Agilent Genomic Workbenh 7.0 簡易版操作 説明書

(2013年7月)

※操作速度を速めるにはメモリー設定の変更が有効です。 変更方法は

インストールガイド

http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public /G3800-90046 Installation.pdf

Windows使用の方はp.6、Machintosh使用の方はp.13以 降をご参照ください

コピー数変化検出フロー まとめ(フローチャート)

	Agilent Genomic Workbench 7.0 - [CGH]: TR120404
Home: デザインファイルのインポート	Home Sample Manager Workflow Preprocessing Analysis Discovery Reports View Iool Help
Home: 数値化ファイルのインポート	User User Save GOTO Gene/Genomic Import Strott Create Experiment Save Result Incation Import Incation
Experimentの作成	
Experimentにデータを入れる	
Preprocessing: Feature Filter > DefaultFeatureFilter ON	🔀 Agilent Geromic Workberch 7.0 - [CGH]; TR120404 🖂 🖂 🛋 🔀
Preprocessing: Design Filter> DefaultDesignFilter v1またはv2 ON	Hgme Sample Manager Workflow Preprocessing Analysis Discovery Reports Yew Tool Help Santch Application Fibres Array Feature Design Controllation Controllation Design Controllation Design Design Design Initial angline fragment f
Preprocessing: Normalization> GC correction ON	
Preprocessing: Normalization> Centralization ON	
Preprocessing: Combine>Replicates> Intra array ON	
Analysis: (Moving Average の表示)	Image: Aglient Genomic Workbench 7.0 - [CGH]: TR120404 Hgme Sample Manager Workflow Preprocessing Analysis Discovery Reports Yew I ool Help
Analysis: Aberration ON (ADM-2, threshold 6)	Moving Average (Log Ratio) Aberration Aberration Show Algorithm Line Widdw Show Algorithm Threshold Fuzzy Zero State Parameters SNP CM Manually Show Algorithm Line Widdw Mindow Mindow Mindow Mindow SNP CM Manually Show Algorithm Line Widdw Mindow Mindow Mindow Mindow SNP CM Manually Show Algorithm Line Widdw Mindow Mindow Mindow Mindow Mindow Show Algorithm Line Widdw Mindow Mindow Mindow Mindow Show Algorithm Line Widdw Mindow Mindow Mindow Mindow Show Algorithm Line Widdw Mindow Mindow Mindow Mindow Mindow Mindow Mindow Mindow Mindow 0.1 Show Show Mindow Mindow
Analysis: Fuzzy Zero ONまたはOFF (ONにより擬陰性を生じさせる可能性もある)	
Discovery: Aberration Filter> DefaultAberrationFilter v2 (もしくはv1) ON	Right Adjectiv Centromic Wondbecktin 7.0 - [Comp Int20404 Higher Sample Manager Workflow Preprocessing Analysis Discovery Reports View Tool Help Aberration Common Aberration Generate Filters
Experimentを選択する	kerence
データの選択 Experimentのデータを右ク リック > Select	
複数データの共通変化領域の検索 Discovery: Common AberrationやGraphical	Agilent Genomic Workbench 7.0 - [CGH]: TR120404
Penetrance Report: ・Aberration> TextもしくはGraphical ・Cyto Reports	Home Sample Manager Workflow Preprocessing Analysis Discovery Reports Yiew Tool Help Aberration Aberration & LOH Aberration & LOH Penetrance Cyto Cyto Manager Text Text Text Text Probe Cyto
•Penetrance > Probe	2

ライセンス入力の方法

- 30日間無料デモライセンス インストーラ、デモデータセットの ダウンロードサイト
- 他ソフトウェアと同じPCにインストールする場合のコンパチビリティ
- PC要件
- ソフトウェアの起動
- ライセンスの認識

30日間無料デモライセンス インストーラ、デモデータセット のダウンロードサイト

http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=2167

Download Software - Agilent Genomic Workbench

Please follow the download instructions below to access the full functionality of the application. At the end of the 30-day trial period, please request a quote for a permanent license for each module. For clinical research with human samples, Agilent CytoGenomics Software is available free of charge.

Download Instructions

- 1. Review the System Requirements and Software Compatibility
- 2. Download 30-day trial license
- 3. Download Genomics Workbench software
- 4. Download datasets for analysis

他ソフトウェアと同じPCにインストールする場合のコンパチビリティ

Software Compatibility - Agilent CytoGenomics Software

	AGW 6.5 standard*	AGW 7.0 AGW 6.5 lite	CytoGenomics 2.5	GeneSpring 12.0
FE 11.5	Yes	Yes	Yes	Yes
FE 11.0	No	Yes	Yes**	Yes
FE 10.7	Yes	Yes	Yes	Yes

*AGW 6.5 standard is installed with FE 10.10 as a package which can interfere with the installation of FE 11.0. **FE 11 must be installed first before Cytogenomics 2.5 is installed.

PC要件

Genomic Workbench - Details & Specifications

PC and Mac version	
Programs	Any program that enables you to open PDF files (for example, Adobe® Reader®)
Hard disk space	From 40 GB to 500 GB (large datasets require more space)
Display resolution	1280 x 768 or higher

PC version	Minumum	Recommended
Operating system	32-bit Windows XP-SP2, 64-bit Windows 7 Enterprise or Professional	64-bit Windows 7 Enterprise or Professional
Processor	> 2.0 GHz	> 3.0 GHz
Working memory (RAM)	4 GB	8 GB

Mac version	Minumum	Recommended
Operating system	Macintosh OS X v10.5.x	Same
Processor	3.0 GHz Intel Core 2 Duo	Same
Working memory (RAM)	4 GB	8 GB

For both versions review software compatibility

ソフトウェアの起動

1. 画面左下の"Start"からAgilent Genomic Workbench 7.0 を選択







5. OKをクリック

Data Location	×
Data Location Data C:\Program Files\Agilent\Agilent Genomic Workbench Lite E	
Please specify the location where microarray and experimental data should be store	:d.
	ancel

5

ライセンスの認識

1. DNA Analyticsの右の "License"をクリック



	User Preferences	×
2. Applicationを選択 (例:CGH)	Tracks Miscellaneous Please provide license information to activate the cgh functionality of Agilent Genomic Workbench. Host Name = 2CE946CCYT Select Analysis Application: cgh Server Location	
3. この部分に ライセンスをCopy & paste 🛛 📥	Text License Please paste your license text in the area below:	-
4. OKをクリック	Ok Cancel Apply	

データのインポートと これから解析するデータの選択

■ゲノムファイルのインポート(human•mouse•ratの場合は不要)

■Design Fileのインポート(必須)

■Feature Extraction 数値化データ(.txt ファイル)のインポート (必須)

■Experimentの作成(必須)

ゲノムファイルのインポート(human・mouse・ratの場合は不要)

操作の意味: Designを入れる前に、CytoBand情報や遺伝子情報のデータをAgilent Genomic Workbenchに インポートします。



※上記以外の生物種のゲノムファイルはeArrayからダウンロード可能です。(p.37参照)

Agilent Technologies						Help Release Notes Log out
	Workspa	ice 🚺	Collaborati	ion	Public	Welcome Yuko Sawada (Agilent)
Home Microarray Probe	e Group Prob	e My A	Account	Data		CGH Switch Application Type
Search Upload Geno	mic Tiling <u>Reannota</u>	te Score	e Custom Pro	ibes DN/	A Analytics Dov	vnload
Species	: A. gambiae	~				
File Format	: Cytoband 🛩					
Genome Build	: anoGam1 🛩					
	Download		lf you have appears. T	difficulty his bypa	downloading t sses pop-up b	he desired file, hold down the <ctrl> key until a File Download dialog box locking software.</ctrl>

Design Fileのインポート (必須)

操作の意味: これからインポートするマイクロアレイデータのDesign FileがAgilent Genomic Workbenchに入っていないと、データをインポートできません。 Design FileはeArrayからダウンロード可能です。



Close

Feature Extraction 数値化データ(.txt ファイル)のインポート (必須)

操作の意味: 解析するデータをAgilent Genomic Workbenchにインポートします。基本的に、Feature Extractionで数値化したデータを用います。



Experimentの作成(必須)

操作の意味:同じ条件で一緒に解析するデータを選択します。



2. New Experimentを選択



3. Experimentの名前を(自由 に)入力。OKをクリック



4. Dataから Experimentに入れるデータを選択



Switch 4

前準備から解析まで

- ■Feature Filterをかける(推奨)
- ■Design Filterをかける(<mark>推奨</mark>)
- ■GC Correction をかける(推奨、かつCGH+SNPマイクロアレイ解析時は必須)
- ■Centralization をかける(推奨、かつCGH+SNPマイクロアレイ解析時は必須)
- ■Intra Array のReplicate probe データをCombine する(推奨)
- ■Aberration Filterを設定する(推奨)
- ■Aberration 検出アルゴリズムを設定(<u>必須</u>)
- ■Fuzzy ZeroをONにする(オプション、場合によっては有用)
- ■Nesting Filter をかける(オプション)
- ■SNPおよびLOH 解析の実施(CGH+SNPマイクロアレイ解析時に必須)
- ■Experiment の選択(<u>必須</u>)
- ■画面に表示させるデータを選択(<u>必須</u>)

