

# QC Metrics

- QC Metricsとは、アレイの数値化データのサマリをアジレント社の経験に基づく参考値と比べることで、ラベル化以降数値化までの実験ステップに問題がないかを評価するツールです。  
ただし個々の結果はサンプルの抽出法や品質などに影響をうけるため、参考値は必ず満たさなければならない基準値ではありません。
- Feature Extraction v9.1以降で数値化すると出力されます。



## 使用上の注意

1. QC Metricsとは
2. QC Metricsの出力例
3. 遺伝子発現1カラーのMetrics



# 使用上の注意

アジレントのDNAマイクロアレイは、インクジェットを用いたin situ合成法でphosphoramidite法に基づいたDNAの化学合成を行い、製造されています。また様々なクオリティのサンプル溶液を、スライドガラス上でハイブリダイゼーションして、専用洗浄液で洗浄、乾燥するという、液体をベースとした実験なので、アレイ上のわずかなしみやムラ、溶液の飛び散りは不可避であり、数十万から数百万のスポットを100%保証するものではありません。

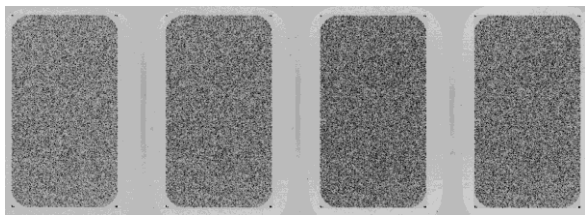
そのため、種々のフラグ指標を評価し、全般的に見て解析に支障がないレベルか、実験途中でなにか誤りがないか、またはフラグが解析に支障を与えており、データの排除や、再実験の必要性があるのかを判断するための参考値がQCメトリックです。



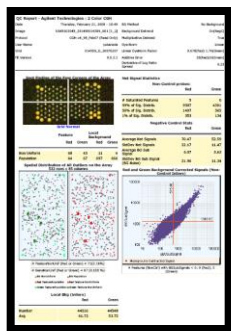
# 1. QC Metricsとは



実験は成功している...?  
スキャン画像から判断するのは難しい

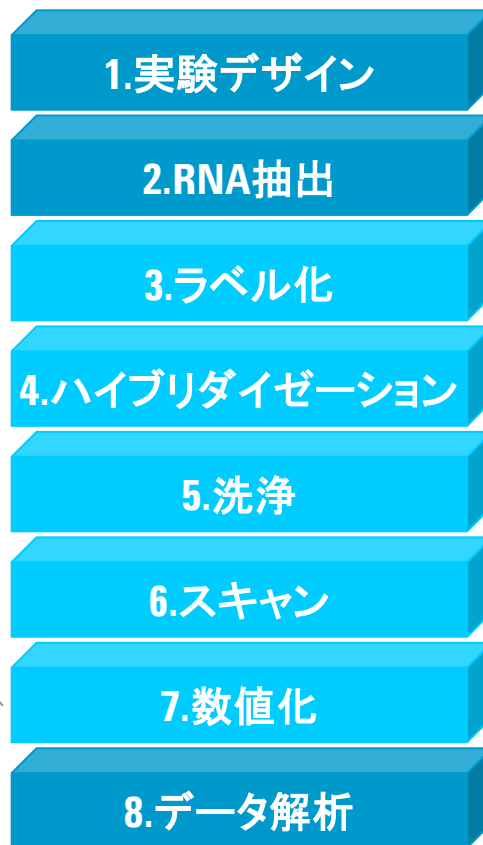


どの項目を見ればいいのか?  
たくさんのQCレポートを  
全部相互比較するのは大変だ...

