

## プローブの設計 ー遺伝子発現

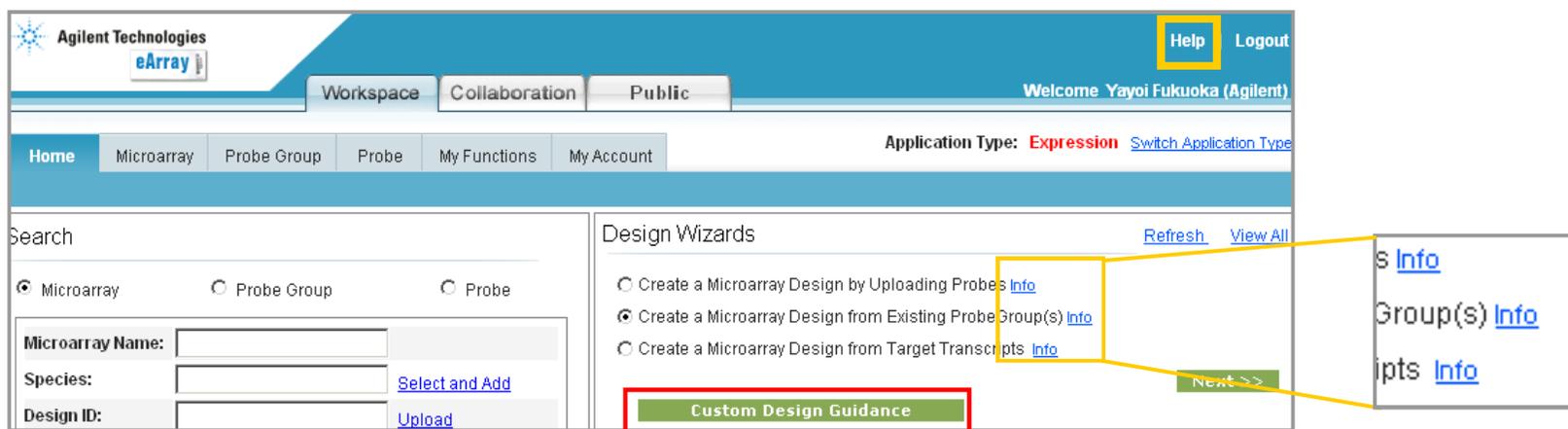
- ・遺伝子発現プローブ設計の流れ
- ・設計アルゴリズム
- ・プローブ設計にあたって
- ・プローブ設計操作
- ・プローブチェック

※2010年12月現在、Exonプローブを設計することはできません。  
設計済みExonプローブをご利用ください。



# カスタムアレイを作成するにあたって

- ・System Requirement(別紙)をご確認のうえ、eArrayをご利用ください。
- ・推奨繰り返しスポット数等の記載がありますので、“**Custom Design Guidance**”を必ずご一読ください。  
アプリケーションタイプを選択後、“Design Wizard”内にリンクがあります。
- ・[Info](#)をクリックすると、各機能の簡単な説明が別ウィンドウで現れます。  
より詳しい機能説明はHelpを参照してください。



- ・情報の取り扱い等に関する記載がありますので、使用規約をご一読ください。  
eArrayログイン後は、画面下方の[eArray Terms of Use](#)をクリックするとご覧いただけます。
- ・原核生物遺伝子発現マイクロアレイは、8x15Kフォーマットでのみ実験検証を行っております。

# カスタムアレイ作成の流れ

Step1.

最初にカスタムアレイに搭載するプローブを選択し、**プローブグループとして保存**します。プローブグループとは、1つ以上のプローブで構成されるまとまりです。

Step2.

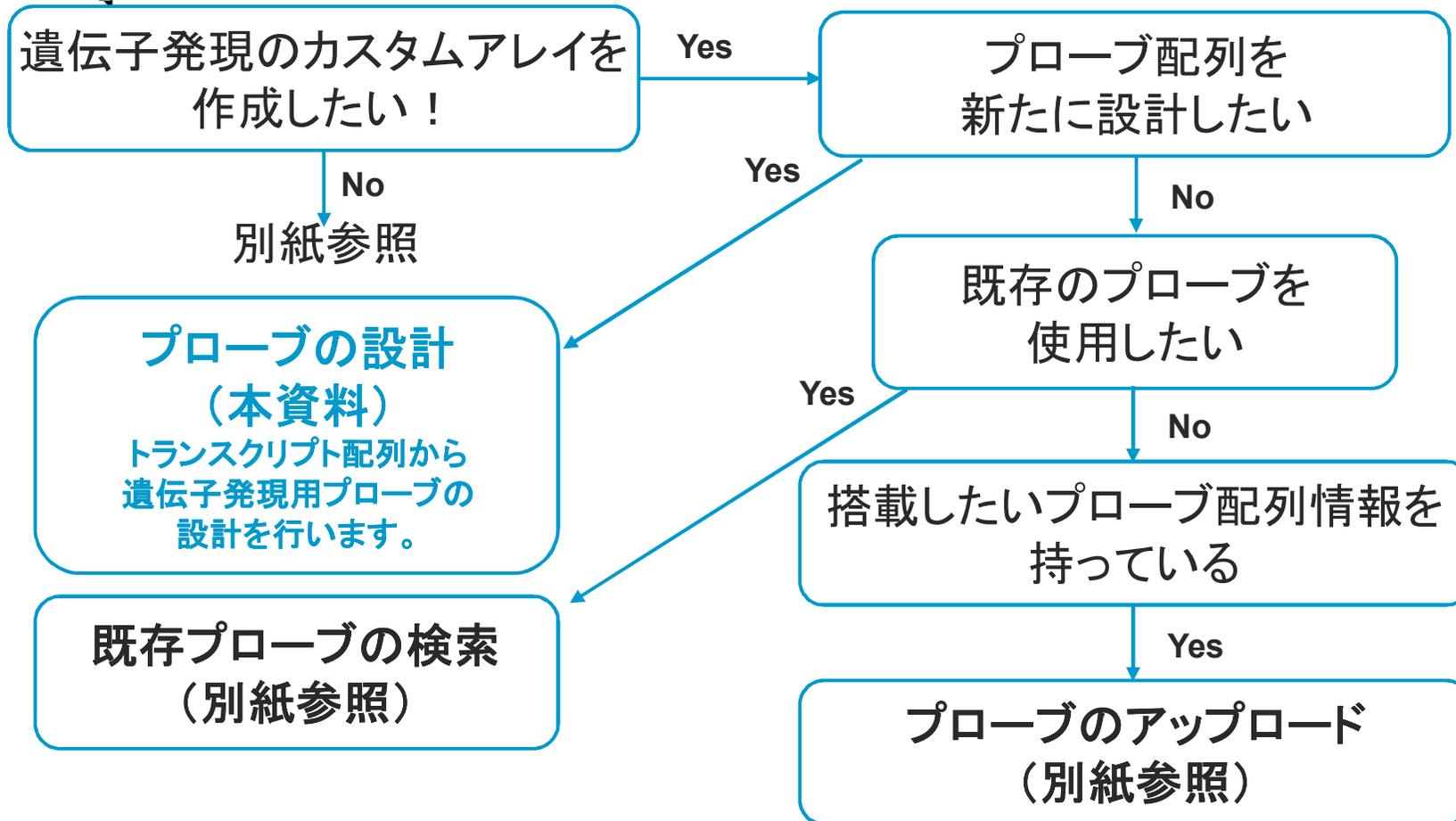
**アレイフォーマットを選択**し、Step1.で保存した**プローブグループを指定**します。複数のプローブグループを指定することもできます(**プローブグループごとに繰り返し搭載数を設定するので、異なる繰り返し数で搭載したいプローブはStep1でプローブグループを分けておく必要があります**)。

カスタムアレイのデザイン作成が終了したら、デザインの確定(Submit)を行います。



この資料ではStep1.プローブグループの作成法について説明します。

# プローブグループ作成法の選択 — 遺伝子発現



# プローブ設計からプローブグループ作成まで

この資料では、遺伝子発現用プローブの設計および設計結果を確認し、プローブグループ化する手順を説明します。

Step.2フォーマットの選択/デザインの確定操作は別紙をご覧ください。

## 内容

遺伝子発現プローブ設計の流れ

遺伝子発現用プローブの設計アルゴリズム

遺伝子発現用プローブの設計にあたって

## プローブ設計操作

1. ターゲットファイルの準備
2. デザインの設定
3. Statusの確認
4. デザイン結果の確認
5. Probe Groupをつくる
6. Probe Groupの確認・変更

## プローブチェック

GE probe Check機能

GE probe Check機能 — 操作

GE probe Check機能 — 結果確認

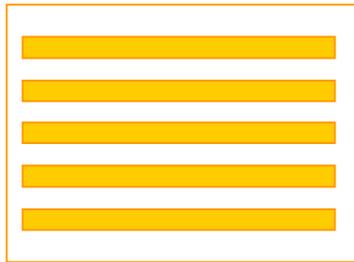


# 遺伝子発現プローブ設計の流れ

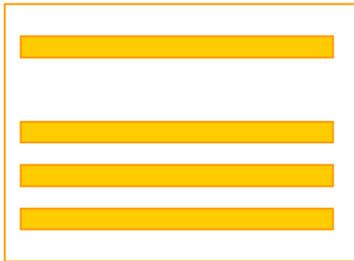
事前に、プローブ設計の元となるターゲットファイル (FASTA形式のトランスクリプト配列リストまたは GenBankのAccessionIDリスト) を1つ用意します。

