

# TraceViewer 取り扱い説明書

version1.1

大坪嘉行

東北大学大学院生命科学研究科

2019/04/01

# 引用

TraceViewerを利用して得られた成果を公表するときは、以下の論文を引用してください。  
本ソフトを使用する可能性のある人にお勧めいただけますと幸いです。

Sci Rep. 2017 Feb 2;7:41769. doi: 10.1038/srep41769.

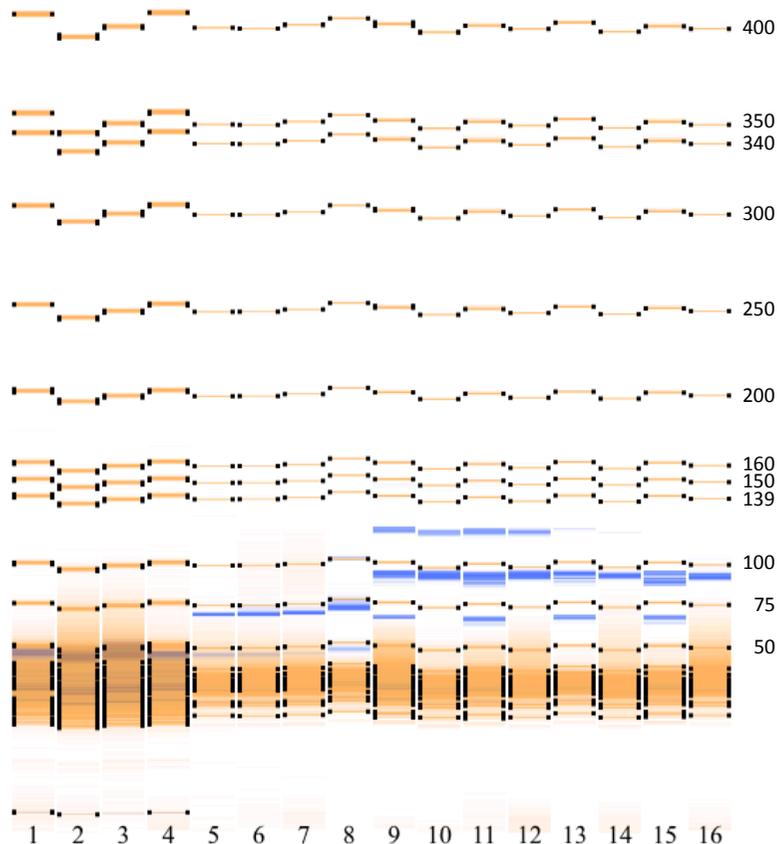
**Efficient N-tailing of blunt DNA ends by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase.** Yoshiyuki Ohtsubo, Yuju Nagata, and Masataka Tsuda

# 概要: TraceViewer

- 変性ポリアクリルアミドゲルで行なっていたDNA実験の多くは、キャピラリーシーケンサーにより簡便に実施可能です。
- TraceViewerはキャピラリーシーケンサーにより得られたデータを解析するためのソフトウェアです。
- フットプリンティング解析、転写開始点同定(S1ヌクレアーゼマッピング、primer extension法)、Cas9、制限酵素、DNA polymeraseなどのDNAを基質とする反応の解析など、幅広いDNA関連の解析に利用可能であると期待されます。RNAに関しては利用例がまだありませんが、蛍光ラベルRNAが入手可能であれば実施可能と思われます。

# キャピラリーシーケンサーによる解析の問題点

- キャピラリーシーケンサーでデータを取得すると、キャピラリーごと、runごとに泳動速度が微妙に異なるため、データの相互比較が困難です。



16個のABIFデータの例。

ここでは解析対象DNAはFAMでラベルされており、LIZ500サイズスタンダード(ThermoFisher Scientific)と混ぜてからキャピラリーシーケンサーでデータ取得を行なった。FAM由来にシグナルは青で、LIZ由来のシグナルはオレンジ色で表示している。

サンプルごとに泳動のされ方が異なっており、このままでは相互比較が困難。

# TraceViewerによる問題の解決方法

- TraceViewerはサイズスタンダードのうちの2つの泳動度を使用して泳動データを補正します。サイズスタンダードとしてはLIZ500サイズスタンダード(ThermoFisher Scientific)などが使えますが、PCRなどで2つのサイズのDNA断片を調製して使用することも可能です。