Pieprocessing 操作の意味:SaturatedとFeatureNonUniformity Outlierのフラグが立ったデータ、およびLog2Ratio=0*の データの排除

* Cy3とCy5の両方のシグナルが低く、Log2Ratioの値に精度を欠くデータ



3.Applyを選択し、DefaultFeatureFilterのチェック ボックスをクリック



1. Preprocessing > Feature Filters を クリックし Edit Filterをクリック

📓 Agilent	Genomic Work	bench Lite B	dition 6.5 - [CG	H]:	
H <u>o</u> me	<u>S</u> ample Manager	<u>W</u> orkflow	<u>P</u> reprocessing	<u>A</u> nalysis	<u>D</u> iscove
Filters Array Filters	Feature Filters	Design Filters	malization C Correction Apply Window Size 2Kb	Plot Distribution	
Search	Apply	•			Open App

2. Newをクリック

Edit Fea	ature Level Filters				
Name	Select Filter			*	
	Attribute	Operator	Value	Logical Oper	New Condition
					Delete Condition
Inc	ude matching values	Exclude mate	thing values		

- 3. 名前を入力してOKをクリック
- 4. New Conditionをクリックし条件を追加します。



dit Fea	ature Level Filters —				
lame	LRO			†	
	Attribute	Operator	Value	Logical Opening	New Condition
Featu	reNum	• = •	•		Delete Condition
_		•			
Incl	lude matching values	Exclude matcl	hing values		



Feature Level Filters				D
Edit Feature Level Filters Name LRO			\$	
Attribute	Operator	Value	Logical Ope	New Condition
PValueLogRatio		•	AND =	Delete Condition
gProcessedSignal		+	AND 🔹	
rProcessedSignai gMedianSignal		+	AND +	
rMedianSignal gBGSubSignal rBGSubSignal	Exclude match	hing values		
New Update	Reset	Delete	Rename	⊆lose

15

⊆lose

9. Feature Filter をクリックし、Apply を選択し、 さらに新しく作成した(5. で設定した名前の) Filterの チェックボックスを選択します。



Feature Level Filters Edit Feature Level Filters \$ Name LR0 Value Logical Operator New Condition •••• AN true Delete Condition AND + OR AND + ching values ⊆lose

Operato		Attribute
=	-	JIsSaturated
	-	
	-	
	=	
	=	
<u>Exclude</u> mai	es 🔘	 Include matching values
Reset		New Lindate

Edit Feature Level Filters

Attribute

Name LR0

gIsSaturated

rIsSaturated

New

gIsFeatNonUnifOl rIsFeatNonUnifOL LogRatio

Include matching value

Update

7. Logical Operator の 🗾 をクリックし、

ダウンリストから OR を選択



						•	
			_			_	
Opera	ator	Valu	e	Logical	Ope		New Condition
=	\$	true	\$	OR	÷	n	
(=	÷	true	+	OR	\$		Delete Condition
=	+	true	+	OR	+		
<u>n</u>	-	true	+	OR	+	¥	
=	-	Contraction of the second				-	

📓 Agilent	Genomic Workb	ench Lite E	dition 6.5 -	[CG	H]:
H <u>o</u> me	<u>S</u> ample Manager	<u>W</u> orkflow	<u>P</u> reprocess	sing	<u>A</u> na
Filters Array Filters	Edit Filter	Design Filters	malization C Correction Apply Window 2Kb	J Size	F Dist
	A Frev	Default-	HLRO		
Data		-			-
igin Data Igino igino i		LRO			

Reset



操作の意味: non unique probe のデータの排除(ただし偽常染色体領域のプローブは表示)

- 1. Preprocessing を選択
- 2. DesignFiltersをクリック



3. Apply を クリックし、

DefaultDesignFilter_v2 のチェックボックスを 選択。

(偽常染色体領域のプローブもデータから排除した い場合はDefaultDesignFilter_v1を選択。)

📓 Agilent	Genomic Work	ench Lite E	dition 6.5 - [CG	H]:
H <u>o</u> me	<u>S</u> ample Manager	<u>W</u> orkflow	<u>P</u> reprocessing	<u>A</u> nalysis
Filters Array Filters	Feature Filters	Design Filters	malization C Correction upply Window Size 2Kb	Plot Distribution
Search		Apply	No Filter	
Data	Pre	w Next		nFilter_v2

PTEDTOCESSING

GC Correction をかける(推奨、かつCGH+SNPマイクロアレイ解析時は必須)

Preprocessing 操作の意味:GC correction はゲノムの領域にGC含量に関係する "wavy"アーチファクトを補正するアルゴ リズムです。このようなアーチファクトが原因で生じるAberrationや SNP コピー数、LOH callを抑えます。

※GC correctionをかけるときはPlot DistributionからGC correction後のCGHデータのLog2Ratio分布を 確認します。

Agilent Genomic Workbench 7.0 - [CGH]: TR120404 0 1. Preprocessing を選択 Home Switch Applicati Combine Design Filte Intra Array Group By QC Metric Fuse ▼ 281 Amt Cv3 used(ug) pplication Type: CGH æ 🗩 🗩 3: 0-549999, 1.1 Mb Plot V 🔺 🗸 Sos N... 🗩 🛛 😽 US11063876_25298301134.... Hs_hg19_CNV_201: 828-1 p24.3 p24.1 p22.3 p23.32 p14.3 p14.1 CH3 p14.1 p12.3 p12.1 ļ CGH_EXF Gene List Tracks Probe ID List

Normalization

2. GC Correction の Apply をクリック

-Normalization -)		rrection	
Diploid Peak	Legacy Threshold	Bin Size Apply	Window Size 🏅	Dist
	<mark>Е</mark> 6.0	10	2КЬ 🔹	Distribution

3. window sizeによりGC 含量を考慮する範囲を 設定します。デフォルトは2kbで、 Plot Distributionを確認しながら値を調整します。

XPlot Distribution

Log ratioの分布がGC correctionをかけることによ りピークがシャープになっていることを確認。

右図

- 赤: GC correction前
- 青:GC correction後





Centralization をかける(推奨、かつCGH+SNPマイクロアレイ解析時は必須)

Preprocessing 操作の意味: Centralization では各LogRatio値に一定の値を加えLogRatioをより中心(Log₂Ratio=0)に移 動させるアルゴリズムです。(最もcommonなploidyをLog2Ratio=0に移動させる)

※2倍体領域がmajorityでない場合は、かけなくてもよい

- Agilent Genomic Workbench 7.0 [CGH]: TR120404 0 1. Preprocessing を選択 Home Help Switch Applicat Combine -Design Arra Filter Intra An Group By QC Metric Fuse Amt Cv3 used(ua) 6.0 10 . Application Type: CGH iearch æ 🔎 3: 0-549999, 1.1 Mb ScatterPlot Y 🔺 🔻 N... 📦 💙 😽 US11063876_25298301134... Hs_hg19_CNV_201; 128:3 128:2 Ħ p24.3 p24.1 p22.3 p22.3 p21.2 p21.2 p14.3 CH3 p14 p12 p12 H CGH_EXF Gene List Tracks Probe ID List
- 2. Centralization Diploid Peak の チェック ボックスをクリック
- ※Legacy はAGW6.5以前の方法に基づく Centralication

-Normalization Centralization Diploid Peak	Legacy Thresho	ld Bin Size	-GC Corr Apply	rection Window Size 2Kb	Plot Distribution
			_		

Piepiocessing 操作の意味: Intra-array replicates は同じマイクロアレイ上の同じプローブ配列をもつfeature※の結果を1 つにします。(※Design Fileに含まれるプローブ情報に基づく) このような繰り返しプローブを1つに "combine" することは、解析に際の統計的検出力を増加させます。



スがマークされていることを確認してください。 もしされていない場合はマークしてGoをクリック。

Combine		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Design	Replicates	
	Intra Array Inter Array	Group By
Fuse		Amt Cy3 used(ug) 🗧 😡

Aberration Filterを設定する(推奨)

操作の意味:検出されたコピー数変化領域について、条件によりFilterをかける。 例:染色体位置上隣接する連続プローブ3つ以上の領域、変化Log₂Ratio >= 0.25 の領域、等。



3. Apply を選択し、

DefaultAberrationFilter_v2のチェックボックスをクリック。

このフィルターで 「染色体位置上、隣接する連続プローブ<mark>3つ以上</mark>の領域」かつ 「変化Log₂Ratio >= 0.25 の領域」 のみを抽出します。