## eArrayが行うステップ

ターゲット配列のインプット  
(配列あるいはGeneBank ID)



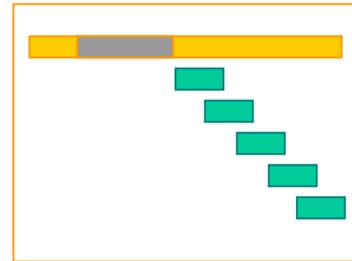
設計可/不可の判断  
配列のクラスタリング



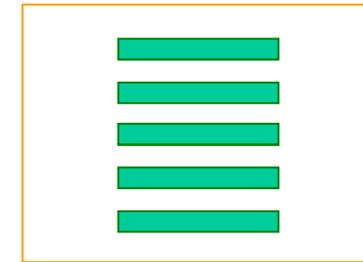
マスキング



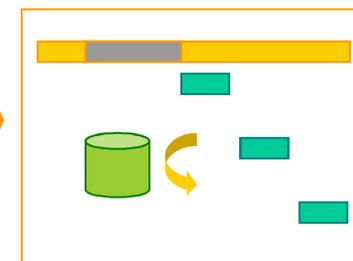
プローブの設計



プローブの報告



相同性のチェック

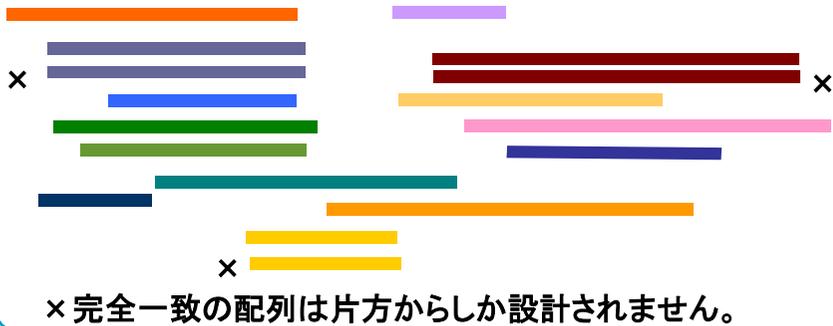


Agilent Technologies



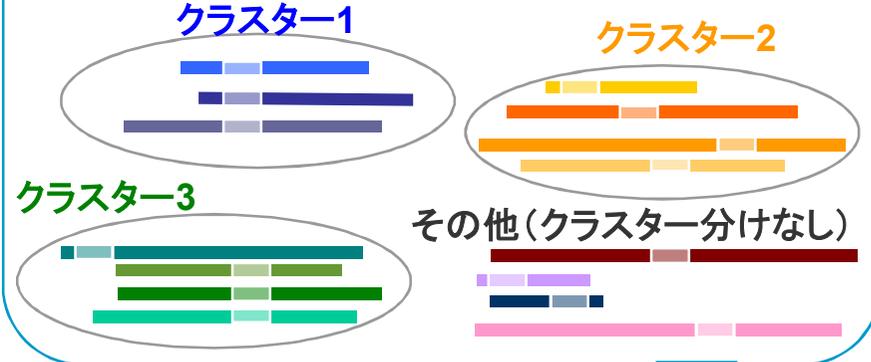
# 遺伝子発現用プローブの設計アルゴリズム

## 入力されたターゲット配列 設計可・不可の判断



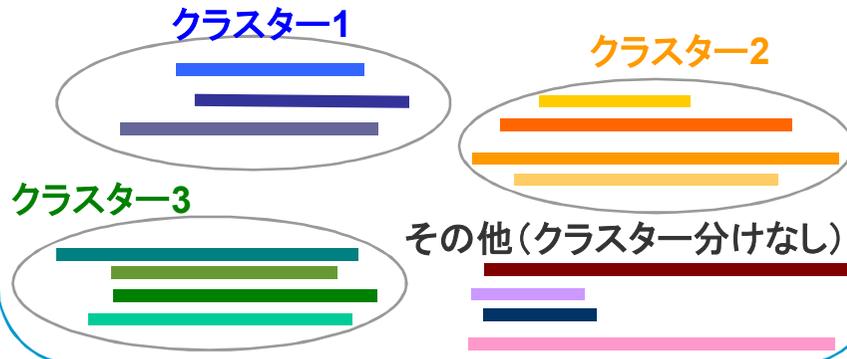
## プローブの設計

- ・ターゲット配列から指定の条件でプローブが設計されます。
- ・クラスター内では、同一プローブが設計されることがあります。



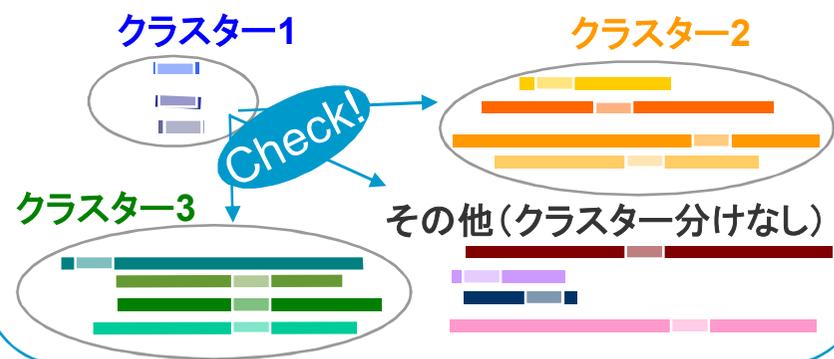
## ターゲット配列のクラスタリング

- ・95%以上相同的な配列は、同一情報由来の配列とみなし、同じクラスターに分けられます。



## 相同性のチェック

- ・クラスター内は、相同性チェックが行われません(同じ配列のプローブが設計されても、クロスハイブリコールは出ません)。



Agilent Technologies



# 遺伝子発現用プローブの設計にあたって

- 似通った配列を持つ複数のターゲット配列から、同じ配列のプローブが設計される場合があります。
- まったく同じ配列を持ったターゲット配列は”Duplicate”と認識され、どちらか一方からプローブが設計されます。1塩基でも異なる場合は、”Duplicate”となりません。
- 各ターゲット配列に対し、設計するプローブ数を最大10まで設定することができます。ただしターゲットの長さや条件によって、指定した数がデザインできない場合があります。
- Vector maskingおよびRepeat maskingは自動的になされます。その結果、指定されたターゲット配列からプローブが設計されない場合もあります。

予めご了承ください。



# 1. ターゲットファイルの準備

ターゲットファイルは、FASTAあるいはAccessionIDリストのどちらかで1つ用意してください。どちらの場合でもファイル名・保存するフォルダ名に日本語・全角文字を入れず、ファイルはZip化してください。また、ファイル名にはスペースを入れないでください。

## FASTA形式のトランスクリプト配列リスト

- 見出し(TargetIDとなる)を先頭の1行目に収め、配列情報を2行目以降に記述します。
- 見出し行は「大なり記号(>)」によって配列データと区別されます。文字数はスペースを含んで**255未満**にしてください。なお最初のスペース以降は結果に反映されません。

```
>NM_012514 Rattus norvegicus breast cancer 1 (Brca1), mRNA  
CGCTGGTGC AACTCGAAGACCTATCTCCTTCCCGGGGGGGCTTCTCCGGCATTTAGGCCT  
CGGCGTTTGG AAGTACGGAGGTTTTTCTCGGAAGAAAAGTTCACTGGAAGTGGAAAGAAATG  
GATTTATCTG CTGTTTCAAGTACAAAATGTCCTTCATGCTATGCAGAAAATC  
TTGGAGTGTCCAATCTGTTTGGAACTGATCAAAGAACC GGTTTCCACACAGTCCGACCAC  
ATATTTTGC AAAATTTGTATGCTGAAACTCCTTAACCAAGAAGAAAGGACCTTCCCAGTGT  
CCTTTGTGTA AAGAAATGAGATAACCAAAAAGGAGCCTAC AAGGAAGTGCAAGG  
>NM_012515  
TGTGGATCTT TCCAGAACAGCAGTTGCAATCACTATGTCTCAATCCTGGGTACCCGCCGT  
GGGCCTCACT CTGGTGCACAGCCTGGGGGGCTTCATGGGAGCCTACTTTGTGCGTGGTGA  
GGGCCTCCGCT GGTATGCTAGCTTGCAGAAAACCTCCTGGCATCCGCCTCGCTGGACACT  
CGCTCCCATCT GGGGCACACTGTATTGGCCATGGGGTATGGCTCCTACATAATCTGGAA  
AGAGCTGGGAG GTTTCACAGAGGAGGCTATGGTTCCCTGGGTCTCTACACTGGTCAGCT
```

見出し行(255文字未満)