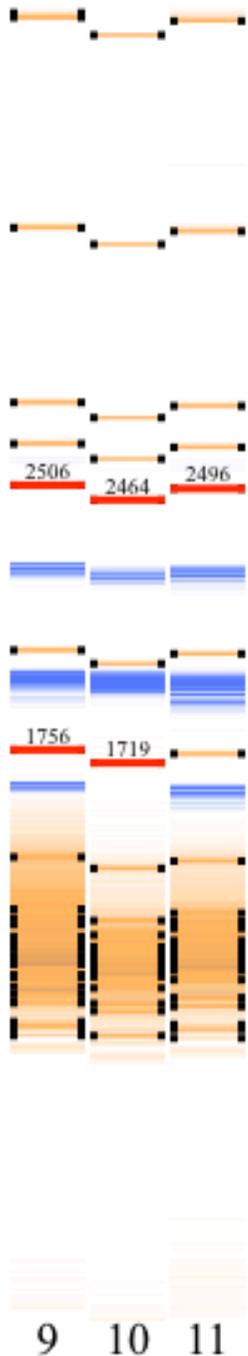
# データロード(⌘L)

- ABIキャピラリーシーケンサー由来のデータ (ABIF形式)をロードできます。
- サンプルの名前はアンダーバー「\_」で区切るようにつけると良いでしょう。フィールドごとの並び替えに利用できます。

SampleNameExample\_10min\_conditionA

1<sup>st</sup> field      2<sup>nd</sup> field      3<sup>rd</sup> field

# 2つのマーカーの選択



- ⌘R で生データを見るためのwindowを開きます。
- 見た目をスライダーを使って変更できます。
- 各レーンごとに2つのマーカーをクリックして選択してください。
- 選択されたマーカーは赤い線で表示されます。またピークのスクリーンナンバーが表示されます。
- 複数レーンで同時に選択するにはコントロールを押しながらドラッグしてください。もっとも大きいバンドと小さいバンドが選ばれます。
- 2つのバンドを選択すると、これらの位置がデータコントロールテーブルに表示されます。
- 黒いドットで挟まれたバンドが、自動認識されたバンドです。
- バンドが自動認識されていない場合は、シフトを押しながらカーソルをドラッグするとカーソルの位置がわかります。データコントロールテーブルにピーク位置を手入力してください。

# データコントロールテーブル(☿D)

- "Sample name" ヘッダーをクリックすると、サンプルネームでデータをソートすることができます。サンプル名はアンダーバーで区切られているとみなされ、フィールドごとにソートされます。何度かクリックしてみてください。
- Control + ↑ あるいは control + ↓ でデータ行を動かすことができます。
- チェックボックスのヘッダー部分をクリックすると、選択状態が反転します。
- Dye set G5を使用し、FAMとLIZを使用している場合、Data1チャンネルがFAMのデータ、Data5がLIZのデータです。