もし、変化Log₂Ratioの閾値をさらに小さくしたい場合は(たとえばモザイク性のあるcaseの場合など) 下記の方法もあります。

方法その1 DefaultAberrationFilter_v1 を選択

「染色体位置上、隣接する連続プローブ3つ以上の領域」 「変化Log₂Ratio の閾値なし」 のみを抽出します。Fuzzy Zero (p.23)の併用をお勧めします。



Discovery

<mark>方法その2</mark>新たに 「染色体位置上、隣接する連続プローブ<mark>5つ以上</mark>の領域」 「変化Log₂Ratio >= 0.15の領域」

という Filter を作成する。

①Edit Filter を選択

📓 Agilent Gen	omic Workbe	
H <u>o</u> me <u>S</u> amp	ple Manager	
Г — — — — — — — — — — — — — — — — — — —		
Aberration Filters	ABC Text	
Edi	t Filter	
Search Ap	ply 🕨	

②New をクリック

ame	Select Filter	_	÷	New
		AMP	DEL	Update
Min	imum Number of Probes in Region			Reset
Min	imum Size (Kb) of Region			Delete
Mir	imum Absolute Average Log Ratio of Region			Rena
Ma ach co	ximum Nesting Level Us	e Nesting i deletion is i	n Legacy Mo reported.	ide, Oose

③Filterの名前を入力してOKをクリック



Discovery

 ④Minimum number of probes in region: 5
 Minimum absolute average log ratio for region: 0.15
 と入力して、かつそれぞれの項目のチェックボックスを 選択する。
 Update をクリック。
 そしてClose をクリック。

※Nesting フィルタもかけたい場合は Maximum Nesting Levelの項目にチェックし 数字を入力

⑤Apply を選択し、 新しく作成したFilterのチェックボックスをクリック。





Aberration 検出アルゴリズムを設定(必須)

操作の意味:aberration 検出アルゴリズムを下記の中から選択します。

- Z-score
- ADM-1 (Aberration Detection Method 1)
- ADM-2 (Aberration Detection Method 2)(推奨)
- CBS (Circular Binary Segmentation)
- HMM (Hidden Markov Model)

※ Z-scoreとHMM はSNP解析では使用できません。

1. Analysis を選択 –

2. Algorithm の項目から ADM-2 (推奨)を選択。

Agilent Genomic Workbench 7.0 - [CGH]: TR12040

Triangular 🗣 1 🗣 3 pt

Moving Average (Log Ratio)

Threshold に 6.0 (推奨)を入力し、

(コンピュータのキーボードの)Enter キーを押す。

Aberration Threshold Fuzzy Zero State Parameters No. of States 5

Reports

p28.3 p25.2 p24.3 p24.1 p22.3 p22.32

\$.0

ADM-2

SNP Analysis SNP Copy Number Calculate D.0

Ma. Reassig

€ 👂 3: 0-549999, 1.1 Mb

U511063876_25298301134..

Analysis

- 0

Switch Application

olication Type: CGH

Y 🔺 🔻

3. Show のチェックボックスを選択します。



各種アルゴリズム



•Z score

固定されたWindow size (ユーザ定義)領域のAberrationを 検出する。

Baselineより有意にLogRatioが離れているプローブがenrich されている領域を検出。Thresholdが高いほど、厳しい条件に なる。固定したサイズでのAberration検出を行うアルゴリズム のため、あまり推奨していない。

SNP解析時にはこのアルゴリズム使用不可。

•ADM-1

統計的なスコアリングに基づき、高(低)LogRatio値を持つ領 域を検出。多様なAberrationの検出を行う。

・ADM-2(推奨)

ADM-1の統計的スコアリングに類似するが、各LogRatio測 定のデータquality情報も加味して行われる。LogRatio値に加 えて、Probe Log Ratio errorが考慮されることにより、データ がノイジーなprobeを含んでいるときに小さなAberration領域 を検出したい時など、ADM-1よりもさらに結果がrobustになる。

Fuzzy ZeroをONにする(オプション、場合によっては有用)

操作の意味: Fuzzy Zeroを選択すると、各Aberration interval に "global error model" を適合し、検出します。 結果としてAberration call error を低減します。 例として、下図のような、ノイズに起因しうる "Long Low" (広い領域、低いLogRatio) のAberration を排除する ことができます。

強いフィルタのため擬陰性を生む可能性もあります。



2. Fuzzy Zeroのチェックボックスにチェックを入れる

-Aberration-				
Show	Algorithm	Threshold	Fuzzy Zero	State Parameters
	ADM-2	6.0	Turn On	No. of States 5
0.1 🔟		50		FDRQ 0.5

Analysis

Fuzzy Zeroによる検出結果への影響例





Nesting Filter をかける(オプション)

Analysis 操作の意味: ADM-1、ADM-2 アルゴリズムはNested aberrationを検出します。Nested Aberrationとは他の Aberration中に含まれるAberrationを意味します。 検出させるNested AberrationをNesting Levelにより規定することができます。

Nesting Filter は Aberration Filterに含まれています。P.21をご参照ください。



例: Nesting Level Filterなし



例: Nesting Level Filter ON (0)



SNPおよびLOH 解析の実施 (CGH+SNPマイクロアレイ解析時に必須)

操作の意味: ADM-1、ADM-2 アルゴリズムはNested aberrationを検出します。Nested Aberrationとは他の Aberration中に含まれるAberrationを意味します。 検出させるNested AberrationをNesting Levelにより規定することができます。 ※ADM-1 もしくは ADM-2のAberration 解析の併用が必須。



2. SNP Analysis のCaluculateのチェックボック スにチェックを入れる。 SNP CN Conf. Lebvel は**0.95**を入力。

Manually reassign peaksは、現在リリースされているマイクロアレイについてはOFF

※あらかじめ Aberration のチェックボックスに チェックをしておく必要があります。

-SNP Analys	sis	/	
-SNP Copy Calculate	Number SNP CN Conf. Level	Manually Rejassign Peaks	Calculate Threshold
	0.95		6.0



3. (SNP Analysis のCaluculateのチェックボッ クスにチェックを入れると、LOHのチェックボック スが選択可能な状態になります。) LOHのCaluculate のチェックボックスをチェッ クします。Thresholdは6にします。

Г	SNP Analysis	
	SNP Copy Number	LOH-
	SNP CN Manually Calculate	Calculate Threshold
	Conf. Level Reassign Peaks	
	0.95 📰	p.
	Calculate Conf. Level Reassign Peaks	6.0

SNP CN Conf. Level

マイクロアレイデータ上の各SNPについてSNP Copy Numberか計算されますが(ASCNアルゴリズム)、その数が整数値±"1-Confidence level 値"以内であれば出力するという意味。 LOHの結果には影響せず、画面上の表示、およびSNP genotype output に影響します。 (SNP genotype output では、Confidence Level 外の SNP は"N"で表示) SNP confidence level は0.95 推奨

LOH

LOHアルゴリズムにより、heterozygous SNP call が統計的有意に失われている領域をCopyneutral genomic 領域として検出します。アルゴリズムはLOHスコアが、定義されたThreshold以 上となる領域を出力します。Thresholdの開始値は6.0を推奨。Thresholdが高いほどより条件が stringentになります。

Analysis

Experiment の選択 (必須)

操作の意味: Experimentを選択することで解析が開始されます。



2. Yesをクリック



3. 解析が開始され、結果が画面に表示されます。

画面に表示させるデータを選択(必須)

操作の意味:選択されたデータのみ画面に表示されます。またコピー数変化領域・LOH領域のレポート出力 を行う際、選択されたデータの内容のみレポートに含まれます。



2. その下のNode (右例では 中 Can+田 029830) の 中 をクリック (この数字(例029830) はマイクロアレイのDesign IDを意味する)

3. さらにその下のNode (右例では 🖮 🔤 hg19) の 🖨 をクリック (この数字(例 hg19) はgenome build を意味する)

4. さらにその下のNode (右例では ^{中・一 Arrays}) の 中 をクリック



5. 現在Experimentに入っているデータが表示されます。 色がついているものが「現在選択されて画面に表示されているデータ」 を意味します。

Experiment × ₁₂⊡ DINP GENIO Gaca Ё…Сан+器 029830 ⊡…Build hg19 🚊 -- 🔄 Arrays US23502418 JS23502418 JS23502418 Ξſ Ð JS23502418A <u></u> US23502418 Experiment ≖ ₆₇∎ SINF GENO Gata Ё…Сан+器 029830 🖻 --- Build hg19 🖨 -- 🔄 Arrays I US23502418 US23502418 Select 🖺 US2: Select for Calibration 🗐 US2: Rename Delete My Entity List Show Properties Entities 🕀 💼 Gene List Cyto-Report 🗄 🗠 💼 Tracks QC Metrics Edit Array Color... Edit Array Order... Genotypes