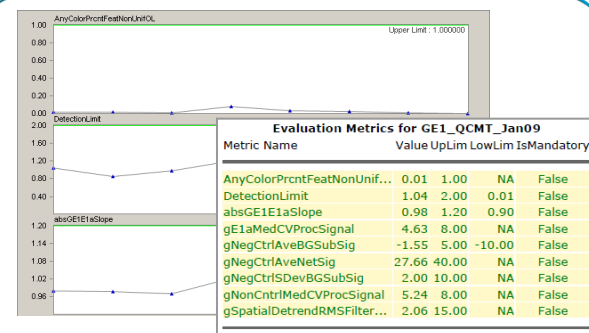


QCレポート

## マイクロアレイ実験の流れ



『これらの実験ステップで  
問題がなかったか』を  
評価するツール



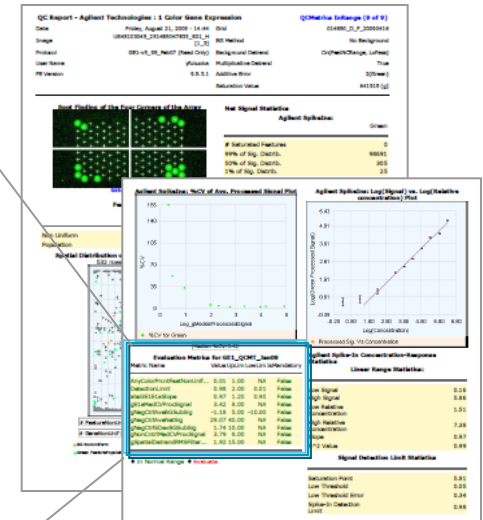
QC metricsの出力データ



## 2. QC Metricsの出力例

◆QCレポート内にQC metricsが出力されます。

| Metric Name                 | Value | UpLim | LowLim | IsMandatory |
|-----------------------------|-------|-------|--------|-------------|
| AnyColorPrntFeatNonUnif...  | 0.01  | 1.00  | NA     | False       |
| DetectionLimit              | 1.04  | 2.00  | 0.01   | False       |
| absGE1E1aSlope              | 0.98  | 1.20  | 0.90   | False       |
| gE1aMedCVPProcSignal        | 4.63  | 8.00  | NA     | False       |
| gNegCtrlAveBGSubSig         | -1.55 | 5.00  | -10.00 | False       |
| gNegCtrlAveNetSig           | 27.66 | 40.00 | NA     | False       |
| gNegCtrlSDevBGSubSig        | 2.00  | 10.00 | NA     | False       |
| gNonCtrlMedCVPProcSignal    | 5.24  | 8.00  | NA     | False       |
| gSpatialDetrendRMSFilter... | 2.06  | 15.00 | NA     | False       |



遺伝子発現の例

**Metric Name** QCレポート内の数項目

アプリケーションによって異なります。

**Value** 実際にアレイから計算された値

**UpLim, LowLim** アジレント開発部の経験に基づく値。

設定されていない場合もあります。

**IsMandatory: False** (現在はすべてFalseです)

各Metricは経験に基づいた『**参考値**』であり、必ず満たさなければいけない『基準値』ではないことを意味します。



Agilent Technologies

### 3. 遺伝子発現1カラーのMetrics

#### Evaluation Metrics for GE1\_QCMT\_Sep09 :

Good (10)

| Metric Name               | Value | Excellent | Good         | Evaluate       |
|---------------------------|-------|-----------|--------------|----------------|
| IsGoodGrid                | 1.00  |           | >1           | <1             |
| AnyColorPrcntFeatNonUn... | 0.00  |           | <1           | >1             |
| gNegCtrlAveNetSig         | 23.72 |           | <40          | >40            |
| gNegCtrlAveBGSubSig       | -2.27 |           | -10 to 5     | <-10 or >5     |
| gNegCtrlSDevBGSubSig      | 1.56  |           | <10          | >10            |
| gSpatialDetrendRMSFilt... | 1.82  |           | <15          | >15            |
| gNonCntrlMedCVProcSign... | 6.43  |           | 0 to 8       | <0 or >8       |
| gE1aMedCVProcSignal       | 5.16  |           | 0 to 8       | <0 or >8       |
| absGE1E1aSlope            | 1.02  |           | 0.90 to 1.20 | <0.90 or >1.20 |
| DetectionLimit            | 0.56  |           | 0.01 to 2    | <0.01 or >2    |

◆ Excellent ◆ Good ◆ Evaluate



# ① IsGoodGrid

## 意味

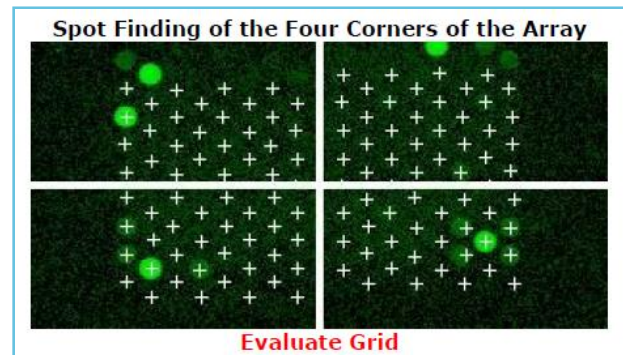
Feature Extractionが認識したグリッドが合っているかどうかの判定。  
合っていれば1、ずれている可能性があれば0 (Good=1, Evaluate<1)