配列(A,T,G,Cのみ)

- 配列はIUB/IUPACの核酸コードの簡略版で記述します。
- シーケンスは5'→3'の方向でセンス(コーディング)鎖としてください

## GenBankのAccessionIDリスト

- 各AccessionIDごとに改行し、テキストファイル形式で用意してください。



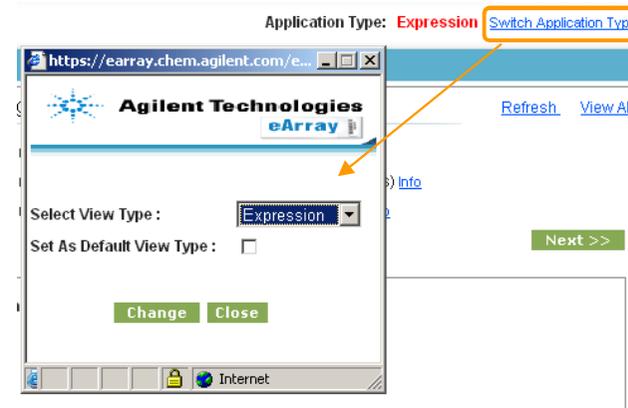
Agilent Technologies



## 2. デザインの設定

1. eArrayのログイン後画面の右上で、アプリケーションタイプがExpressionになっていることを確認します。

アプリケーションタイプを変更するには、“Switch Application Type”をクリックし、“Expression”を選択し”Save”をクリックします。



2. ”Probes”タブを選択し、“GE Probe Design”をクリックします(選択すると白抜きの変ります)。



## 2. デザインの設定

### 3. プローブ設計の設計法を選択します。

#### プローブの設計法

##### ・Base Composition Methodology

真核生物用プローブ設計のAgilentスタンダードです。

Agilentのプラットフォームで最適な性能を示すように、経験的に決定された塩基構成を基準に候補プローブが選ばれます。

##### ・Tm Matching Methodology

原核生物用のプローブを設計するのに適した方法で、候補プローブはTm値を基準に選択されます。

The screenshot shows the Agilent eArray design tool interface. At the top, there are two radio buttons: "Base Composition Methodology" (selected) and "Tm Matching Methodology". Below this, the interface is divided into several sections:

- Probe Details:** Design Job Name (text input), Probe Length (60 bp), Probes per Target (1).
- Masking:** Vector (checked), Repeat (checked).
- Probe Orientation:** Sense (selected), Antisense.
- Design Options:** Best Probe Methodology (selected), Best Distribution Methodology, Design with 3' Bias (checked).
- Target File Details:** Species (H. sapiens), Upload in FASTA Format (Browse...), Upload as Genbank Accessions (Browse...).
- Transcriptome Details:** Use Target File as Transcriptome, Select Agilent-provided Transcriptome (by Species) (H. sapiens), Upload Transcriptome File (Browse...).

At the bottom, there are "Submit" and "Cancel" buttons.

## 2. デザインの設定

**Design Job Name:** 適宜名前をつけてください。

### Probe Length:

25-60 bpのプローブを設計できます。  
アジレントの推奨は60 bpです。  
60 bp以外は保証の対象外です。

### Probes per Target:

各ターゲット配列あたりいくつプローブをデザインするかを指定できます。1~10から選択してください (ターゲットの長さや条件によって、指定した数がデザインできない場合もあります)。  
複数設計した場合、その中からアレイに搭載するプローブの取捨選択を後のステップでできます。

### Probe Orientation:

Sense – センス鎖を設計する(アジレントの実験プロトコルを採用する際はこちらが推奨です)  
Antisense – アンチセンス鎖を設計する

Vector maskingおよびRepeat maskingは自動的になされます。その結果、指定されたターゲット配列からプローブが設計されない場合もあります。

Probe Details	
Design Job Name	<input type="text"/>
Probe Length	<input type="text" value="60"/> bp
Probes per Target <a href="#">Info</a>	<input type="text" value="1"/>
Masking	<input checked="" type="checkbox"/> Vector <a href="#">Info</a> <input checked="" type="checkbox"/> Repeat <a href="#">Info</a>
Probe Orientation	<input type="radio"/> Sense <a href="#">Info</a> <input checked="" type="radio"/> Antisense <a href="#">Info</a>
Design Options	<input checked="" type="radio"/> Best Probe Methodology <a href="#">Info</a> <input type="radio"/> Best Distribution Methodology <a href="#">Info</a>
	<input checked="" type="checkbox"/> Design with 3' Bias <a href="#">Info</a>
<input type="button" value="Submit"/>	

## 2. デザインの設定

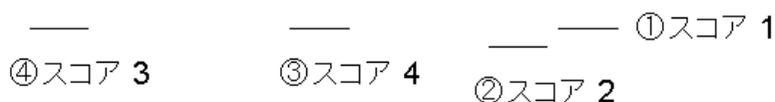
### Design with 3' Bias:

プローブを3'側にバイアスをかけて設計するときにチェックを入れます。Agilentのラベル化キットを使用される場合(あるいはオリゴdTプライマーを使用する場合)には、必ずチェックを入れてください。

### Design Options:

各ターゲットあたり複数のプローブを設計する場合、どちらかの方法を選択する必要があります。

- Best Probe Methodology – 複数プローブの位置は考慮にいれず、スコアのみを基準にして選択
- Best Distribution Methodology – 複数のプローブが均等に配置するようにプローブを選択



Probe Details	
Design Job Name	<input type="text"/>
Probe Length	60 bp
Probes per Target <a href="#">Info</a>	1
Masking	<input checked="" type="checkbox"/> Vector <a href="#">Info</a> <input checked="" type="checkbox"/> Repeat <a href="#">Info</a>
Probe Orientation	<input type="radio"/> Sense <a href="#">Info</a> <input checked="" type="radio"/> Antisense <a href="#">Info</a>
Design Options	<input checked="" type="radio"/> Best Probe Methodology <a href="#">Info</a> <input type="radio"/> Best Distribution Methodology <a href="#">Info</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Design with 3' Bias <a href="#">Info</a>	
<input type="button" value="Submit"/>	

各ターゲットあたり3プローブ設計した場合

Best Probe Methodologyでは①、②、④のプローブが選択されます。

Best Distribution Methodologyでは①、③、④が選択されます。

## 2. デザインの設定

Tm Matching Methodologyを選択した場合は、下記2つの項目も設定します。

### Allow Probes to be Trimmed:

設定されたTmに近づけるため、候補プローブの長さを、設定した長さよりも短くしてよい場合はチェックを入れます。

### Preferred Probe Tm:

デザインするプローブのTmを設定します。指定Tmに一番近く、質のよいプローブが選ばれます。

平均Tm値が近づくように設計されます。

また実験時のハイブリダイゼーション温度を考慮して設定してください。ハイブリダイゼーション温度の20°C程度高く設定します。

Probe Details	
Design Job Name	<input type="text"/>
Probe Length	<input type="text" value="60"/> bp
Probes per Target <a href="#">Info</a>	<input type="text" value="1"/>
Masking	<input checked="" type="checkbox"/> Vector <a href="#">Info</a> <input checked="" type="checkbox"/> Repeat <a href="#">Info</a>
Probe Orientation	<input checked="" type="radio"/> Sense <a href="#">Info</a> <input type="radio"/> Antisense <a href="#">Info</a>
Design Options	<input checked="" type="radio"/> Best Probe Methodology <a href="#">Info</a> <input type="radio"/> Best Distribution Methodology <a href="#">Info</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Design with 3' Bias <a href="#">Info</a>	
<input type="checkbox"/> Allow Probes to be Trimmed <a href="#">Info</a>	
Preferred Probe Tm <a href="#">Info</a>	<input type="text" value="80.0"/> °C

## 2. デザインの設定

4. ターゲットファイルを指定します。

Species: 生物種を選択します。  
該当生物種がない場合はNaを選択します。

“Upload in FASTA Format”あるいは  
“Upload as Genbank Accessions”を選択  
します。

“Browse”をクリックし、事前に用意した  
Zip化した(圧縮した)FASTAファイル  
あるいはAccessionIDリストのファイルを  
指定します。

The screenshot shows a software interface with two main sections: 'Target File Details' and 'Transcriptome Details'. In the 'Target File Details' section, the 'Species' dropdown is set to 'H. sapiens'. The 'Upload in FASTA Format' radio button is selected, and the file path 'C:\Documents and Sett...' is entered in the text box, with a 'Browse...' button to its right. The 'Upload as Genbank Accessions' radio button is unselected. In the 'Transcriptome Details' section, the 'Select Agilent-provided Transcriptome (by Species)' radio button is selected, and the 'Species' dropdown is also set to 'H. sapiens'. There is an empty text box and a 'Browse...' button below this section. An orange arrow points from the 'Browse...' button in the 'Transcriptome Details' section to the 'Browse...' button in the 'Target File Details' section.