6. データ名を右クリックし、**Select**を選択すると、 データを選択することができます。 また、現在選択されているデータを右クリックして **Deselect**を選択すると選択解除できます。

7. ソフトウェア画面の下のほうに表示されている表の上の部分

U52350241 U523502418_ U523502418_ U523502418_ U523502418_



8...ソフトウェア画面の下のほうに表示されている表の上の部分を コンピュータのキーボードのControlキーを押しながら左クリックすることで 選択/選択解除を行うこともできます、

画面上でのデータの精査

- •データの精査1:画面に表示させる内容を決める方法
- ・データの精査2:画面に表示させる領域を決める方法
- •データの精査3:複数データを選択しているとき、データ表示形態を設定 •データの精査4:データの表示向きの変更(オプション)
- •データの精査5: 既存の公的データベースと比較する(重要)

データの精査1:画面に表示させる内容を決める方法

操作の意味:画面に表示させたいデータ内容(Aberration, Scatter Plot, SNP, LOH など)を設定します

- 1. Viewを選択します。
- 2. View Preferenceをクリックします



3. View Preferenceが表示されます。

/iew Alignment						
Orientation		Rendering Style				
Horizontal	 Vertical 	 Overlaid 	Stacked			
Data Visibility		Rendering patterns				
View All views	\$	Design type	CGH			
Scatter Plot	Scatter Tool Tip	Styles				
Moving Average	Aberration	Log Ratios	+ sign			
-		Green Intensity	+ sign			
	Log ratio error envelope	Red Intensity	Circle			
Penetrance plot	Common Aberration	Moving Average	Continuous			
<u> </u>	<u> </u>	Aberration	Semi transparent filled			
Green Intensity	Red Intensity	SNP Copy Number	Colored filled circle			
SNP Copy Number	E LOH	LOH	Continuous			
Configure Scales		Configure Coloring schemes				
Log Ratios	Signal Intensities	Log Ratios	Signal Intensities			
Apply Range 4	Apply Range (10 ¹) 4	Color by Log Ratio Values	Color by Channels			
SNP Data	Scatter Plot (Chr View)	SNP Data				
Apply Range	Point Size 3	Show SNP Data Panel	Configure Color and Range			

4. Configure Coloring schemes \mathfrak{C}

Log Ratios

(Scatter Plot、Moving Average、 Aberrationを表示したい時)

- •Signal Intensities (Cy3およびCy5のSignalを表示したい時)
- SNP Data

(SNP copy number, LOHを表示したい時)

のチェックボックスを選択します。

Configure Coloring schemes	
Log Ratios	Signal Intensities
Color by	Color by
Log Ratio Values 🔷	Channels 🔷
SNP Data	1
Show SNP Data Panel	Configure Color and Ranges

View

5. Data Visibility でViewをAll Viewsにし、





データの精査2:画面に表示させる領域を決める方法

操作の意味:染色体、およびその一部を拡大表示させたい場合に。

1. Genome View 上で染色体をクリック。



2. 1でクリックした染色体が**Chromosome View** に表示されます。 Chromosome View上で、クリック&ドラッグ により、さらに領域を選択すると、



3. 2で選択された領域がGene View に拡 大表示されます。

Gene Viewで現在中心になっているデータ ポイントが、**Tab View**で青くハイライトされ ます。





データの精査3:複数データを選択しているとき、データ表示形態を設定

操作の意味:複数データを選択しているときに、重ね合わせて表示させたり並べて表示させたりすることが できます。

View



データの精査4:データの表示向きの変更(オプション)

操作の意味:データ表示の方向を、縦向きと横向きに切り替えることができます。



View

データの精査5: 既存の公的データベースと比較する(重要)



6. Species を選択。

7. Build を選択。

8. Track Nameを入力

9. Browseをクリックし、ImportするTrack fileを選択。

Import Tra	ck		
Species	H. sapiens	•	Color
Build Name	hg17	\$	Change
Track Name	[
Track File	[Browse
			<u>C</u> ancel

Import Tra	ick		
Species	H. sapiens	+	Color
Build Name	hg17	\$	Change
Track Name			
Track File			Browse
			Cancel

Import Tra	ack	
Species	H. sapiens	Color
Build Name	hg17	Change
Track N		
Track File	[Browse
		<u>Q</u> K <u>C</u> ancel
Import Tra	ack	
Import Tra Species	ack (H. sapiens	Color
Import Tra Species Build Name	H. sapiens	Color
Import Tra Species Build Name Track Name	H. sapiens	Color Color
Import Tra Species Build Name Track Name Track File	Ack H. sapiens hg17	Color Color Change Browse

10. **OK**をクリック

①eArrayにログインし、Application TypeをCGHに設定します。

Agilent Technologies				Help Release Notes Log Out
	Workspace	Collaboration	Public	Welcome Yuko Sawada (Agilent)
Home Microarray Probe G	Group Probe My	Account Data		CGH Switch Application Type
Search Upload Genomic	Tiling Reannotate Sco	re Custom Probes	NA Analytics Dov	vnload
Species :	A. gambiae 🛛 👻			
File Format :	Cytoband 🔽			
Genome Build :	anoGam1 💌			
	Download	f you have difficulty (appears. This bypas	downloading the sses pop-up blo	e desired file, hold down the <ctrl> key until a File Download dialog box cking software.</ctrl>

②Probeを選択し、DNA AnalyticsDownloadを選択

Agilent Technologies				Help Release Notes Log Out
	Workspace	Collaboration	Public	Welcome Yuko Sawada (Agilent)
Home Microarray Probe	Probe M	ly Account Data	1	CGH Switch Application Type
Search Upload Genom	c Tiling <u>Reannotate</u> <u>Sc</u>	ore Custom Pr	NA Analytics Dov	nload
Species :	A. gambiae 🛛 🗸			
File Format :	Cytoband 💌			
Genome Build :	anoGam1 💌			
	Download	If you have difficulty appears. This bypa	downloading the asses pop-up blo	desired file, hold down the <ctrl> key until a File Download dialog box cking software.</ctrl>

③Speciesで生物種を選択。Genome Buildも選択。

Agile	nt Technologie	es				Help Release Notes Log Out
	CATTUY	P W	orkspace	Collaboration	Public	Welcome Yuko Sawada (Agilent)
Home	Microarray	Probe Group	Probe M	ly Account Data	3	CGH Switch Application Type
<u>s</u>	earch Upload	Genomic Tiling	annotate Sco	ore Custom Probes	DNA Analytics Dov	vnload
	Sp.	ecies: A. gamb	iae 🗸			
	File F	ormat: Cytobar	d 🗸			
	Genome	anodan		If you have difficult	downloading the	desired file, hold down the <ctrl> key until a File Download dialog box</ctrl>
		Downi	bad	appears. This byp	asses pop-up blo	cking software.
	+ 2 7-	マイルた遅	eto I	Download	たわい	м А
	907	パイルを建	きがし、	_	- 277	
Spe	cies: H	l. sapiens	~			
File For	mat: C	Cytoband .		~		
Genome E	Build : C	NV				
	C	pGIsland				
		ytoband		T T		
	0	AR				
	S	NP Genotyp	e Referer	nce ,		
upport. extra	<u>y rerms</u> n	hiRNA				

補足:Track Fileを自分で作成するときのフォーマット

下図のような、(左から)Chromosome Number, Start Position, End Position, GenomicNameの情報 を含むbedファイルで作成します。(昇順に並べ替えます)

	A	В	С	D		
1	Chrom	Chrom Start	Chrom End	Name		
2	chr1	58953	59871	OR4F5		
3	chr1	357521	358458	OR4F3		
4	chr1	357521	358458	OR4F16		
5	chr1	610960	611897	OR4F3		
6	chr1	610960	611897	OR4F16		

