 1～6 の半定量を行いました。コントロール抗原と非特異的な反応による陽性抗原を除いた後、Class 別陽性抗原数を集計しました。XXXXX 検体で 40 抗原に対する自己抗体を検出しました。

表2.各検体におけるClass 別陽性抗原数

	XXXXX
Class 1	2
Class 2	1
Class 3	3
Class 4	6
Class 5	17
Class 6	11
Total	40

陽性抗原リスト

各検体における陽性抗原をより分かりやすく伝えるため、Class5 以上の抗原について、グラフで視覚的に表現しました。また、Class5 以上の抗原が 60 抗原より多く検出された場合は、上位 60 位まで記載しました。

全抗原に対する Index 値の一覧データは、エクセルファイルにてご提供いたしました。

検体名： XXXXX

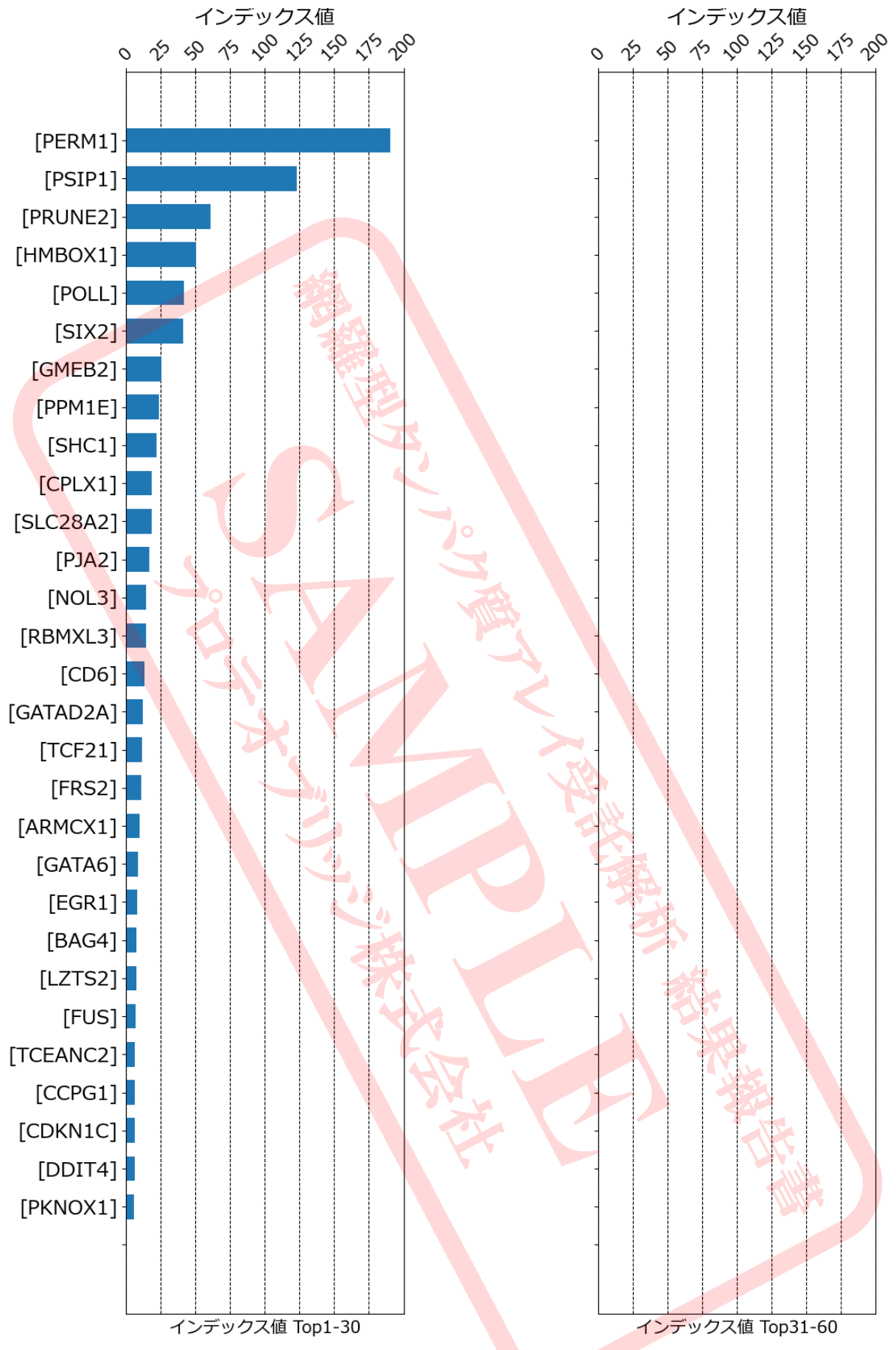


Fig. 1 検体 XXXXXにおける陽性抗原のインデックス値の分布