ファイル名には全角文字・スペースは入れないで  
ください。

ファイルは、名前に全角文字を含まないフォルダに  
保存をしてください。C:以下に全角が含まれると、  
認識されません。



Agilent Technologies



## 2. デザインの設定

5. クロスハイブリチェック用のデータセットを指定します。設計されたプローブが、目的の配列以外にハイブリダイズする可能性を見ることができます。下記3つから、確認をする対象を選択します。

### Use Target File as Transcriptome:

ターゲットファイル内の配列だけで特異性の確認を行います。ターゲットファイルがほぼ全ての転写物の情報を含む場合に有効です。

### Select Agilent-provided Transcriptome:

Agilentが用意した特異性確認用データセットです。当該生物種がある場合には、このデータセットを指定することを推奨します。

Target File Details	
Species	H. sapiens
<input checked="" type="radio"/> Upload in FASTA Format <a href="#">Info</a>	C:\Documents and Sett... <a href="#">Browse...</a>
<input type="radio"/> Upload as Genbank Accessions <a href="#">Info</a>	<a href="#">Browse...</a>
Transcriptome Details	
<input type="radio"/> Use Target File as Transcriptome <a href="#">Info</a>	
<input checked="" type="radio"/> Select Agilent-provided Transcriptome (by Species) <a href="#">Info</a>	H. sapiens
<input type="radio"/> Upload Transcriptome File <a href="#">Info</a>	<a href="#">Browse...</a>

### Upload Transcriptome File:

Agilentで準備していない生物種で、独自の特異性確認用のデータセットを準備している場合、こちらからそのデータセットを指定してください。データセットは、ターゲットファイルと同様にFASTAフォーマットで準備してください。

## 2. デザインの設定

6. 全ての項目の設定が終わったら、“Submit”をクリックします。

<input checked="" type="radio"/> Base Composition Methodology <a href="#">Info</a>		<input type="radio"/> Tm Matching Methodology <a href="#">Info</a>	
<b>Probe Details</b>		<b>Target File Details</b>	
Design Job Name	<input type="text"/>	Species	H. sapiens <input type="text"/>
Probe Length	60 <input type="text"/> bp	<input checked="" type="radio"/> Upload in FASTA Format <a href="#">Info</a>	<input type="text"/> <input type="button" value="Browse..."/>
Probes per Target <a href="#">Info</a>	1 <input type="text"/>	<input type="radio"/> Upload as Genbank Accessions <a href="#">Info</a>	<input type="text"/> <input type="button" value="Browse..."/>
Masking	<input checked="" type="checkbox"/> Vector <a href="#">Info</a> <input checked="" type="checkbox"/> Repeat <a href="#">Info</a>	<b>Transcriptome Details</b>	
Probe Orientation	<input checked="" type="radio"/> Sense <a href="#">Info</a> <input type="radio"/> Antisense <a href="#">Info</a>	<input type="radio"/> Use Target File as Transcriptome <a href="#">Info</a>	
Design Options	<input checked="" type="radio"/> Best Probe Methodology <a href="#">Info</a> <input type="radio"/> Best Distribution Methodology <a href="#">Info</a>	<input checked="" type="radio"/> Select Agilent-provided Transcriptome (by Species) <a href="#">Info</a>	H. sapiens <input type="text"/>
<input checked="" type="checkbox"/> Design with 3' Bias <a href="#">Info</a>		<input type="radio"/> Upload Transcriptome File <a href="#">Info</a>	<input type="text"/> <input type="button" value="Browse..."/>
<input checked="" type="button" value="Submit"/> <input type="button" value="Cancel"/>			

下記画面が現れたら、“Close”をクリックします。

Design Job Submitted.
You will receive an e-mail when your design job is completed.
<input type="button" value="Close"/>

“Close”をクリックすると、条件入力欄の下方に、設計の状態が表示されます。  
設計の状態をモニターする必要はありません。Statusは目安としてお使いください。  
設計終了後メールが届くので、その後再ログインして内容を確認できます。

### 3. Statusの確認

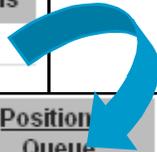
現在設計中のJobの状況が表示されます。“Status”および“Position in Queue”で状況がわかります。“Refresh”をクリックすると、最新の状況に変わります。

Search Results: 1 matching results found

Job ID	Job Name	Status	Design Type	Design Method	Creation Date	Position in Queue	Actions
PI377492179	Demo0207	Designing	Select Best Probes	Base Composition Method	06-Feb-2008	Not in Queue	

Refresh

Job ID	Job Name	Status	Design Type	Design Method	Creation Date	Position in Queue
PI377492179	Demo0207	Completed	Select Best Probes	Base Composition Method	06-Feb-2008	Not in Queue



Status: In Queue デザインの開始待ちあるいはDeleteされたもの

Status: Designing デザイン中

Status: Completed デザイン終了

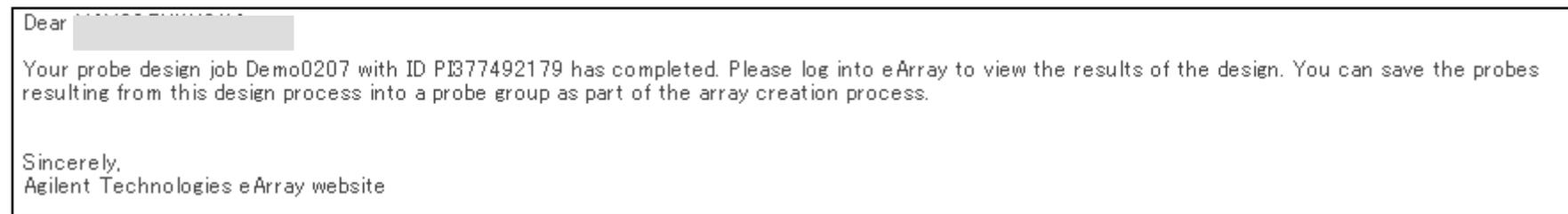
Status: Error 何らかの問題があり、Jobが中断されたもの。ファイルのフォーマット等を確認してください。

Position in Queue: Not in Queue デザイン中である、あるいはQueueに入る前の状態

Position in Queue: Job X of Y Queueのなかでの順番(デザインは開始されておらず、デザイン待ちの状態)

### 3.Statusの確認

プローブのデザインが終了すると、"Status"がCompletedに変化します。  
また、デザインが終了したことを伝えるメールが届きます。

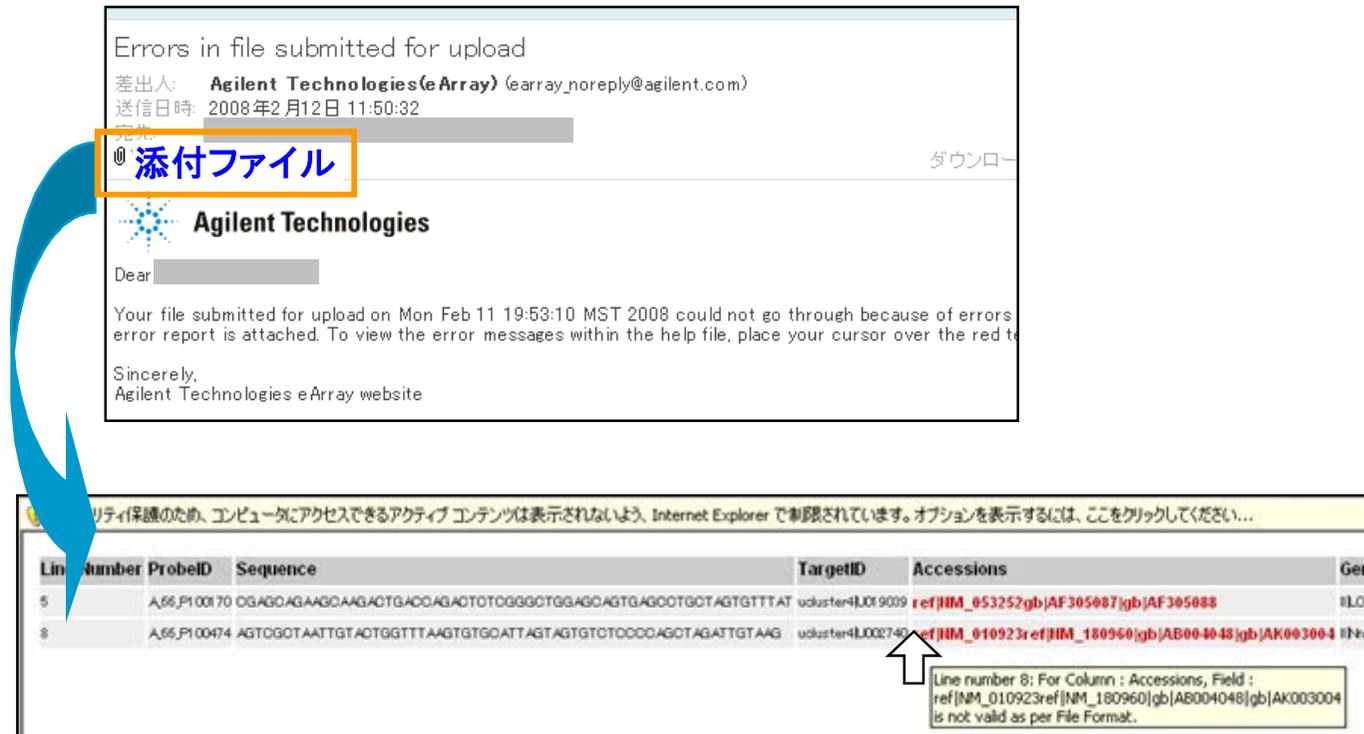


プローブデザインにかかる時間は、サーバーの込み具合等によって変わります。  
数時間から数日かかることもあります(その間、eArrayからログアウト可能です)。

終了あるいは何らかの理由で設計できなかった場合、その旨を知らせるメールが届きます。

### 3.Statusの確認

何らかの理由でプローブ設計が完了しなかった場合、その旨伝えるメッセージメールおよび原因を簡単に記載したファイルが届きます。



Errors in file submitted for upload

差出人: **Agilent Technologies (eArray)** (earray\_noreply@agilent.com)  
送信日時: 2008年2月12日 11:50:32

添付ファイル

Agilent Technologies

Dear [redacted]

Your file submitted for upload on Mon Feb 11 19:53:10 MST 2008 could not go through because of errors. An error report is attached. To view the error messages within the help file, place your cursor over the red text.