## 原因

Feature Extractionソフトウェアは、画像上のアレイの隅の輝度が高い領域をスポットと認識して、Design File内のグリッド情報を当てはめます。隅のコントロールプローブが光っていなかったり、近傍に輝度の高い汚れなどが付着するとグリッドがずれることがあります。

## 対応

QCレポート左上の「**Spot Finding of the Four Corners of the Array**」を目で見て、**緑色の丸(蛍光色素が存在しているアレイ上のスポット)**と**十字印(ソフトウェアがスポット中心と認識した箇所)**が本当にずれているかを確認して下さい。右の例のようにずれていれば、以下の資料を参考に、手作業でグリッドを合わせて再数値化して下さい。



[https://www.chem-agilent.com/lscabooth/BIO\\_FAQ/index3-Bio.htm#Array01](https://www.chem-agilent.com/lscabooth/BIO_FAQ/index3-Bio.htm#Array01)

【User Name: member

Pass Word: security】

**緑色の丸と十字印がずれていないのにIsGoodGridが0=evaluateになる場合、ソフトウェア上で修正することは出来ませんが、そのまま解析可能な場合もあります。今回のデータが以下の「Feature Extractionが設定した基準値」を満たさない何らかの要因があることが考えられます。**

- ・各アレイの4辺に、輝度の高いスポットが想定されている割合以上に存在しない
- ・一定割合以上のスポットが「Non Uniformity Outlier(後述)」であるとコールされている
- ・アレイ内に大きな傷や汚れがあるなど、繰り返しプローブの再現性を損なう問題がある



## ② AnyColorPrcntFeatNonUn...

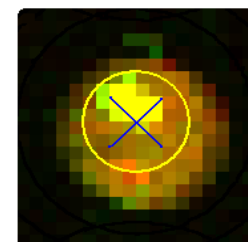
### 意味

“NonUniformityOutlier(=不均一なピクセルで構成されるスポット)”と判定されたスポットの割合。低いほど良好だが、通常0になることは稀。(Evaluate>1%)

### 原因

アレイ上の広い範囲に傷や汚れが付いたり、グリッドがずれていたりした場合、多くのスポットでNon Uniformity Outlierとコールされることがあります。

feature outlier

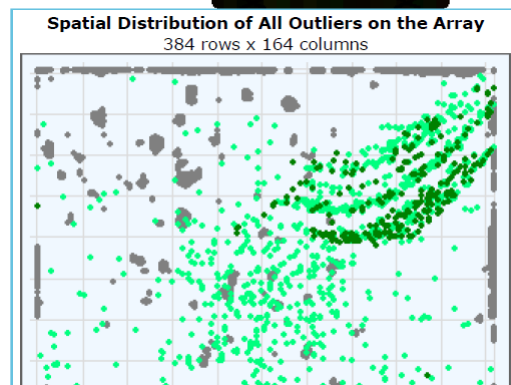


### 対応

①のIsGridGridがEvaluateの場合、グリッドを合わせ直すことでこの値も改善する可能性があります。

グリッドがずれていない場合、実際に傷や汚れが付いていないかを画像で確認して下さい。QCレポート上の「Spatial Distribution of All Outliers on the Array」の項目で、濃い緑のドット

●(FeatNonUnifOL)が多く表示されているおよその位置を確認し、Feature Extraction内で画像ファイルを開いて、状況を確認して下さい。ホコリなどのブローで吹き飛ばせるゴミが影響している場合、吹き飛ばした後に再スキャンすることで改善する可能性があります。傷や汚れの場合はこの段階でできる対策はありません。



### 影響

Non Uniformity Outlierとコールされたプローブは、通常データ解析の過程でFilterによって除去するため、解析可能なプローブが1%以上失われても問題がない解析であれば、解析可能です。ですが1%失われることが問題になる解析である、もしくは非常に重要な遺伝子がNon Uniformity Outlierとコールされていれば、再実験をお勧めします。





### ③ gNegCtrlAveNetSig

#### 意味

バックグラウンド減算前のネガティブコントロールプローブのシグナル強度。  
低いほどノイズが少ない。(Evaluate>40)