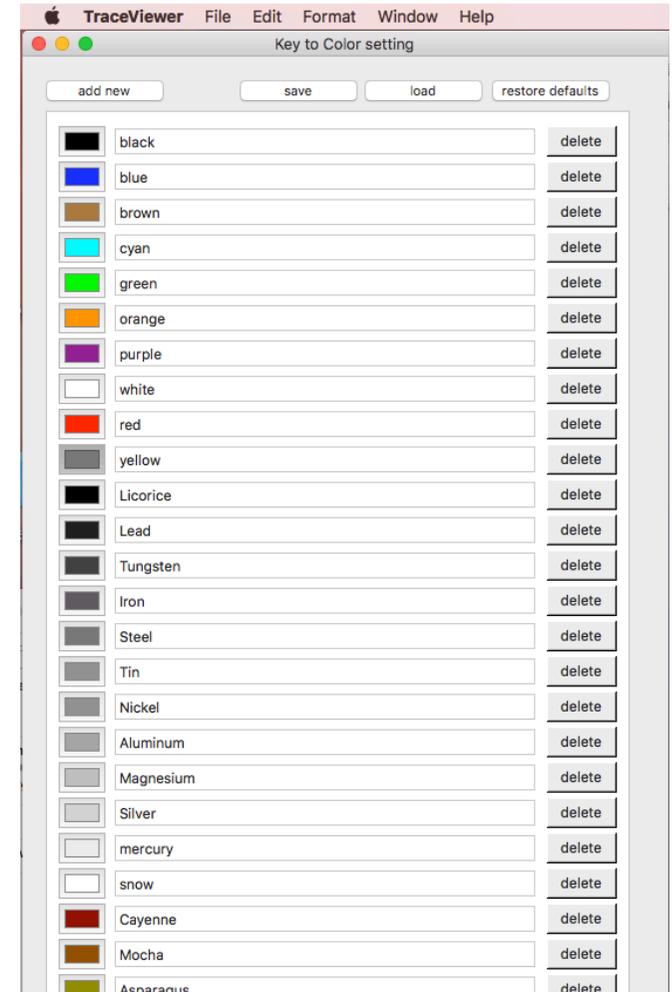
#	File Name	Sample Name	start	end	Trace	1	2	3	4	5	Color1	Color2	Color3	Color4	Color5	peak distance	drawing ratio	comment	function
1	SampleFileName	120bpDNA_withoutMn_15min	1,751	2,036	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	blue	green	red	cyan	oran...	1	0.01		delete
2	SampleFileName2	120bpDNA_withoutMn_30min	1,711	1,990	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	blue	green	red	cyan	oran...	1	0.01		delete

Annotations in the image:

- marker1: points to the 'start' column.
- marker2: points to the 'end' column.
- show / hide DATA1 ~ DATA5: points to the 'Trace' column headers.
- show / hide sample in Trace view: points to the 'Sample Name' column.
- color keys: points to the 'Color1' through 'Color5' columns.
- remove row: points to the 'function' column.

# カラーコード

- ‘color key’は色を指定するための文字列です。
- “Edit” -> “Show color panel”で、色の名前と色の関係を変更するか、新しい関係を定義することができます。



# trace view (⌘T)

- 見た目の変更のためのテキストフィールドがたくさんあります。
- 数値の単位は「ポイント」です。

The screenshot displays the Trace View application interface. At the top, the title bar reads "Trace View". Below it is a settings panel with various controls:

- panel height: 150 (labeled 1)
- panel width: 400 (labeled 2)
- extra space width: 300 (labeled 3)
- zeroHeight: 30 (labeled 4)
- panel gap: 50 (labeled 5)
- margin Left and Right: 20 (labeled 6)
- margin top and bottom: 40 (labeled 7)
- Buttons: store, set as default, revert to initial settings, even out peaks, copy selected peak data to clipboard, PDF
- Checkboxes:  calibrators,  comments,  number panels,  sample name,  enable and show selection,  peaks,  gel-like image,  saturated scans,  marge

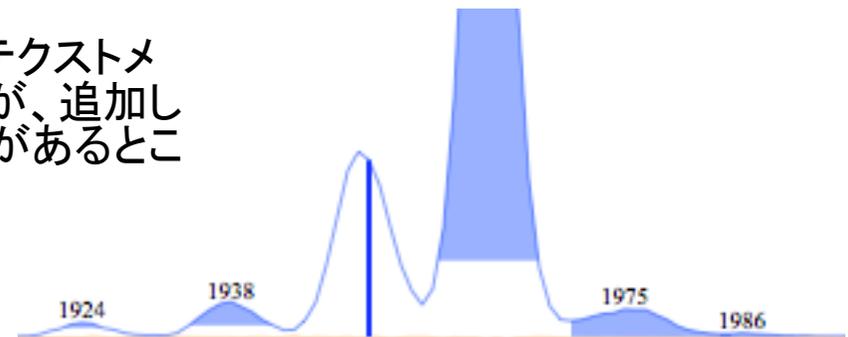
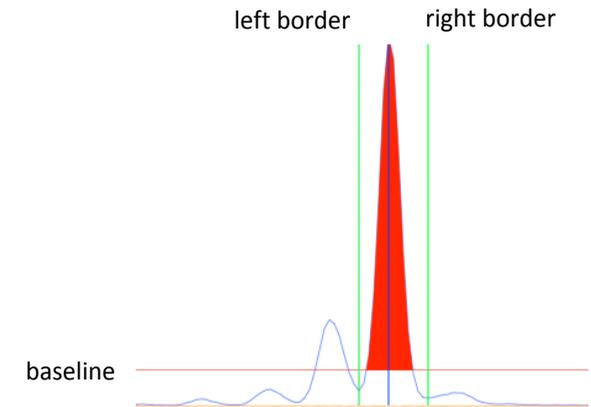
The main area shows two panels of chromatograms. The top panel is labeled "1 sample name 1" and the bottom panel is labeled "2 sample name 2". Both panels show a blue trace with several peaks. A central region is highlighted with a white box, containing two peaks labeled "marker1" and "marker2". Red arrows and numbers indicate the dimensions of the panels and margins: 1 (height), 2 (width), 3 (extra space width), 4 (zero height), 5 (panel gap), 6 (margin), and 7 (margin top and bottom).