Sincerely,  
Agilent Technologies eArray website

Line Number	ProbeID	Sequence	TargetID	Accessions	Gene
5	A.65_P100870	CGAGCAGAGAAGCAAGACTGACCAGACTCTCGGGCTGGAGCAGTGAAGCCTGCTAGTGTAT	ukuster4L019099	ref[NM_053252]gb AF305087 gb AF305088	ILOC1
8	A.65_P100474	AGTCGCTAATTGTACTGGTTTAAGTGTGCAATTAGTAGTGTCTCCCCAGGTAGATTGTAAG	ukuster4L002740	ref[NM_010923]ref[NM_180960]gb AB004048 gb AK003004	ILOC1

Line number 8: For Column : Accessions, Field : ref[NM\_010923ref[NM\_180960]gb|AB004048]gb|AK003004 is not valid as per File Format.

エラーメッセージメールに添付されているファイル(html)を開くと、エラーの原因となったカラムが赤く表示されます。カーソルを持っていくあるいはクリックするとエラー理由が表示されます。ファイル内容を確認・変更後、再度操作を行ってください。



## 4. デザイン結果の確認

設計されたプローブの結果を確認します。

”Probes”タブを選択し、”GE Probe Design”をクリックします。

StatusがCompletedになっているとActions欄に、4つの項目が現れます。  
それぞれのリンクをクリックすると各作業を行うことができます。

**Delete**: デザイン結果ごとJobを削除

**View Design**: デザイン結果の詳細(後述)をeArray内で閲覧

**Download**: デザイン結果の詳細(後述)をファイルとしてダウンロード

クリックしてもダウンロードできないときは、『保存』をクリックするまでCtrlキーを押し続けてください。

**Create Probe Group**: デザインされたプローブをプローブグループとして保存(後述)

Search Results: 1 matching results found							
Job ID	Job Name	Status	Design Type	Design Method	Creation Date	Position in Queue	Actions
PI377492179	Demo0207	Completed	Select Best Probes	Base Composition Method	06-Feb-2008	Not in Queue	<a href="#">Delete</a>   <a href="#">View Design</a>   <a href="#">Download</a>   <a href="#">Create Probe Group</a>

**設計結果は、設計終了後2週間で削除されます。**

**終了後2週間以内にProbe Group化(後述)してください。**

## 4.デザイン結果の確認

デザイン結果の詳細は2つの方法で見ることができます。  
プローブグループ化してからでも数日は確認できます。

- ◆ 前ページでView Designをクリックすると、デザイン結果の一部詳細(各タブ最初の100行)が別ウィンドウで表示されます。

Design Summary : 全プローブの長さやTm値等の情報  
Design Details : 設計されたプローブのリストおよびその配列  
Target Fate : プローブ設計のために使われたターゲットのステータス

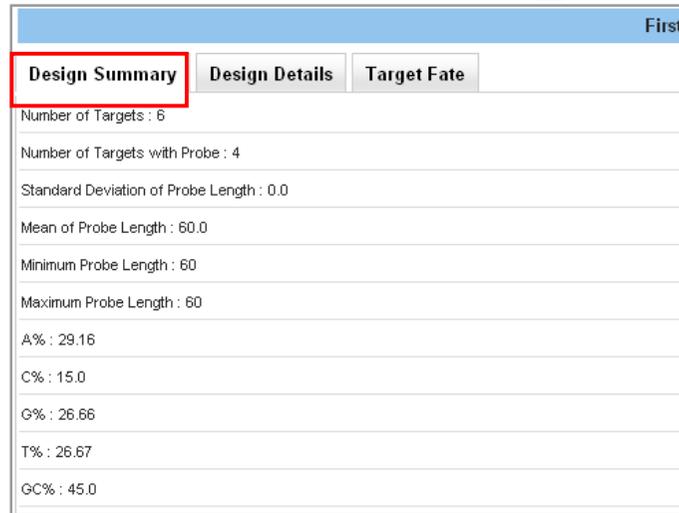
- ◆ 前ページでDownloadをクリックすると、デザイン結果の全詳細情報をファイルとしてPCにダウンロードすることができます。  
クリックしてもダウンロードできないときは、『保存』をクリックするまでCtrlキーを押し続けてください。

MOST\_sum : 全プローブの長さやTm値等の情報(上記Design Summaryに対応)  
MOST\_tdt: 設計されたプローブのリストおよびその構成(Design Detailsに対応)  
MOST\_fate: プローブ設計のために使われたターゲットのステータス(TargetFateに対応)  
MOST\_cluster: クロスハイブリチェック時にトランスクリプト配列がクラスターされたグループのリスト

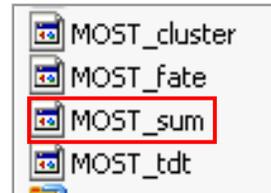


## 4. デザイン結果の確認

### ① Design Summary (MOST\_sum) 全プローブの長さやTm値等の情報



Design Summary	Design Details	Target Fate
Number of Targets : 6		
Number of Targets with Probe : 4		
Standard Deviation of Probe Length : 0.0		
Mean of Probe Length : 60.0		
Minimum Probe Length : 60		
Maximum Probe Length : 60		
A% : 29.16		
C% : 15.0		
G% : 26.66		
T% : 26.67		
GC% : 45.0		



Number of Targets : 提出されたターゲット配列の数

Number of Targets with Probe : プローブが設計されたターゲット配列の数

Standard Deviation of Probe Length: プローブ長の標準偏差

Mean of Probe length: プローブ長の平均

Minimum Probe Length: 最短プローブ長

Maximum Probe Length: 最長プローブ長

## 4.デザイン結果の確認

### ① Design Summary (MOST\_sum) 全プローブの長さやTm値等の情報

A%, C%, G%, T%, GC%: 設計された全プローブの各塩基の含有率

Number of Probes with X-Hyb potential: Design DetailまたはMOST\_tdtで報告される、X-Hybpotentialが1となったプローブの数。

Number of Probes per Target: 各ターゲットあたりの指定された設計プローブ数

Number of Probes: 実際に設計された全プローブ数

Standard Deviation of Probe TM: プローブの持つTmの標準偏差

Mean of Probe TM: プローブの持つTmの平均値

Minimum Probe TM: プローブの持つTmの最小値

Maximum Probe TM: プローブの持つTmの最高値

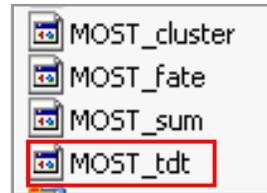
Number of BC\_score Probes: 各塩基組成カテゴリーに分類されたプローブ数。

スコアの値が低いほど(塩基組成の観点から)プローブの質が良い。BC\_1のプローブがもっとも質がよく、BC\_Poorの質が最も低い。

## 4. デザイン結果の確認

### ② Design Detail (MOST\_tdt) 設計された各プローブの詳細情報

First		
Design Summary	Design Details	Target Fate
Target ID	BP Start	Sequence
gii47117697 ref NM_005343.2	990	TGTGGGCCCTTGTGGGCACAGATGGGATCACAGTAAATT
gii42716298 ref NM_203331.1	7515	TAAGCCATCCAGAGTAAAATCTGTTAGATTATCTTGGAGT
gii4502008 ref NM_003977.1	882	TTCCATCCTCAACAAGTACGACGACAACGTCAAGGCCTAC



Target ID: 定義されたターゲットID

BP start: ターゲット配列中のプローブスタート位置(5'→3')方向

Sequence: プローブの配列

Probe Length: プローブの長さ(塩基対の数)

End Dist: ターゲット配列中のプローブスタート位置の末端(3')からの距離。

Agilentのラベル化キットあるいはdT Primerを使ったラベル化法を用いる場合、3'末端から1000bp以内にプローブがあることが望ましい。

Tm:融解温度。プローブの50%が一本鎖、50%が二本鎖と形成する温度

## 4. デザイン結果の確認

### ② Design Detail (MOST tdt) 設計された各プローブの詳細情報

X-Hybpotential: プローブがターゲット以外の配列(2. デザインの設定ステップで指定したトランスクリプト内)とハイブリダイズするかどうかの予測。

1はクロスハイブリシ得るもの、0はしないもの。

注意:

プローブ設計時に分けられた、同じクラスター内ではクロスハイブリチェックは行われません。異なるターゲット配列から同じ配列を持ったプローブが設計された場合、異なるプローブIDが振られ、なおかつX-Hybpotentialは0となります。



同じクラスター内でも完全一致するターゲットをコールさせたい場合は、プローブグループの作成に引き続き、“GE probe check”(後述)を行ってください。



Agilent Technologies



## 4. デザイン結果の確認

### ② Design Detail (MOST\_tdt) 設計された各プローブの詳細情報

**G%:** 各プローブ配列のグアニジン塩基(G)の含有率。

**C%:** 各プローブ配列のシトシン塩基(C)の含有率。

**A%:** 各プローブ配列のアデニン塩基(A)の含有率。

**T%:** 各プローブ配列のチミン塩基(T)の含有率。

**GC%:** プローブ配列内のグアニジンとアデニン(G+C)の含有率。

GC%とTm値の間には強い相関がある。

**PolyX:** 連続した同じ塩基の最大数。例: ATTAGTTTATG の場合、PolyXは3

**X-HybTarget:** プローブがハイブリダイズする可能性が最も高い、ターゲット配列以外の転写産物。このターゲットはクロスハイブリダイゼーションとして影響する可能性が高い。

**Notes (Base Composition Score):** 塩基組成／分布に基づくプローブのクオリティ。

スコアの値が低いほど(塩基組成の観点から)プローブの質が良い。BC\_1のプローブがもっとも質がよく、BC\_Poorの質が最も低い。



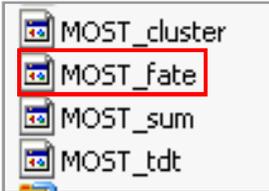
Agilent Technologies



## 4. デザイン結果の確認

### ③ Target Fate (MOST\_fate) プローブ設計の元となったターゲット配列の詳細情報

First 10		
Design Summary	Design Details	Target Fate
Target ID	Status	
gi 47117697 ref NM_005343.2	Duplicate ID	1061
gi 41414141	Duplicate sequence	1061
gi 47117697 ref NM_005343.2	Pass	1061
gi 42716298 ref NM_203331.1	Pass	7678
gi 4502008 ref NM_003977.1	Pass	1244



Status: ターゲット配列の状態を示す。

Pass: 1つ以上プローブが設計されたターゲット配列

Duplicate ID: 設定されたターゲットIDが同じターゲットがあり、プローブ設計がキャンセルされたターゲット配列。同じ配列を持ったものから1つはプローブが設計される。

Duplicate sequence: まったく同じ配列を持つターゲット配列があり、プローブ設計がキャンセルされたターゲット配列。同じ配列を持ったものから1つはプローブが設計される。

Too short: 短すぎてプローブ設計されなかったターゲット配列

Repeat Masked Out: リピートマスクを行った結果プローブ設計が不可能なターゲット配列

Vector Masked Out: ベクターマスクを行った結果プローブ設計が不可能なターゲット配列

Target Length: ターゲット配列の長さ

Probe Generated: 各ターゲットから設計されたプローブの数

## 4. デザイン結果の確認

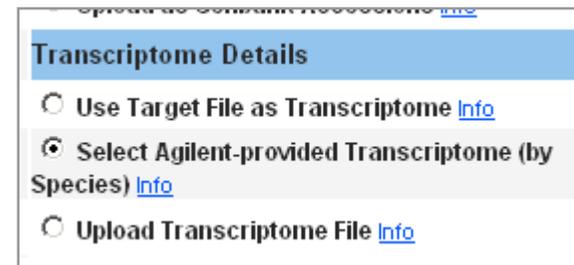
- ④ MOST\_cluster クロスハイブリチェックに用いられたトランスクリプトのクラスター情報  
このデータはファイルをダウンロードすることで見ることができます。  
“View Design”をクリックしても表示されません。

TargetID	ClusterID
gi 47117697 ref NM_0053	1
gi 41414141-2	1
gi 42716298 ref NM_2033	2
gi 4502008 ref NM_00397	3

Target ID: クロスハイブリチェックに用いられたトランスクリプトのID。

Transcriptome DetailsでUse Target Files as Transcriptomeを選択した場合は、  
指定したTarget ID。

Cluster ID: トランスクリプトのクラスター番号。Cluster IDが同じであれば、同じグループに  
クラスターされている。



Transcriptome Details

- Use Target File as Transcriptome [Info](#)
- Select Agilent-provided Transcriptome (by Species) [Info](#)
- Upload Transcriptome File [Info](#)

# 5. Probe Groupをつくる

## —設計プローブを全てグループ化する場合—

1. “Actions”の”Create Probe Group”をクリックします。

Search Results: 1 matching results found

Refresh

Job ID	Job Name	Status	Design Type	Design Method	Creation Date	Position in Queue	Actions
PI377492179	Demo0207	Completed	Select Best Probes	Base Composition Method	06-Feb-2008	Not in Queue	<a href="#">Delete</a>   <a href="#">View Design</a>   <a href="#">Download</a>   <a href="#">Create Probe Group</a>

Refresh

下記メッセージが出たら”Exit”をクリックします。

**Probe Group Creation Job Submitted**

You will receive an email when your probe group has been created

Exit

Probe Groupが作られると、メールが届きます。

Probe Groupができるまでに数時間かかることがあります。

Dear [REDACTED]

Your probe design job Demo0207\_2 with ID PI377493211 has completed. Please log into eArray to view the results of the design. You can save the probes resulting from this design process into a probe group as part of the array creation process.

Sincerely,  
Agilent Technologies eArray website

# 5. Probe Groupをつくる

## —ダウンロードしたファイルを使ってプローブの取捨選択等をする場合—

ダウンロードしたファイルの内容を変更し、eArrayにプローブグループとしてアップロードします。

1. Target Fate (MOST\_fate)を開きます。

必要ないプローブを削除し、別資料(プローブのアップロード)を参照し、決められたフォーマットにしてください。エクセル2007で変更した場合は、エクセル2003のフォーマットで保存してください。

その後eArrayにアップロードしてください(プローブのアップロード、別資料参照)。

ProbeID	Sequence	TargetID	Accessions	GeneSymbols	Description	Chromosomal Location
AB0011234	TGTCCGAA	NM_000000	RefNM_000000	ABC	Unknown	chr3:256-71084
AB0011235	CCCTGAGT	NM_000001	Ref NM_000001	LMN	NA	chr0:0-0
AB0011236	TCTCATCAT	NM_000002	NA NA	NA	NA	chr0:0-0

- ※Gene SymbolやChromosomal Location等の情報を付加することもできます。
- ※プローブの削除はプローブグループ化後に行うこともできます(プローブグループのEdit)。
- ※情報の追加はプローブグループ化後に行うこともできます(再アノテーション、別紙参照)。

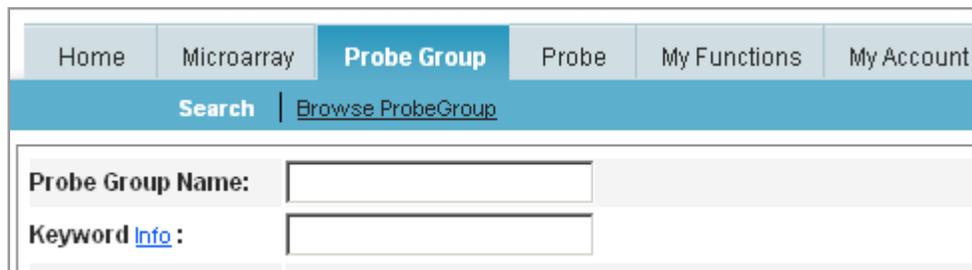
## 6. Probe Groupの確認・変更

2. Probe Groupの内容を確認・変更するにはProbe Groupのリストを表示します。  
リストを表示させるには2つの方法があります。



- 2-1. Probe Groupタブ > Searchを選択します。

プローブグループ名(一部でも可)あるいはKeyword等を入力し(プローブデザイン時のDesign Job Nameが自動的にプローブグループ名になります)、Searchをクリックします。

A screenshot of a search form. The navigation menu at the top includes Home, Microarray, Probe Group (highlighted), Probe, My Functions, and My Account. Below the menu is a blue bar with 'Search | Browse ProbeGroup'. The form has two input fields: 'Probe Group Name:' and 'Keyword [Info](#):'.