#### 原因

Wash器具が汚れていたり、カラムによるcRNA精製が不十分でハイブリサンプルに色素の持込があったり、Wash2の温度が37°Cより低い場合などにこの値が高くなる場合があります。

#### 対応

Wash器具のクリーニングには洗剤を使わないようにご注意ください。Wash器具をアセトニトリルやイソプロパノールなどですすぎ、ミリQ水で完全にすすぐなどのクリーニングで、改善することがあります。Wash2によるWash終了後、Wash2に温度計を入れて温度を測り、37°Cより低くなっていれば保温装置を使用することをお勧めします。

#### 影響

Feature Extractionは、ネガティブコントロールのシグナル値を元にバックグラウンドノイズのレベルを見積り、全てのプローブから減算するため、この値が大きいと、この値が小さいデータよりも感度が少し劣る可能性があります。ですが、得られた結果がFalse Positiveを与えるような誤ったデータではないため、ノイズレベルの低発現遺伝子は解析対象ではない場合はデータをそのまま採用することも出来ます。

## ④ gNegCtrlBGSubSig

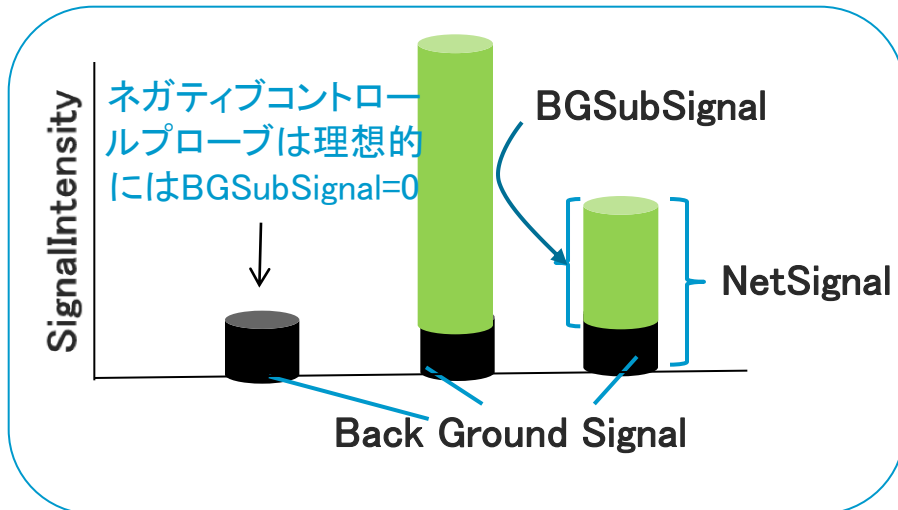
### 意味

バックグラウンド減算後のネガティブコントロールプローブのシグナル強度。  
0に近いほどバックグラウンド減算が良好に行われた。(Evaluate<-10 or >5)

### 原因

Feature Extractionは、アレイ上に万遍なく配置されたネガティブコントロールレベルの低シグナルプローブのシグナル値を元に、エリアごとのバックグラウンドノイズのレベルを見積り、近傍のプローブに対してそれぞれ適切なバックグラウンドシグナルレベルを算出して減算します。

③のgNegCtrlAveNetSig値が非常に高い場合などに、バックグラウンド減算の程度に過不足が生じるなどの問題が生じるケースがあります。



### 対応

③のgNegCtrlAveNetSigを低く抑える対策を実施することが有効です。

### 影響

③のgNegCtrlAveNetSig同様、この値が基準値より低い場合、そうでないデータよりも感度が劣る可能性があります。ですが、得られた結果がFalse Positiveを与えるような誤ったデータではないため、ノイズレベルの低発現遺伝子は解析対象ではない場合はデータをそのまま採用することも出来ます。



## ⑤ gNegCtrlSDevBGSubSig

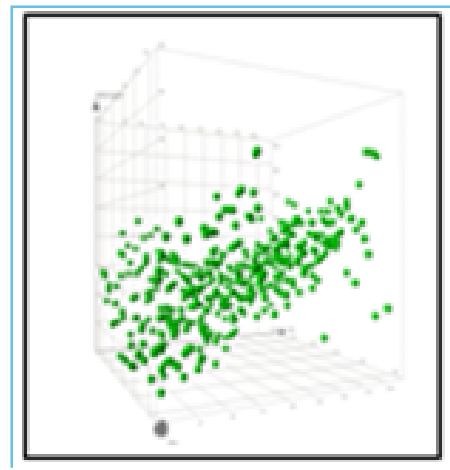
### 意味

バックグラウンド減算後のネガティブコントロールプローブのシグナルのばらつき。標準偏差値であり、小さいほどばらつきが少ない。(Evaluate>10)