各種データの出力

■SNP Genotype Reportの作成

■SNP Aberration & LOH Reportの作成

- ■CGH コピー数変化領域の テキストレポート作成
- ■CGH・LOH 簡易サマリレポート(CytoReport)作成

操作の意味: SNP検出結果を出力します。

- 1.Reportを選択します。
- 2. **. SNP Genotype Text**を クリック



	10 -											
Aberration Report Manager	shick Pre	genotype Text	Aberration & co	H P etra	eports	pew Io	or Telb				Sa	itch Applicat
Search	Open Applicat	tion Genomic	Viewer Sample	RRY)							Applica	stion Type: (
	1 2 3	4 6 6	7 0 9 10	11 12	148.93 111		0.01.02.03.04.0	10 100 10001		B 336128-732274	02,89 SoutterPlot	
ta ≝a ⁰ Ceta ⊢ Grap → Corpession → Corpession → Corpession → Corpession					p36.21 p36.12 B38.7 p34.2 p33 p32.2 p31.3 p31.1				3M6 72.33M6			0.90 0. 2.0 .
periment <u>∞</u> g ^a	13 14 15	18 17 18	19 20 21 22	хY	21.3 p21.3 p12 ²	ł.		- 🧶	72.6			~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
a Cuperments ⊢in Coti,£99 ⊢in Test ⊢in SNP					421.2 2222 424.1 424.2 4 424.2 4 424.2 4 424.2 4 424.2 4 424.2 4 424.2 4 424.2 4 424.2 4 424.2 4 424.2 4 424.2 4 424.2 4 424.2 4 4 4 4			1	72.93 Mb			•••
					432.2 849.12	f			2			9
ly Entity List ≝g ⁰					942.2				3.22			
- 🔛 Gene List				1	-				1			
	Arrays SNP	Calbration	Arrays									
	ProbeName	ChrName	Start	Stop	FeatureNum	US2350241	U523502418	U523502418	US23502	418_ US23502418_		
3 745	A_16_P153	chr1	163743695	163743754	54124	0.242	0.301	0.137	0.060	0.163		
enotypes <u>s</u> a ⁿ	A_16_P153	chr1	163764240	163764299	28111	-0.015	0.028	-0.042	-0.054	-0.048		
Genocypes A Mal E (NA18507 V1)	A 16 0001	che1	163011431	163011490	120170	-0.100	0.005	-0.076	0.134	0.210		
- EUROPEAN MALE (NA12891 VI	A_10_P001	cre 1	163651933	163051982	120179	-0.013	0.020	0.141	0.134	0.008		
. VORUEA FEMALE (NA10517_V1	A_10_P1/8	che1	1630/0184	1630/0243	10922	-0.146	0.030	0.130	0.310	0.111		
CHINESE FEMALE (NA18579_VI	A_10_P103	cre1	163903901	10.3433960	10015	-0.100	0.009	0.130	0.319	0.111		
EUROPEAN FEMALE (NA12878	A_16_P153	CTF1	100947694	103947753	13215	0.379	0.004	0.000	0.210	0.010		
- e TEST2	a in Pist.	1141	10.7469991	100 0000014	1901.25	11.11/9	11100	11.1991	11.126	0.150		-

3. Output formatとファイルの保存場所を設定して、Saveをクリック。

Compete Genome: 全染色体の結果を1
 つのファイルで出力

・Per-Chromosome: 染色体ごとに別ファイルで出力

🖼 SNP Genotype Report Setup	
Output Format	
Complete Genome	OPer-Chromosome
Select File Location	
	Browse
	Save Cancel

出力例

Fuzzy Z	ero: ON								
Nesting	g Level: OFF								
Combir	ne Replicates (In	tra Array): ON							
Combir	ne Replicates (In	ter Array): OFF							
Genom	e: hg19								
Aberrat	tion Filters: NON	E							
Feature	Level Filters: g	IsSaturated = true OR rIsSaturated = tr	ue OR glsFeat	lonUnif	DL = true OR rIsF	eatNonUnif	OL = true; li	nclude mat	ching va
Design	Level Filters: NC	INE							
Array Le	evel Filters: NON	IE							
Metric	Set Filters: NON	E			<u> </u>		k±±₽		
Genom	ic Boundaries: N	ot Applied			G	enotype	「同¥IX		
Assigne	ed Genotypes: Tr	isomy 21= European Male (NA12891_v	(1)						
Index	ArrayName	ProbeID	SNP ID	Chr	SNP Position	Genotype	p-Val	Log Ratio	
Frisomy	/ 21								
	1 Trisomy 21	A_20_P00100005, A_20_P00201911	rs6686003	chr1	1089699	GG	3.000021	-0.08443	
	2 Trisomy 21	A_20_P00100009, A_20_P00201915	rs35242196	chr1	1333598	CC	1.000026	0.264069	
	3 Trisomy 21	A_20_P00201917, A_20_P00100011	rs17160977	chr1	1341185	NN	NaN	0.183687	
	4 Trisomy 21	A_20_P00100012, A_20_P00201918	rs3855951	chr1	1804302	π	3.000371	0.03736	
	5 Trisomy 21	A_20_P00100018, A_20_P00201924	rs2843160	chr1	2309082	GT	1.999959	-1.02995	
	6 Trisomy 21	A_20_P00201926, A_20_P00100020	rs1129333	chr1	2335676	GG	2.0003	0.028242	
	7 Trisomy 21	Δ 20 P00201929	rs16825139	chr1	2426598	NN	NaN	-2 84F-05	

操作の意味:コピー数変化領域とLOH領域を出力します

1.Reportを選択します。

2. Aberration & LOH Textをクリック



How Sande Hanger Works	tow Pres	recessing ienotype Text 4 6 0	Analys Aberration Television 7 0	is on & COP ext Sample U 9 10	11 12	Reports rance Probe \$28,833 \$20,22 \$20,22 \$20,22 \$20,22 \$23,22 \$23,22	Yere Cyto Reports	<u>Iool</u> Help	0	1000 (P) 9- 121	€ 336128-73227	402,89 SoatterRot	ation Type: D
Alternation Present Statistics Statisti	she d	Test 4 0 0	Aberration of the second secon	an â Lor at Ianpie () 9 10	11 12	Probe	Cyto Reports		0) 100 100		P 336128-73227	Apple 402, 89 ScatterPto	ation Type: D
starch / / / / / / / / / / / / / / / / / / /	1 2 3		7 0	9 10	11 12	第 第 第 第 第 第 第 第 5 7 5 7 5 7 5 7 7 7 7 7	2110128	1			■ 336128-73227	402, 89 ScatterPict	ation Type: D
	1 2 3			9 10	11 12	部 第11日 第11日 第11日 第11日 第11日 第11日 第11日 第11	2101234		0 100 100		∋ :336128-73227	402,89 ScatterPlot	
						p32.2 p31.3 p31.1	1			3Mb 72			000000
speriment set		16 17 10	19 20	21 22	X Y	21.5 21.7 21.7 21.7 21.7 21.7 21.7 21.7 21.7				72.9Mb 72.6			
9 945						842.12				2.56	1		9
Entities					_	943				23.2			1 1 1
- Gene List	*												
Tracks	TAPS SAPE	Calbration	Arrays										
P	robeliane	ChrName	Start	-	Stop	FeatureN	um US235	0241 U52350241	8 1 U52350241	B : US23502	418 US23502418		
74+ A	_16_P153	chr1	163742	3695	163743754	54124	0.242	0.301	0.137	0.060	0.163		
notypes 🗶 🖉 A	_16_P153	chr1	163764	4240	163764299	28111	-0.015	0.028	-0.042	-0.054	-0.048		
Genotypes A	_14_P137	chr1	163811	1431	163011490	49869	-0.188	-0.065	-0.076	-0.009	-0.218		
YORUBA MALE (NA18507_V1) A	_16_P001	chr1	163851	1933	163851992	120179	-0.013	0.028	0.141	0.134	0.008		
EUROPEAN MALE (NA12891_V1 A	_18_P178	chr1	163870	0184	163870243	3 70422	2111PM				Sec. 8		
YORLEA FEMALE (NA10517_V1 A	_18_P103	chr1	163903	9901	163903960	0 09727	-0.166	0.039	0.138	-0.319	0.111		
- CONNECC PERMIE (NATION /	_16_P153	chr1	163947	7694	163947753	3 13215	0.379	0.084	0.386	0.210	0.018		
TEST2	16 P153	intert	163965	0899	163965609	a IB/0125	n.n29	0.098	0.099	in.n26	0.151		
	02963	Selected	Arrays										
143 160				_								19100-001	

出力例

Fuzzy Ze	ro: ON												
Nesting	Level: OFF												
Combine	e Replicates (Intra	Array): Of	N										
Combine	e Replicates (Inter	Array): O	FF										
Genome	: hg19												
Aberrati	on Filters: NONE												
Feature	Level Filters: gls	Saturated :	true OR rl	sSaturated	l = true OR gIsF	eatNonUn	ifOL = tru	e OR rIsFea	tNonUnifO	L = true; In	clude mate	ching value	es=false
Design L	evel Filters: NON	E											
Array Lev	vel Filters: NONE								_				
Metric S	et Filters: NONE						A	MP: 瑁	唱				
Genomi	Boundaries: Not	Applied					D	EL: 欠乡	ŧ				
Assigned	d Genotypes: Triso	omy 21= Eu	iropean Ma	le (NA128	91_v1)		10	ЪН					
Index	ArrayName	Class	Chr	Cytoband	Cytoband Size	Start	Stop	Туре	#Probes	p-Val	AvgCGHLF	Gene Nan	nes
Trisomy	21												
	1 Trisomy 21	CGH	1	p36.32	44.0 pt	2524117	252416	AMP	1	8.65E-08	1.331011	MMEL1	
	2 Trisomy 21	CGH	1	p36.31	53.0 pt	6186024	618607	7 DEL	1	5.52E-15	-2.19152	CHD5	
	3 Trisomy 21	CGH	1	p36.22	49.0 pt	12123411	1212346	AMP	1	2.38E-10	1.653887	TNFRSF8	
	4 Trisomy 21	CGH	1	p36.13	9.47 Kb	17241750	1725122	AMP	3	3.93E-13	0.961842	CROCC	
	5 Trisomy 21	CGH	1	p34.2	44.0 pt	40137553	4013759	7 AMP	1	2.64E-10	1.548694	NT5C1A	
	6 Trisomy 21	CGH	1	p34.2	57.0 pt	40688273	4068833	DEL	1	1.88E-07	-1.17502	RLF	
	7 Trisomy 21	CGH	1	p32.3	59.0 pt	55697160	5569721	DEL	1	2.47E-10	-0.90506		
	8 Trisomy 21	CGH	1	p32.2	47.0 pt	57044899	5704494	AMP	1	2.13E-09	1.434295	PPAP2B	
	7 Trisomy 21 8 Trisomy 21	CGH CGH	1	p32.3 p32.2	59.0 pt 47.0 pt	55697160 57044899	5569721 5704494	DEL AMP	1	2.47E-10 2.13E-09	-0.90506 1.434295	PPAP2B	