# パネルの操作

- パネルはクリックで選択できます。
- 選ばれているパネルが1つの時は、背景が青色になります。それ以外の時は灰色です。
- パネルを1つだけ選択するには⌘+option + clickします。
- 選ばれているパネルが1つだけの時は ↑ または ↓ でパネルを動かさせます。
- 右クリックから、パネルを非表示にできます。

# ピーク操作

- ピークを選択/編集可能にするには、“enable and show selection” チェックボックスをオンにします。
- ピークを編集するにはダブルクリックします。編集中のピークは赤く塗られます。
- 編集中のピークのベースライン、左と右の境界はドラッグで動かします。
  - 左の境界は ⌘← または ⌘→ で動かします。
  - 右の境界は ← または → で動かします。
  - ベースラインは、↑ または ↓ で動かします。
- 編集が終了したら、リターンを押すか、パネル中の離れた場所をクリックしてください。
- ピークには4つのモードがあります。右クリックで変更してください。
- ピークを追加するには、パネルを右クリックしてコンテキストメニューからadd a peakを選択してください。青い縦線が、追加しようとしているpeakの位置を示します。すでにピークがあるところにはピークを追加できません。



# Peak area

- 選択されたピークの面積をexportするには'copy selected peak data to pasteboard' ボタンを押し、表計算シートにペーストしてください。

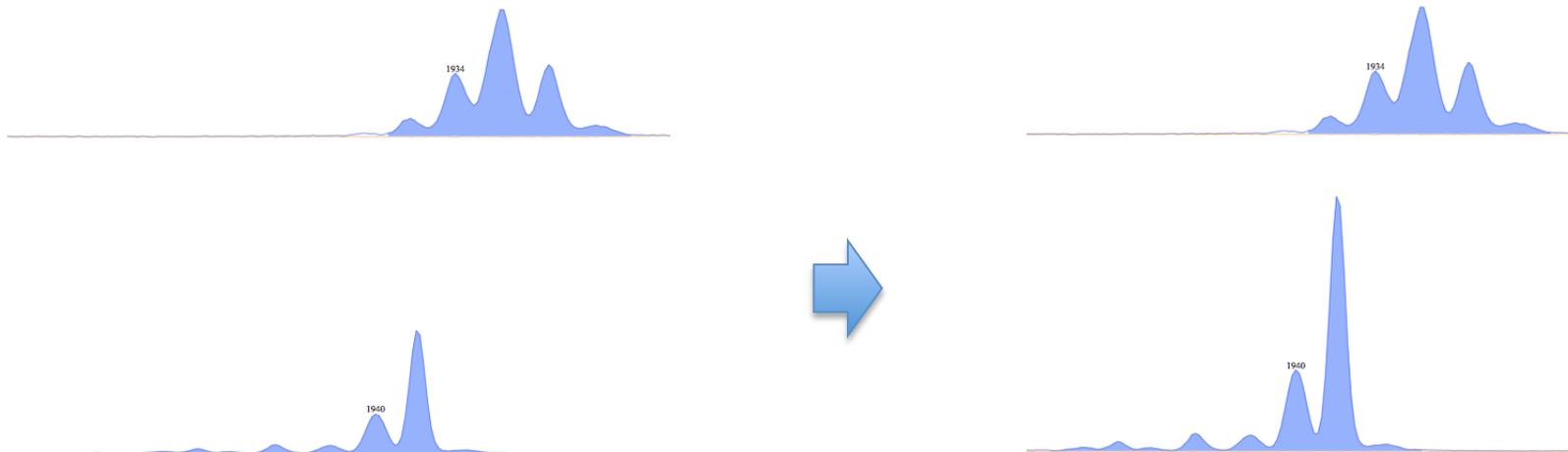
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	sample name	data chanel	peak location	area	peak start	peak end	area caluculation mode	
2	120bpDNA_withoutMn_15min	DATA1	1962	11705	1955	1969	AUTOBASELINE	