### 原因

アレイ上に万遍なく配置されたネガティブコントロールプローブは、アレイ上の位置が異なっても非常に近いシグナル値を示すはずですが、ハイブリやWashにムラがあったり、アレイ上の広い領域に汚れなどがあると、シグナル値に偏りが生じることがあります。

また、標準偏差値なので、上記のような操作上の問題がなくても、バックグラウンド減算後のネガティブコントロールプローブのシグナル値が大きくなるとこの値が大きくなる場合があります。



アレイ上に満遍なく配置されているネガティブコントロールプローブのイメージ

### 対応

④のgNegCtrlAveBGSubSigが基準値を超えていないか確認し、超えていれば④の対策を実施して下さい。④が問題なければ、⑦⑧のCV値を確認し、基準値を超えていれば⑦⑧の対応を実施して下さい

### 影響

上記「対応」の④⑦⑧が問題なければ、データに大きな影響はないと考えられます。



## ⑥ gSpatialDetrendRMSFit...

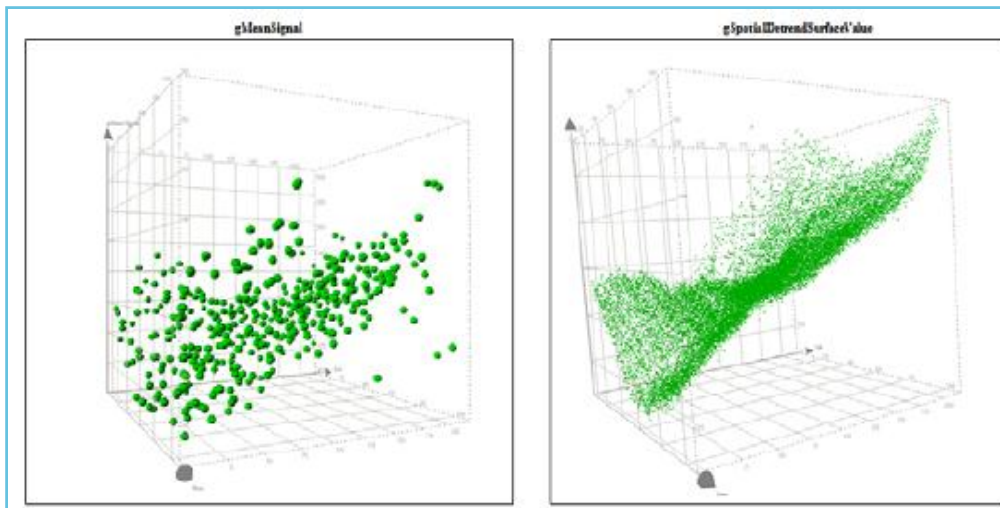
### 意味

SpatialDetrendRMSFilteredminusFitの略。実際のバックグラウンド値と、Feature Extractionが見積もったエリアごとのバックグラウンド値の乖離の程度。小さいほど良好。(Evaluate>15)

### 原因

Feature Extractionは、ネガティブコントロールレベルの低シグナルプローブの情報を元に、エリアごとに異なるバックグラウンドシグナル値を見積もります。その見積りがうまくいっていないと、実際のシグナル値の違が大きくなることがあります。

局所的なシミやWashが不均一である場合にも大きくなります。



ネガティブコントロールレベルの低シグナルプローブのアレイ上の分布とシグナル強度

Feature Extractionが見積もった、各エリアでのバックグラウンド値の分布

### 対応

局所的なシミやWashが不均一である場合、以下ウェブサイトから【Agilentマイクロアレイ実験操作説明ビデオ】をご覧ください、スターラーの速度などをご確認ください。

[https://www.chem-agilent.com/lscabooth/DNAMicroArray/yan\\_MicroArray.htm#array](https://www.chem-agilent.com/lscabooth/DNAMicroArray/yan_MicroArray.htm#array)

User Name: member

Pass Word: security

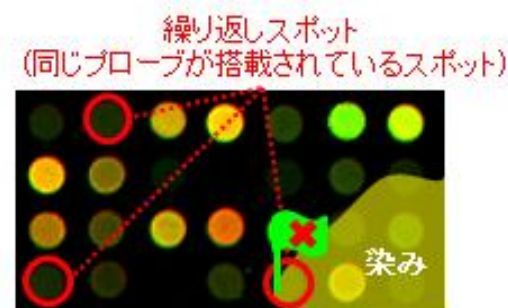
## ⑦ gNonCntrlMedCVProcSign...