CGH コピー数変化領域の テキストレポート作成

操作の意味:コピー数変化領域を出力します

- 1.Reportを選択します。
- 2. AberrationのTextを選択



P Agilent Genomic Workbench Lite Editio	on 6.5 - [CGH] SNP								and the	
Home Sample Manager Workflow Pr Aberration SNP Pepert Text Capitical	eprocessing Analysis Genotype Aberration & U Text Text Text	n P etra	Beports co be	<u>y</u> lew <u>I</u> ox orts	k Helb				Sn	itch Applicati
Search Open Applica	tion Genomic Wewer Sample	Utiley							Applica	stion Type: C
Image: Second	4 6 7 7 8 10 4 6 7 7 7 7 7 5 1000000000000000000000000000000000000	11 12 сополности на на на на на на ексертет е се с					12.22.Mb 72.43 Mb 72.	B 336128-732274	22,89 SouterRot	
Arrays SNP	Calbration Arrays	1.0								
Probeliane A 16 PIS2	chritiane Start	300p	reacureNum 54124	0.242	0.201	0.137	0.060	0.163		
enotypesR A 16 P153	. chr1 163764240	163764299	28111	-0.015	0.028	-0.042	-0.054	-0.048		
Genotypes A_14_P137	dr1 163811431	163811490	49869	-0.188	-0.065	-0.076	-0.009	-0.218		
YORLBA MALE (NA18507_V1) A_16_P001	. dv1 163851933	163851992	120179	-0.013	0.028	0.141	0.134	0.008		
EUROPEAN MALE (NA12891_V1 A_18_P178	dr1 163870184	163870243	70422	gan h	0	10050		and the second s		
YORUBA FEMALE (NA18517_V1 A 18 P103	. chr1 163903901	163903960	89727	-0.166	0.039	0.138	-0.319	0.111		
CHINESE FEMALE (NA18579_VI A 16 P153.)	. chr1 163947694	163947753	13215	0.379	0.084	0.386	0.210	0.018		
EUROPEAN FEMALE (NA12878 A 16 P153	rbrt 163965550	163965609	80125	0.029	0.058	0.099	0.026	0.151		
Carrier Carrier Carrier	Selected Arrays									_
14 F Control Martin	Second second								1100-00-00-00-00-00-00-00-00-00-00-00-00	

3. 出力形式と出力先を選択。 Saveをクリック。

	GH Aberration Report Setup	. 🔀
+	-Report Type Probe Based Interval Based Probe & Interval Based	Output Format Complete Genome Per-Chromosome
	Select File Location	
		Browse
	Report Flat Intervals	Save Cancel

CGH・LOH 簡易サマリレポート(CytoReport)作成

操作の意味:解析内容がすでに決まっている場合は、Cyto Report機能を用いて Feature Extractionのtxtデータから ダイレクトにpdf形式のレポートを作成することが可能です。



4. 名前を入力して、OKをクリック



5. Addをクリックし Reportに出力する データのAttribute 情報を設定

Select Sam	ple Attributes	×
Select?	Attribute Name	
	Amt Cy3 used(ug)	
	Amt Cy5 used(ug)	
	Array Fab date	
	Array ID	2
	Array type	- 8
	ArraySet	
	Comments	
	Cy3 sample	
	Cy5 sample	
	Extraction Status	
	Global Display Name	
	Green Sample	
	Hyb Date	
	Hyb temp	
	Hyb time	Ă
	Hyb'd By	ŧ
	OK Cancel	

Repo, X Design/Edit Cytogenetic Report Templates - Cyto Report Settings Analysis Settings SNP Analysis Setting Chromosome and Interval Selection Report Settings Sample Attributes Name Cyto ÷ Name Display Name Default Value Array type Array type ArraySet ArraySet omments Password Protected Comments Show Graphical Summary Show Tabular Summary Show Flat Intervals Up Down Add.... Remove Report Header ŧ Reset Delete Rename <u>о</u>к Cancel New Save

6. Analysis Setting をクリックし Use Setting Belowをクリックし、 解析する内容を設定



推奨解析条件:

ADM-2, threshold 6 GC correction: ON

Centralization: ON

Fuzzy zero: OFF (Aberration Filter によってはON) Combine Intra array replication: ON

Filter

Design Filter (DefaultDesignFilter_v2ただし偽常染色体領域も出力したい時はv1を選択) Feature Filter (あらかじめの方法で作成したFilter)

Aberration Filter (DefaultAberrationFilter_v2もしくはその他適宜)

	Report
7. SNP analysis settingをクリックし SNP Confidence Level 0.95に設定。 LOHを出力するときはLOHの Caluculateのチェックボックスに チェック(Threshold 6)	Design/E dit Cytogenetic Report Templates - Cyto Report Settings Analysis Setting SNP Analysis SNP Analysis SNP Analysis SNP Copy Number SNP CN Confidence Level 0.95 LOH Chromosome and Interval Selection
	Calculate Threshold Solution Solution New Save Reset Delete Rgname QK
8. Chromosome and interval selection をクリックし Buildや生物種を設定。	Report Settings Analysis Settings SNP Analysis Setting Chromosome and Interval Selection
およびレポート出力する 染色体範囲を設定。	Select Species : H. sapiens Select Genome Build : hg19 Mode Imit Report to Selected Chromosomes.
9. Saveをクリック	Chromosomes Intervais Add Remove Clear All Add Remove Clear All Lew Save Reset Delete Rename QK
10. Cyto Reportsをクリックし 作成したレポートを選択	Actional Genomic Workbench Liter Ldition 6.5 - [Cicit] 5007 Service Actional Genomic Workbench Liter Ldition 6.5 - [Cicit] 5007 Service Actional Genomic Workbench Liter Ldition 6.5 - [Cicit] 5007 Service Serv
Cyto Reports Design/Edit Template	

1:72781765 Intra Inter ADM-2 SNP... LOH DefaultPeatureFilter

hg19 | log2 ratio |Selected Ross = 4911 | 7954 × 10 Piter... | G | C | F |

	Report
11. 出力先を設定	Run Cytogenetic Report - Cyto
	Select Report Location Report File/Directory : Browse
12. FE textデータから直接レポートを作成 する場合は Run by importing FE files	Mode Run on selected experiment. Toput
を選択。 現在実行しているExperimentの結果から レポートを作成する場合は Run in selected experiment を選択	Import Files
13. OKをクリック	Add Remove

出力例



その他の機能(適宜ご使用ください)

- ■CGH、SNPデータのQC
- ■Moving Averageの表示
- ■新規genotype reference fileの作成
- ■新規genotype reference fileのインポート
- ■CGH解析結果をGraphicalに表示
- ■CGHデータの graphical probe penetrance サマリを表示
- ■CGHデータの graphical probe penetrance サマリをテキストデータで出力

CGH データのQC

操作の意味:CGHデータのノイズレベルやシグナル強度を確認できます



3. (選択されているExperiment内のデータに関して)一覧が表示

	QC Metrics Table													
Ei	e													
ſ	QC Metrics													
	Array Name Desig	ign No 📃 DLRSpread	🚍 SignalTo 📒	SignalTo	📑 SignalInt	📑 SignalInt	BGNoise	BGNoise	🚍 Reprodu	🔜 Reprodu	🚍 AreaUnd	🚍 MedianDiff	ErrorFra	ManualQCFlag
	U523502418_252983010001_50 029830	0 0.150309	105.871318	153.822067	353.300000	560.503000	3.337070	3.643840	8.073760	7.718990	NA	NA	N/	•
	U523502418_252983010001_50 029830	0 0.161316	130.556749	171.202329	343.329000	581.487000	2.629730	3.396490	7.687750	7.736240	NA	NA	N/	•
	U523502418_252983010002_50 029830	0 0.167981	110.274621	151.842625	350.434000	555.249000	3.177830	3.656740	8.167690	8.285940	NA	NA	N	•
	U523502418_252983010002_50 029830	0 0.131635	128.423808	126.875756	363.022000	470.756000	2.826750	3.710370	7.420860	7.421230	NA	NA	N	•
	U523502418_252983010003_50 029830	0 0.140955	131.690079	154.388457	377.512000	524.947000	2.866670	3,400170	6.571100	6.838860	NA	NA	N/	•
	Group By Amt Cy3 us Cood Excellent	sed(ug) 📢						Show	Frequency Dist	ribution	Plot S	slect All	Deselect All	Close

4. (オプション)必要に応じてデータにフラグをつける

📄 r_SignalI	ManualQCFlag
358.688000	•
398.564000	•
358.332000	•
351.487000	+
395.421000	
Deselect All	Pass Fail Marginal NA

FTEPTOCESSINS

■ CGH QC項目の意味

•DerivativeLR Spread:

Preprocessing measures the standard deviation of the probe-to-probe difference of the log ratios. This is a metric used in CGH experiments where differences in the log raios are small on average. A smaller standard deviation here indicates less noise in the biological signals.

