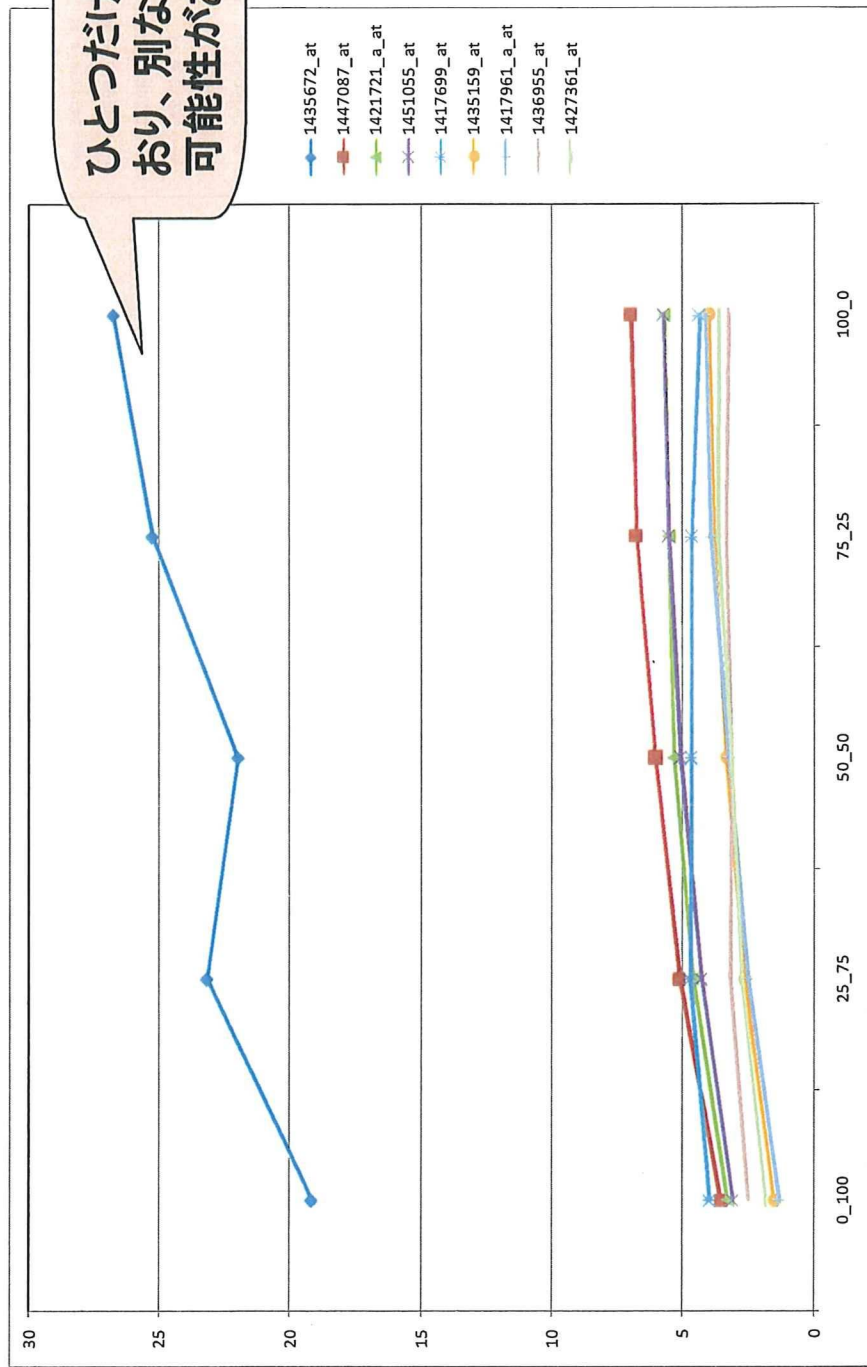


1.4.システム組込 補正結果 (Liver-Brain-Mixture, LBMによる検討)