### 意味

コントロールプローブではない、Biologicalプローブのアレイ内再現性。相対標準偏差値(CV%)であり、小さいほど再現性が良好。(Evaluate>8 or <0)

### 原因

アレイ上には「同一配列だがアレイ上の位置が異なる」繰り返しプローブが複数種類搭載されています。ハイブリ・Washなどがムラなく行われ、データが均一であればこれらのシグナルはよく一致するのですが、局所的なシミやハイブリ・Washの不均一があると、繰り返しプローブのシグナルの一致度が低くなり、CV%は高くなります。上記のような実験誤差がなくても、mRNAが少なく、全体のシグナル値が低いサンプルではCV%値が高くなる傾向があります。カスタムアレイなどで、「同じプローブを複数個繰り返し搭載する」という選択肢をOnにしていない場合、この値は計算されず、-1が表示されます。



### 対応

ハイブリ時に漏れがあった場合、ハイブリエイド(ハイブリ補助器具)の使用をご検討下さい。一度にWashしたスライド全体で一様にこの値が高い場合、WashのStringencyが不十分な場合があります。以下ウェブサイトから【Agilentマイクロアレイ実験操作説明ビデオ】をご覧頂き、スターラーの速度などをご確認ください。

[https://www.chem-agilent.com/lscabooth/DNAMicroArray/yan\\_MicroArray.htm#array](https://www.chem-agilent.com/lscabooth/DNAMicroArray/yan_MicroArray.htm#array)

User Name: member

Pass Word: security

### 影響

繰り返しプローブを多く搭載したアレイでは、通常解析時にはずれ値は除かれるため、影響なく解析できる場合もありますが、基準値を大きく外れた場合は、実験誤差の影響を大きく受けている可能性があるため再実験をお勧めします。



Agilent Technologies

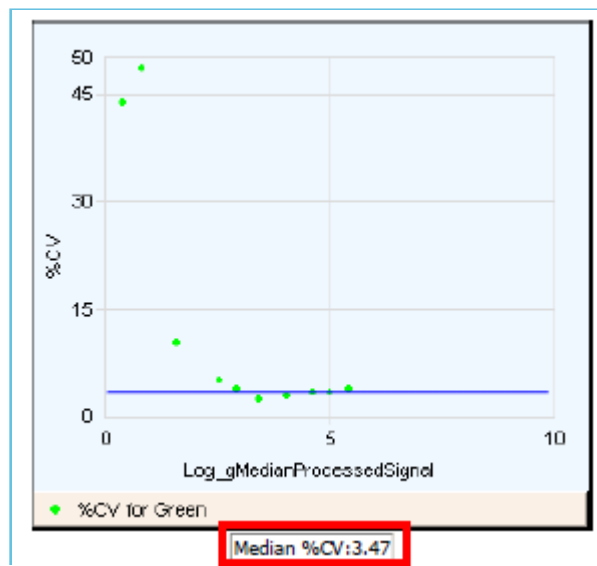
## ⑧ gE1aMedCVProcSignal

### 意味

Spike-In Controlに対応したコントロールプローブのアレイ内再現性。相対標準偏差値であり、小さいほど再現性が良好。(Evaluate>8 or <0)

### 原因

全てのアジレント遺伝子発現アレイ上には、実験時にRNAサンプルに添加する「Spike-In Control」のRNAに対応した配列のプローブ複数種類がそれぞれ複数回、繰り返しで搭載されています。この値が高くなる要因は⑦と同じですが、mRNAが少ないなどのサンプル由来の要因を除外できるため、より実験過程にフォーカスしたQCが可能です。ですが、Spike-In Controlの添加量が少なすぎるなどの要因があると、Spike-Inのシグナル値が低くなり、その他の実験がうまくいっていてもこの値が高くなる可能性があります。