•g(r)Repro

median CV% of BGSubSignal of the NonControl replicated sequences

•g(r)_BGNoise

standard deviation of negative control probes after rejecting feature nonuniform outliers, saturated features, and feature population outliers

•g(r)_Signal2Noise

Signal Intensity divided by BGNoise

•g(r)_SignalIntensity

median background-subtracted signal after rejecting nonuniform outliers and saturated features.

■ CGH QC項目の参考値

QC Metrics for enzyme

0	c	Π.	Л	-			_	_
· Y	-	IV	1	e	u	l	C	5

Metric NamePreferred RangeIsGoodGrid>=1.0AnyColorPrentFeatNonUnifOL<5.0DerivativeLR_Spread<0.3gRepro<0.2g_BGNoise<15.0g_Signal2Noise>30.0
IsGoodGrid >=1.0 AnyColorPrentFeatNonUnifOL <5.0 DerivativeLR_Spread <0.3 gRepro <0.2 g_BGNoise <15.0 g_Signal2Noise >30.0
AnyColorPrentFeatNonUnifOL<5.0DerivativeLR_Spread<0.3
DerivativeLR_Spread<0.3gRepro<0.2
gRepro <0.2 g_BGNoise <15.0 g_Signal2Noise >30.0
g_BGNoise <15.0 g_Signal2Noise >30.0
g_Signal2Noise >30.0
g_SignalIntensity >50.0
rRepro <0.2
r_BGNoise <15.0
r_Signal2Noise >30.0
r_SignalIntensity >50.0

QC Metrics for ULS

	Blood and Cell Samples	Tissue Samples	FFPE Samples
BGNoise	<15	<15	<15
Signal Intensity	>90	>90	>90
Signal to Noise	>20	>20	>10
Reproducibility	<0.2	<0.2	<0.2
DLRSpread	<0.2	<0.3	< 0.4



Derivative Log Ratio Spread (dLRsd)アルゴリズムはアレイデータのノイズ(Probe間のノイズ)を見積もる方法です。全染色体の連続するプローブ間のLog Ratio差の広がり (spread)を計算します*。 信頼性あるAberration検出のために、この値に注意をする必要があります。

*連続するプローブ間のLog Ratio差のロバスト標準偏差(robust standard deviation (spread))(=dLRsd)を全染色体で測定し、ノイズ平均を相殺するためにv2で割る。



using the log ratio spread as an estimate of array variance, aberrant regions can artificially inflate the noise of the array. The derivative log ratio calculates the difference between adjacent log ratios (the derivative log ratio, or DLR) as noise. Genomic Workbench uses the inter-quartile range (IQR) as 50% of the data around the mean of the DLR to estimate the variance.

■ DLRSDが高いときのSNP callへの影響

DLRSDが高いと、Uncut SNP allele copy number(ASCN)の分離に影響します。



操作の意味: SNP Call Rateなどを確認できます

QCの前にSNP 解析を行うことが重要です。



3. SNP QC Metrics表が表示されます。

SNP CN QC Metrics Table					
Eile					
SNP CN QC Metrics					
Array Name	Design No	Call Rate	Separability	Goodness of Fit	Call Ambiguity
Trisomy 21	028081	0.962268	0.893474	0.000345	0.004841

■ SNP QC項目の意味

Array Name (Read only):マイクロアレイの名前(Global Display Name)

Design No (Read only):マイクロアレイのDesign Number

Call Rate: confidence95%以上のSNP数÷referenceでsignalをもつ全SNP数 高品質のDNA サンプルをgenotypeされたreferenceで解析した場合、60%以上。

Separability: The separation between the SNPのCopy Number peaksの分離の目安。SNPsの uncut allele copy number 1 と2の平均Log ratioの距離を計算。高品質なDNA サンプルでは>0.8、<<1.05。この値が低いときはハイブリダイゼーションや洗浄のstringency が低いもしくはハイブリ時間 が短すぎる等の要因が考えられる。

Goodness of Fit: ピークのGaussian fit のエラー値。観測されたlog ratio の分布と、元となる Gaussian分布の隔たりから得られる。Curve fitting modelの質を示す。

Call Ambiguity: SNPのCopy Numberの1と2のGaussian peaksの重なりを示すSNP probeデー タがこの重なり領域に存在すると、そのプローブのSNP Copy Number call は高いconfidenceで表 示されない。言いかえると、SNP copy number call があいまいなSNP probeの度合いを示す。高品 質なDNAサンプルでは7%以下。

QC Metrics	
Metric Name	Preferred Range
Reference Correct	>0.8
SNP Call Rate	>0.6
Heterozygosity	>0.15 and <0.35
Goodness of Fit (Diploid Region)	NA
Separability	>0.8 and <1.05
Call Ambiguity	<0.07
Clonal Fraction	NA
Call Accuracy	>0.98
cnLOH Fraction	NA

各項目クライテリア

Preprocessing

操作の意味: Moving Average では、データの大まかな傾向を知ることができます。 設定したwindow size を元に、データの各ポイントの移動平均を計算し表示します



2. Moving AverageのAlgorithmを Triangular に設定

٢	Moving Average (Log Ratio)							
	Show	Algorithm	Line width	Windo	w			
		riangular 🛊		10 pt	ŧ			

3. Moving AverageのWindow Sizeを適宜 設定。 (例;4x180Kのとき5~10pt)

_		_		-
-Moving A	verage (Log P	Ratio) —		
Show	Algorithm	Line wid	ith Windo	w
	Triangular 🗘	1 🕈		ŧ
1		<u> </u>	.5 Mb	
Search			1 Mb	2
			5 Mb	Ĩ
		rev	10 Mb	
			50 Mb	Ă
Design Da	ata		1 nt	ŧ

4. Moving AverageのShowのチェックボッ クスをチェックする



Analysis

新規genotype reference fileの作成

操作の意味:CGH+SNPでGenotypeしたサンプルのデータから、新たにReference Gentype Fileとして使用す るデータファイルを作成します。



5. それらのデータを一つの Experimentに入れ、SNP・LOH解析 を行う。全てのデータを選択した状態 にする。



🖉 Generating Genotype Reference File 8. Description: Confidence Threholdを入力 1. Genotype reference file will be generated per-design. One reference will be created for each unique sample value.
 SNP Copy Number results need to be calculated for the selected experiment. Confidence Levelを設定 Select samples to export 028081 hq19 🗸 unknownA 9. Browseをクリックし、 🟹 unknownB 新規Genotype reference fileの保存 🗸 unknownC 場所を設定 🗹 unknownD 🗹 unknownE ※ファイル名 GenotypeReference_<Date>_<Des ign>_<Build>.txt. Input Parameters Confidence Threshold: 0.95 Strona 10. OKをクリック Select folder location to save generated file(s)

Confidence threshold

マイクロアレイデータ上の各SNPについてSNP Copy Numberか計算されますが(ASCN アルゴリズム)、そのCopy number が "整数値±(1—Confidence Threshold)であれば **Confident**、整数値の±(1—Confidence Threshold)以内でなければ**Tentative**となる。 Confidence threshold は0.95推奨 (この値が大きいほどstringencyが高くなります)

• Level

Strong:すべてのデータでConfidentとして検出されているSNP、かつすべてのデータで同じSNP copy numberを示すもの。

Weak: すべてのデータで同じSNP copy numberを示すSNP(Confidence/Tentativeどちらでもかまわない)

Majority: 少なくともひとつのデータでConfidentとして検出されていて、異なるSNP copy numberを示すSNP。しかし異なるSNP copy numberを示すものはすべてTentativeである。