# 縦軸方向の描画ratioを変更する

- パネルを選択して↑または↓を押すと、1.2倍、あるいは1/1.2倍に描画ratioが変更されます。
- 描画ratioは、データコントロールテーブルで手入力に変更できます。

# ピーク面積をそろえる

- 選択されたピークの見た目の面積が同じになるように、描画ratioを自動調整することができます。
- 実行するには、「even out peaks」ボタンを押してください。
- ピークが少なくとも一つ選択されているパネルについて実施されます。
- ピークが少なくとも一つ選択されているパネルのうち、もっとも上にあるパネルの選択されている面積と、同じになります。



# Peak distance

- データコントロールテーブル中で設定します。
- 設定する値は、2つのマーカーのサイズの差を想定しています。
- 2つのマーカーの間に等間隔の細かい線が入ります。
- 実際のピーク間隔は一定ではないことに、気をつけてください。



Example of setting "25" as a peak distance.

# Gel-like image

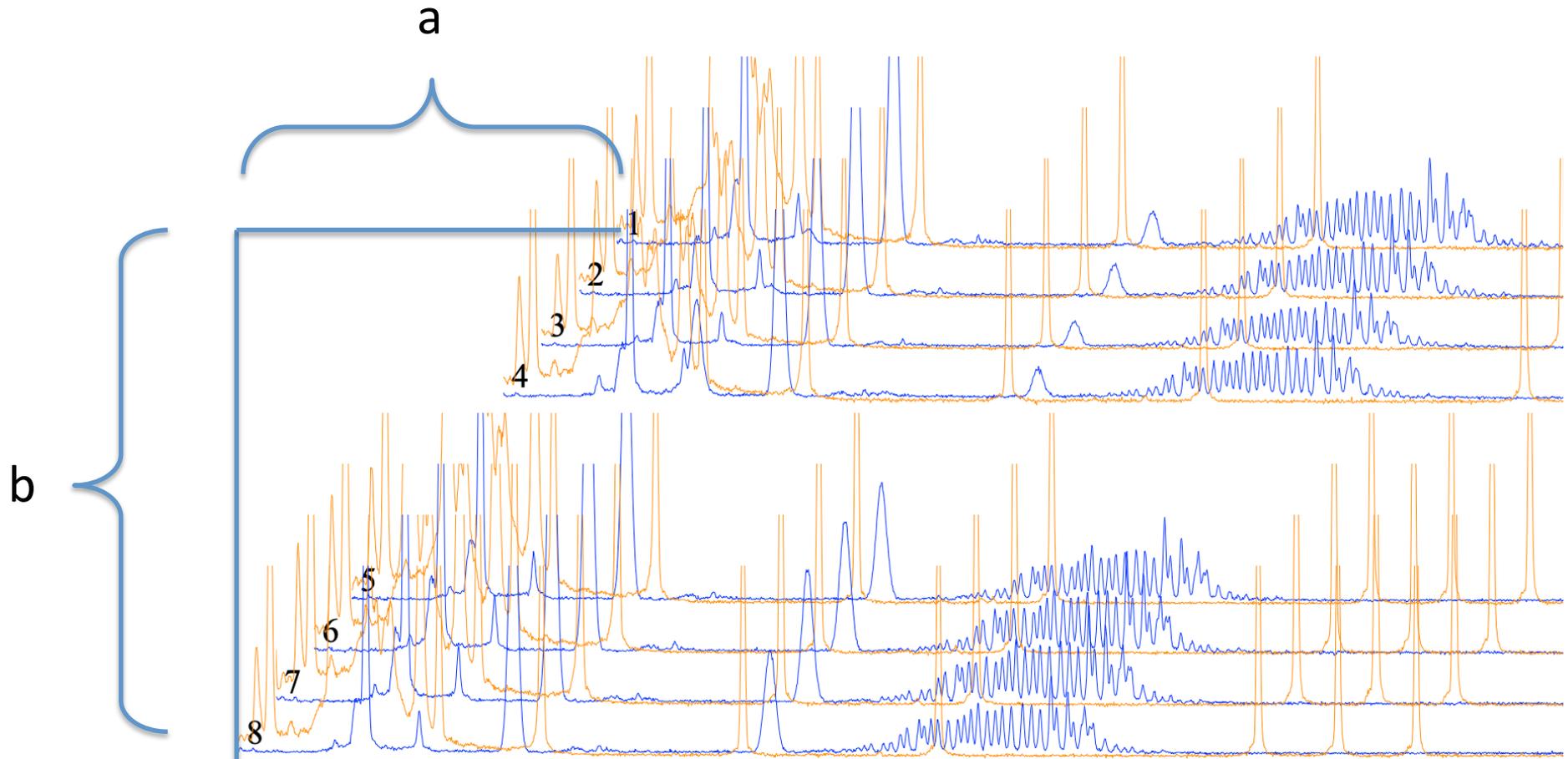
gel-like image

- ゲル電気泳動のような図にすることができます。
- ⌘Rで開くRaw data view中のスライダーで見た目を変更できます。



# スロープ

- 指定するのは  $a/b$  の値です。プラスの値、マイナスの値を試してみてください。



# パネルの重ね合わせ

- 'panel gap'でマイナスの値を入力するとパネルが重なります。
- パネルの高さが100の時に-100を指定すればパネルは完全に重なります。
- カンマ区切りで、複数の値を指定できます。例えば、-70,-40,-20,-20,-20 です。
- 指定には「x」記号を使えます。"-70x3,-20"は"-70,-70,-70,-20"と同じです。
- 指定は循環しているとみなされます。"-70x3,-20"は  
"-70,-70,-70,-20,-70,-70,-70,-20,-70,-70,-70,-20....."と解釈されます。