### 対応

⑦の対応と同様です。

### 影響

⑦のBiologicalプローブのCV%と同様に高い場合、影響は⑦の「影響」の項と同様です。  
⑦は良好なのにこちらのみ、基準値を超えている場合、Spike-In Controlの質や操作のみに問題がある可能性が高いため、データ解析には影響を及ぼしません。





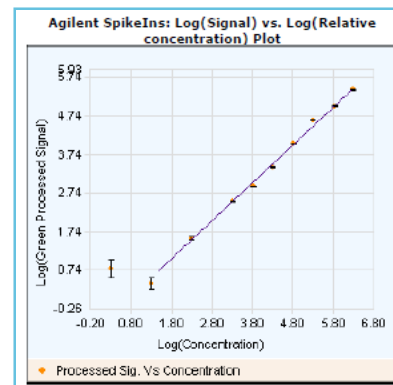
## ⑨ absGE1E1aSlope

### 意味

Spike-In Controlの結果を元にした、RNA濃度とシグナル強度の直線性の評価。1に近いほど良好。(Evaluate>1.2 or <0.9)

### 原因

実験時にRNAサンプルに添加する「Spike-In Control」には、10種類の配列の異なるRNAが異なる濃度で入っています。これらの濃度と、その対応するプローブのシグナルとの関係とのプロットした時に、大きく外れるポイントがあったり、直線性が得られない場合はSlope値が計算されなかったり1から外れたりします。また、非常にバックグラウンドが高いデータなどでも、Slopeが寝てしまって0.8より低くなる場合があります。



### 影響

1点のみはずれ値があってSlopeが計算されないなどの場合、何かその点のみで問題が起こっている可能性があるため、その点を除いたSlopeを再計算し、基準値に入ればデータは問題なく解析できます。ですが、プロット全体が寝てしまってSlope値が0.9を大きく下回るほどフラットになると、発現差が圧縮されて偽陰性が増えることが予想されます。

### 対応

1点だけ外れるポイントがある場合、totalRNA量に対して適切なSpike-Inが添加されたかご確認ください。また、以下をお試し頂き、Spike-In Controlの品質を確認して下さい。

- ・Spike-In Controlを原液から希釈し直す
- ・Spike-In Controlを原液から新品を利用する

全体がフラットになる場合も、totalRNAに適切なSpike-Inが添加されたことを確認してください。また、③のgNegCtrlAveNetSigの項目を確認して下さい。



## ⑩ DetectionLimit

### 意味

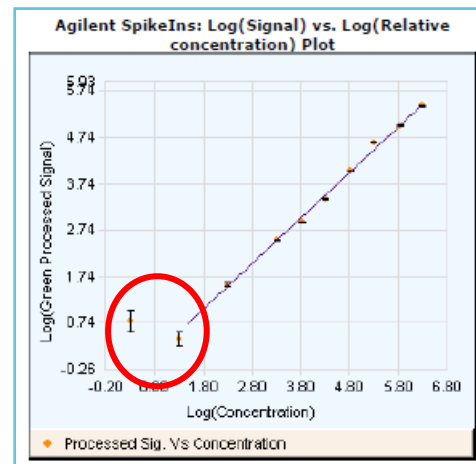
Spike-In Controlの値を元にした、検出限界値。この値が小さいほど、低濃度まで検出できている=高感度なデータである。(Evaluate>2 or <0.01)

### 原因

この値は、直線範囲より下のSpike-Inコントロールの濃度の平均値+1SDの濃度を示すため、バックグラウンドノイズが高く、直線範囲が狭くなると、検出限界濃度が高くなります。また、直線回帰がうまくいっていない場合、異常にこの値が小さくなる場合もあります。

### 影響

③のgNegCtrlAveNetSig同様、この値が基準値より高い場合、そうでないデータよりも感度が劣る可能性があります。ですが、得られた結果がFalse Positiveを与えるような誤ったデータではないため、ノイズレベルの低発現遺伝子は解析対象ではない場合はデータをそのまま採用することも出来ます。



### 対応

低濃度側のSpikeInが何点も直線から外れてDetection Limitが高くなってしまっている場合、totalRNA量に対して、適切なSpikeInが添加されたかご確認ください。また、以下をお試し頂き、Spike-In Controlの品質を確認して下さい。

- Spike-In Controlを原液から希釈し直す
- Spike-In Controlを原液から新品を利用する

また、③のgNegCtrlAveNetSigの項目を確認して下さい。