Contradictory: データ間で異なるSNP copy numberが示されているが、それらはいずれも TentativeであるSNP

出力例

#REFERENCE SAMPLES						
REFERENCE_ID	GENDER	COVERED_SNPS	DBSNP_VERS	SION		
unknownA	Male	64596	v130			
#						
#REFERENCE GENOTYP	PES					
PROBE_ID	SPECIES	SNP_ID	CUT_ALLELE	UNCUT_ALLELE	unknownA GENOTYPE	unknownA IS_DOUBLY_CUT
A_20_P00100005	H. sapiens	rs6686003	А	G	GG	0
A_20_P00201911	H. sapiens	rs6686003	А	G	GG	0
A_20_P00100009	H. sapiens	rs35242196	С	A	СС	1
A_20_P00201915	H. sapiens	rs35242196	С	A	СС	1
A_20_P00201917	H. sapiens	rs17160977	G	A	NN	1
A_20_P00100011	H. sapiens	rs17160977	G	A	NN	1
A_20_P00100012	H. sapien					
A_20_P00201918	H. sapien	アルゴリズム	はサンフ	「ルの性別も	し出力する。	
A_20_P00100018	H. sapien •	性別はCGH	データとき	もう片方のre	eferenceの性別	情報から予測される
A_20_P00201924	H. sapien	acostros ro	forence		副権相が必要	
A_20_P00201926	H. sapien	genotype re	erence		別用報が必安	
A_20_P00100020	H. sapiens	rs1129333	A	G	GG	0
A_20_P00201929	H. sapiens	rs16825139	с	G	NN	1
A_20_P00201931	H. sapiens	rs4648482	т	С	NN	1
		45.53.459				

54

\$

Browse...

- ・タブ切りテキスト形式で作成
- ・ 複数の reference 情報を一度に入れることが可能

#Reference samples

- ・REFERENDE_ID: genotype referenceのID
- ・GENDER: referenceの性別(Male/Female)
- ・COVERED_SNPS: reference fileのSNP数
- DBSNP_VERSION

#Reference genotype

- PROBE_ID: Agilent Probe ID
- •(SPECIES): なくてもインポート可能
- SNP_ID:各Probeに関連するSNPのID (1SNPに対して複数のプローブが存在することもある) SNP_IDが重複する場合、最初のものが採用される。
- CUT_ALLELE
- UNCUT_ALLELE
- (Reference IDを入力) | GENOTYPE: Referene_ID の SNP genotype
- (Reference IDを入力) | IS_DOUBLY_CUT: 2 Cut alleleのSNPを示すフラグ(0か1)。 2 cut alleleの場合1と表記。

空白の場合、CUT_ALLELEとGENOTYPEを参照し自動的に作成される。

注意; SNP_IDは重複してはいけない。 SNP_IDが重複する場合、最初のものがインポートされる

新規genotype reference fileのインポート

操作の意味: Agilent推奨5種Coriell DNA以外のサンプルをReferenceとしてCGH+SNPマイクロアレイを実施 し解析する際、そのReferenceのGenotype reference fileが必要です。 新たに準備したGenotype reference fileをインポートする方法です。



5. OKをクリック

🚰 Genotype R	eference Import	er			
_C Reference Sample	·s				
REFERENCE_ID	GENDER	COVERED_SNPS	DBSNP_VERSION		
test2	Male	59647	v130		
-Reference Genoty	/Des				
PROBE ID	SNP ID		LINCLIT ALLELE	TEST2IGENOTYPE	TEST2US DOUBL
A_20_P00201911	rs6686003	A	G	GG	0
A_20_P00100009	rs35242196	с	A	сс	1
A_20_P00201917	rs17160977	G	A	NN	1
A_20_P00201918	rs3855951	с	Т	тт	0
A_20_P00100018	rs2843160	Т	G	GT	0
	type reference with d	uplicate name			
Note: If there is no	IS DOUBLY OUT colu	on for any depotype (reference, it is autom	atically inferred from	CUT ALLELE column
Duplicate SNP_IDs i	n genotype reference	is not supported. If th	nere are duplicate SN	P_IDs, the first one v	vould be picked up ar
			6	Ok Capcel	

6. インポートされたGenotype reference fileは画面左下Genotypes の画面に表示される Grand Workbanch Life Edition 6.5 - [CGH] 5MP

	Home Sample Manager V	vorknow Preprocessing	Analysis Discovery	Reports View	Tool Helb		Switch Application 🔻
	User Import	Export v Create Experime	ent Save Experiment Result	GoTo Gene/Genomic location	nt 😢 Exit		
Genotypes Z ra ^D	Search	Open Application Genomic V	fewer Sample Utility				Application Type: CGH
Genotypes YORUBA MALE (NA18507_V1) EUROPEAN MALE (NA18507_V1) YORUBA FEMALE (NA18517_V1) CHINESE FEMALE (NA18579_V1) EUROPEAN FEMALE (NA12878_ TEST2	Date gan a daa a daa a - Cutte - Cutte - Cutte - Cutte - Content - Co		7 0 0 10 41 12 7 1 1 1 1 1 10 1 1 1 1 1 1 1 10 1 1 1 1 1 1 10	Image: Second	10000000000000000000000000000000000000		
※既存のデータは	My Entity List ∑ 8ª → Entities ⊕	Arrays SNPs Calbration A	rrays	942.2 943			
ロンリッン		ProbeName ChrName	Start Stop	FeatureNum 📕 US239	0241 U523502418_; U	U523502418_; U523502418_; U523502418	0
> Deleteで削除可能 	Genotypes 20 Genotypes 20 Genotypes 20 • CORUBA MALE (NA 18507_V1) • EUROPEAN MALE (NA 18507_V1) • EUROPEAN MALE (NA 1857_V1) • CHINES FEMALE (NA 1857_V1) • EUROPEAN FEMALE (NA 1857_V	A_16 P153 dr1 A_16 P153 dr1 A_14 P137 dr1 A_16 P03 dr1 A_18 P138 dr1 A_18 P138 dr1 A_18 P133 dr1 A_16 P153 dr1 A_16 P153 dr1 A_16 P153 dr1	163743695 163743754 163764240 163764290 163761290 163764290 163811431 163811490 163851933 163851992 163870184 163870243 163903901 163903903 163947533 16394753 16395550 163945560	54124 0.242 28111 -0.015 49869 -0.188 120179 -0.013 70422 89727 -0.166 13215 0.379 80125 0.079	0.301 0 0.028 -0 -0.065 -0 0.028 0 -0.039 0 0.039 0 0.084 0	1.137 0.060 0.163 0.042 -0.054 -0.048 0.076 -0.099 -0.218 1.141 0.134 0.008 1.138 -0.319 0.111 3.386 0.210 0.018 1.088 0.076 0.151	

H DefaultFeatureFilter

DefaultDesignFilter... 6 C F

72781765 Intra Inter ADM-2 SNP...

hg19 | log2 ratio | Selected Row = 4911 | 7954 x 10

CGH解析結果をGraphicalに表示

操作の意味:検出されたコピー数変化(Amp、Del)を簡易に図で表示させます。

1.Reportを選択します。

2. Aberrationの Graphicalを選択





3. 現在選択されているデータ、および染 色体に関するAberrationの図を表示



CGHデータの graphical probe penetrance サマリを表示

Discovery 操作の意味:現在選択されているExperiment中のデータについて、各アレイプローブがデータ中何%でコ ピー数変化(Amp、Del)として検出されているか表示させます。



3. penetrance (現在選択されているアレイデー

タ中の何%のサンプルで生じているAmp/Delか、

図で表示

$\begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 &$	$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$			
	$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$			
16 00 00 00 00 00 00 00 10 00	17 0000 00 40 30 0 20 40 00 00 112 1	18 0000 00 40 20 0 20 40 00 00 100 β1124 q12.1 4 1 4 1 4 1 4 1 4 1 4 1 4 1 4 1 4 1 4	19 0000 00 40 20 0 20 40 00 00 100 p13.72 0 00 00 40 40 0 0 00 100 13.92 0 00 00 40 40 0 0 00 100 13.92 0 00 00 40 40 0 0 00 100 13.92 0 00 00 40 40 0 0 00 100 13.92 0 00 00 40 40 0 0 00 100 13.92 0 00 00 40 40 0 0 00 100 13.92 0 00 00 40 40 0 0 00 100 13.92 0 00 00 40 40 0 0 00 100 13.92 0 00 00 40 0 0 0 00 0 00 00 00 00 00 13.92 0 00 00 40 0 0 00 00 00 00 00 00 00 00 13.92 0 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 13.92 0 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 13.92 0 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00	20 00000000000000000000000000000000000
21 0000 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00	22 000 00 00 20 0 20 0 00 00 00 00 00 00		Y 00000 00-40 20 0 20 40 00 100 q1 122 1	

CGHデータの graphical probe penetrance サマリをテキストデータで出力

操作の意味: Probe Penetranceの内容をテキストで出力