# PDF fileへのデータの書き出し

- traceViewの絵はPDFファイルに書き出すことができます。
- 'PDF' ボタンを押してください。

A rectangular button with rounded corners, containing the text 'PDF' in a sans-serif font. The button has a light gray background and a thin border.

# 参考

- 蛍光シグナルがどこに出るかはDNAの配列組成によって変わります。自前で調製した蛍光ラベルした100ヌクレオチドのDNAは、LIZ500の100ヌクレオチドのシグナルと同じ位置には出ません。
- 例えば、PCR増幅によって得られた5'が蛍光ラベルされた100塩基のDNA断片に関して、3'端にAがついたときとCがついた時では、シグナルの出る位置が異なります。
- DNAが短いほど泳動度は塩基組成の影響を強く受けます。
- サンプル中の蛍光ラベルDNAが濃いと、シーケンサーが汚れてしまい後のrunに漏れこむことがあるので注意が必要です。
- シグナルが振り切れている箇所を表示するには「saturated scans」チェックボックスをオンにしてください。
- 開発者が使用するにあたっては、
  - 1 mlのHiDi-formamideに10  $\mu$ lのLIZ500サイズスタンダードを加えたものを調製します。
  - これ12.5  $\mu$ lにサンプルを0.1から1  $\mu$ l程度を加えて解析しています。
  - 50 cmキャピラリー、Pop7、injection 15 sec、泳動温度60度では、サンプルがエタ沈されているなどして塩が含まれない場合は、1 fmol程度でシグナルが振り切れます。
  - LIZ500を節約したい場合は10  $\mu$ lから2  $\mu$ lに減らし、injection時間を90 secにしています。この場合、0.2 fmol程度でシグナルが振り切れます。
  - 蛍光基としてはFAMを優先的に使用します。LIZと蛍光特性が大きく異なるためです。