- \* デザイン途中で6ヶ月経ったもの、あるいはデザイン終了後6ヶ月間オーダーされなかったデザインは自動的にProbe Groupごと削除されますのでご注意ください。

## 6. Probe Groupの確認・変更

2-2. Probe Groupタブ>Browse Probe Groupを選択します。

“Browse By Folder”内のWorkgroup名のフォルダをクリックすると、右側にフォルダ内に格納されているProbe Groupが表示されます。Probe Group名はプローブデザイン時のDesign Job Nameが自動的につきます。

The screenshot displays the 'View Probe Group' interface. On the left, the 'Browse By Folder' section is active, showing a tree view with 'ROOT' and a sub-folder 'Workgroup名' (highlighted with a red box). The main area shows a search filter for 'Status: Select' and a table of results. The table has columns for 'Probe Group Name', 'No. of Probes', 'High Density', 'Folder', 'Status', 'Created Date', and 'Actions'. One row is visible for 'Demo0207\_2' with 10 probes, low density, in the 'LSCA\_JapanSupportSpace' folder, with a status of 'Incomplete' and a creation date of '07-Feb-2008'. Action buttons like 'Compare', 'Create Microarray', 'Share', and 'Move' are present above and below the table.

<input type="checkbox"/>	Probe Group Name	No. of Probes	High Density	Folder	Status	Created Date	Actions
<input type="checkbox"/>	Demo0207_2	10	false	LSCA_JapanSupportSpace	Incomplete	07-Feb-2008	<a href="#">Copy</a>   <a href="#">Edit</a>   <a href="#">View</a>   <a href="#">Delete</a>   <a href="#">Download</a>

\* デザイン途中で6ヶ月経ったもの、あるいはデザイン終了後6ヶ月間オーダーされなかったデザインは自動的にProbe Groupごと削除されますのでご注意ください。

## 6. Probe Groupの確認・変更

3. “Actions”欄内の、青いリンクをクリックすると各種操作ができます。

**Copy:**プローブグループを複製し、同じ内容のプローブグループを作ります。

**Edit:**プローブの削除、プローブグループ名の変更等ができます。

**View:**プローブグループの内容を閲覧します。

**Delete:**プローブグループを削除します。

**Download:**各種フォーマットでプローブのリストをダウンロードします。

The screenshot displays the 'View Probe Group' interface. On the left, a sidebar shows a tree view under 'AgilentCatalog' with 'Workgroup名' selected. The main content area shows a search filter for 'Status' set to 'Select'. Below the filter, it indicates 'Search Results: 1 matching results found'. A table lists the probe group details:

<input type="checkbox"/>	Probe Group Name	No. of Probes	High Density	Folder	Status	Created Date	Actions
<input type="checkbox"/>	Demo0207_2	10	false		Incomplete	07-Feb-2008	<a href="#">Copy</a>   <a href="#">Edit</a>   <a href="#">View</a>   <a href="#">Delete</a>   <a href="#">Download</a>

Probe Groupの作成が終了したら、Step2.アレイデザインの作成をしてください。

## 6. Probe Groupの確認・変更

### ◆ Probe GroupのEdit画面(内容変更)

**Edit Probe Group**

Probe Group Name Demo Created Date 07/27/2009

Status  Incomplete  Locked Description info

Created By  Keyword info

Folder

Save Probe Group Cancel

Search Results: 8 matching results found

Remove Probes Add new Probes

<input type="checkbox"/>	Probe ID	Accessions	Gene Name	Gene Symbol
<input type="checkbox"/>	CUST_1_PI417455851	<a href="#">refINM_005343.2</a>  gi 47117697		
<input type="checkbox"/>	CUST_2_PI417455851	<a href="#">refINM_005343.2</a>  gi 47117697		
<input type="checkbox"/>	CUST_3_PI417455851	<a href="#">refINM_203331.1</a>  gi 42716298		

グループ名の変更やDescription, Keyword等の追記ができます。また、プローブの削除・追加も可能です。変更後はSave Probe Groupをクリックします。

# 6. Probe Groupの確認・変更

## ◆Probe Groupのダウンロード

Select type to download [Info](#)

TDT  
 FASTA  
 COMPLETE  
 MINIMAL  
 BED

**DOWNLOAD** **CLOSE**

If you have difficulty downloading the desired file, hold the <Ctrl> key until a File Download dialog box appears bypasses pop-up blocking software.

Actions欄のDownloadをクリックすると、ダウンロードするファイルフォーマットを選択できます。  
 ダウンロードできないときには、『保存』をクリックするまでCtrlキーを押し続けてください。

Attribute	TDT	FASTA	COMPLETE	MINIMAL	BED
ProbeID	●	●	●	●	●
Sequence	●	●	●	●	
TargetID	●		●		
Species	●				
GeneName	●				
GeneSymbol	●		●		
Description	●		●		
ControlType	●				
Accessions	●		●		
ProbeGroups	●				
Status	●				
ValidationMethod	●				
Chromosomal Location	●		●		●
CytoBand	●				
GoIDs	●				

ファイル形式によって含まれる情報が異なります(左図参照)。  
 必ずしもすべての情報が含まれるわけではありません。

● — Attribute included in file format



# GE probe Check機能

プローブ設計後に続いて行われる、クロスハイブリチェックのステップでは設計されたプローブと同じクラスターに分けられたターゲット配列とは、同じ遺伝子由来と判断され、クロスハイブリチェックが行われません。

同じクラスターに分けられたターゲット配列ともクロスハイブリチェックを行いたい場合は、GE Probe Checkを使ってください。  
GE Probe Checkではクラスター分けはされません。必要があれば、GE Probe Checkの結果と照らし合わせ、設計されたプローブの取捨選択を行ってください。

## 必要なもの

- ・チェックしたいプローブのリスト  
(・FASTA形式のトランスクリプトのリスト)

チェックしたいプローブのリストは、ProbeIDおよび配列のリストをTDTあるいはFASTA形式で用意し、Zip化してください。

A_23_P253586	CTGTCAGGATTCTAGAACTT
A_23_P217507	AGAAAGACGTTTTCCAACAT
A_24_P538590	TTGACAAACATTTGTATTTG
A_24_P569294	GGCAGCCACTCATGGATTCA
A_23_P259451	GTGAAATGTTCTTTCACCTTG
A_32_P219520	TGGCCAGCTATGTCCTCTAG

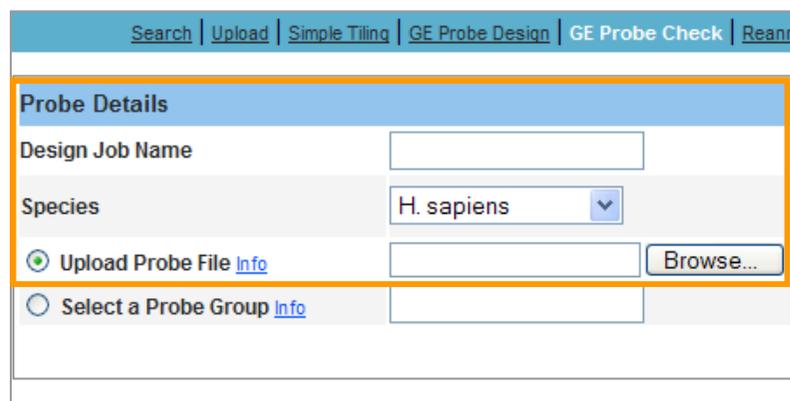
プローブリストの例

# GE probe Check機能 ー操作

1. eArrayにログイン後、Application TypeをExpressionにします。
2. Probeタブ>GE probe Checkと選択します。



3. Job Nameを入力し、Speciesを選択します。  
Upload Probe Fileにチェックを入れ、Browseをクリックします。  
Zip化したファイルを1つ指定します。



The screenshot shows the 'Probe Details' form. It has a blue header with the text 'Probe Details'. Below the header, there are several fields and options:

- 'Design Job Name': A text input field.
- 'Species': A dropdown menu currently showing 'H. sapiens'.
- 'Upload Probe File': A radio button that is selected (indicated by a filled circle). To its right is a text input field and a 'Browse...' button.
- 'Select a Probe Group': A radio button that is unselected (indicated by an empty circle). To its right is a text input field.

# GE probe Check機能 一操作

4. クロスハイブリチェックをするための  
トランスクリプトを指定します。

**None:**クロスハイブリチェックは行いません。  
プローブの質のみが報告されます。

## Select Agilent-provided Transcriptome (by Species):

Agilentが用意した特異性確認用データ  
セットです。当該生物種がある場合には、  
このデータセットを指定することを推奨します。

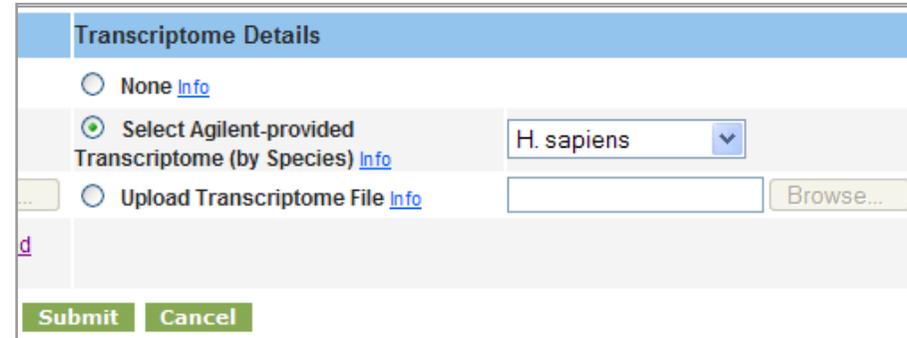
## Upload Transcriptome File:

Agilentで準備していない生物種で、独自の特異性確認用のデータセットを  
準備している場合、こちらからそのデータセットを指定してください。  
データセットは、ターゲットファイルと同様にFASTAフォーマットで準備してください。

設定が終了したら、**Submit**をクリックしてください。

現れた表示でExitをクリックしてください。

eArrayからログアウトしても結構です。プローブチェックが終ると、メールが届きます。

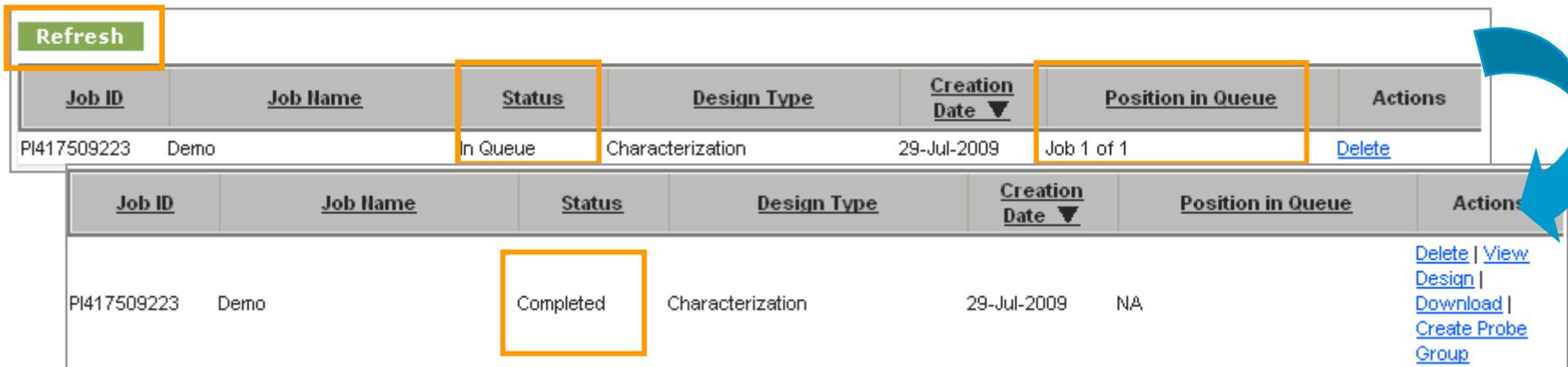


# GE probe Check機能 ー操作

5. チェックが終わるとその趣旨のメールが届きます。

再度ログインした場合は、Probeタブ>GE Probe Checkを選択してください。

現在設計中のJobの状況が表示されます。”Status”および”Position in Queue”で状況がわかります。“Refresh”をクリックすると、最新の状況に変わります。



Job ID	Job Name	Status	Design Type	Creation Date ▼	Position in Queue	Actions
PI417509223	Demo	In Queue	Characterization	29-Jul-2009	Job 1 of 1	<a href="#">Delete</a>
PI417509223	Demo	Completed	Characterization	29-Jul-2009	NA	<a href="#">Delete</a>   <a href="#">View Design</a>   <a href="#">Download</a>   <a href="#">Create Probe Group</a>

Status: In Queue 順番待ち待ちあるいはDeleteされたもの

Status: Completed チェック作業終了

Status: Error 何らかの問題があり、Jobが中断されたもの。ファイルのフォーマット等を確認してください。

Position in Queue: Not in Queue チェック中である、あるいはQueueに入る前の状態

Position in Queue: Job X of Y Queueのなかでの順番(チェックは開始されておらず、デザイン待ちの状態)

# GE probe Check機能 ー結果確認

チェックされたプローブの結果を確認します。  
Probeタブ>GE Probe Checkとクリックします。

StatusがCompletedになっているとActions欄に、4つの項目が現れます。  
それぞれのリンクをクリックすると各作業を行うことができます。

**Delete**: チェック結果ごとJobを削除

**View Design**: チェック結果の詳細(後述)をeArray内で閲覧

**Download**: チェック結果の詳細(後述)をファイルとしてダウンロード

クリックしてもダウンロードできないときは、『保存』をクリックするまでCtrlキーを押し続けてください。

**Create Probe Group**: チェックを終えたプローブをプローブグループとして保存

Job ID	Job Name	Status	Design Type	Creation Date ▼	Position in Queue	Actions
PI417509223	Demo	Completed	Characterization	29-Jul-2009	NA	<a href="#">Delete</a>   <a href="#">View Design</a>   <a href="#">Download</a>   <a href="#">Create Probe Group</a>

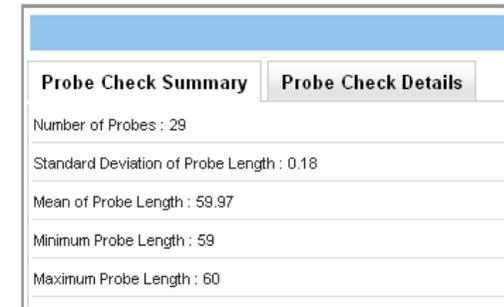
**プローブチェック結果は、チェック終了後2週間で削除されます。**  
**終了後2週間以内に結果の確認をしてください。**

# GE probe Check機能 ー結果確認

チェック結果の詳細は2つの方法で見ることができます。

- ◆前ページでView Designをクリックすると、チェック結果の一部詳細(各タブ最初の100行)が別ウィンドウで表示されます。

Probe Check Summary : 全プローブの長さやTm値等の情報  
Probe Check Details : チェックされたプローブのリストおよび  
その詳細情報

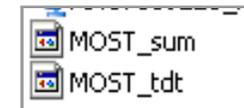


Probe Check Summary	Probe Check Details
Number of Probes : 29	
Standard Deviation of Probe Length : 0.18	
Mean of Probe Length : 59.97	
Minimum Probe Length : 59	
Maximum Probe Length : 60	

- ◆前ページでDownloadをクリックすると、デザイン結果の全詳細情報をファイルとしてPCにダウンロードすることができます。

クリックしてもダウンロードできないときは、『保存』をクリックするまでCtrlキーを押し続けてください。

MOST\_sum : 全プローブの長さやTm値等の情報  
(上記Probe Check Summaryに対応)  
MOST\_tdt: チェックされたプローブのリストおよび  
その詳細情報(Probe Check Detailsに対応)



# GE probe Check機能 ー結果確認

Probe Check SummaryあるいはMOST\_sumの内容

Number of Probes :提出されたターゲット配列の数

Standard Deviation of Probe Length: プローブ長の標準偏差

Mean of Probe length: プローブ長の平均

Minimum Probe Length: 最短プローブ長

Maximum Probe Length: 最長プローブ長

A%, C%, G%, T%, GC%: 全プローブの各塩基の含有率

Number of Probes with X-Hyb potential: Probe Check DetailまたはMOST\_tdtで報告される、X-Hybpotentialが1となったプローブの数。

Number of Probes with Identified Targets: ターゲットが報告されたプローブ数

# GE probe Check機能 ー結果確認

Probe Check SummaryあるいはMOST\_sumの内容

Standard Deviation of Probe Tm: プローブの持つTmの標準偏差

Mean of Probe Tm: プローブの持つTmの平均値

Minimum Probe Tm: プローブの持つTmの最小値

Maximum Probe Tm: プローブの持つTmの最高値

Number of BC\_score Probes:各塩基組成カテゴリーに分類されたプローブ数。

スコアの値が低いほど(塩基組成の観点から)プローブの質が良い。BC\_1のプローブがもっとも質がよく、BC\_Poorの質が最も低い。

# GE probe Check機能 ー結果確認

Probe Check DetailsあるいはMOST\_tdtの内容

ProbeID: チェックされたプローブのID

Sequence: プローブの配列

Probe Length: プローブの長さ

Tm: 各プローブのTm値

A%, C%, G%, T%, GC%: 各プローブの各塩基の含有率

PolyX: 同じ塩基が連続している場合、その塩基数

BC score: 各プローブのスコア

スコアの値が低いほど(塩基組成の観点から)プローブの質が良い。BC\_1のプローブがもっとも質がよく、BC\_Poorの質が最も低い。

# GE probe Check機能 ー結果確認

Probe Check DetailsあるいはMOST\_tdtの内容

Predicted Target: 予測されたターゲット(プローブがハイブリダイズするだろう目的ターゲット)

X-HybPotential(X-Hyb): Predicted Target以外のトランスクリプトが、クロスハイブリダイズする可能性が高いと予測される場合は1、ない場合は0

X-HybTarget: Predicted Targetの次にプローブと相同性が高いターゲット

## 注意

プローブと各ターゲット間の自由エネルギー $\Delta G$ を計算し、 $\Delta G$ が1番高いものがPredicted Target、2番目のターゲットがX-HybTargetと報告され、X-HybTargetの $\Delta G$ がある基準以上の場合、X-HybPotentialが1となります( $\Delta G$ の基準は公開していません)。したがって、X-HybPotential(X-Hyb)が0でもX-HybTargetが報告されます。