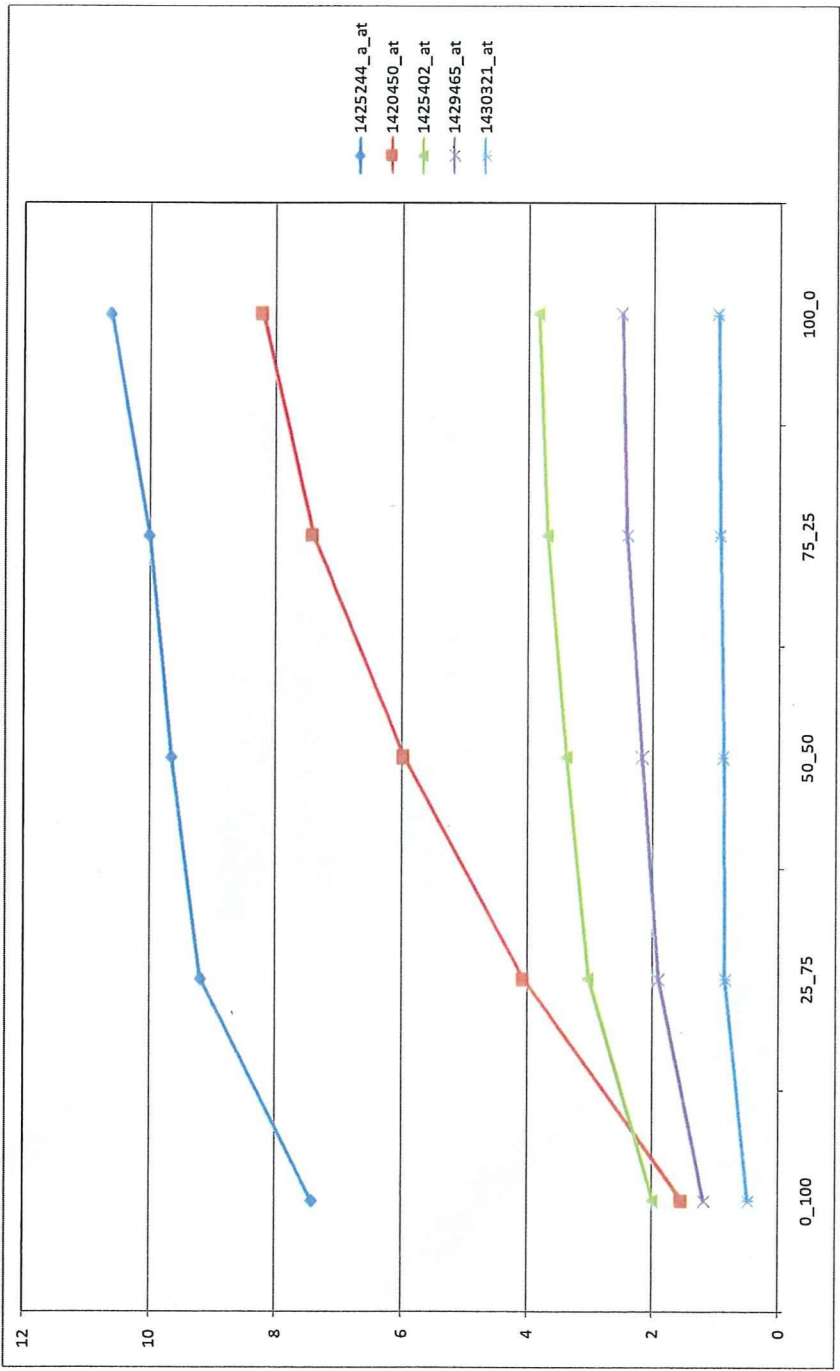
● 低発現域(50%:50%でraw10程度)



概ね、直線に引き伸ばされている

1.4. システム組込 補正結果 (Liver-Brain-Mixture, LBMによる検討)

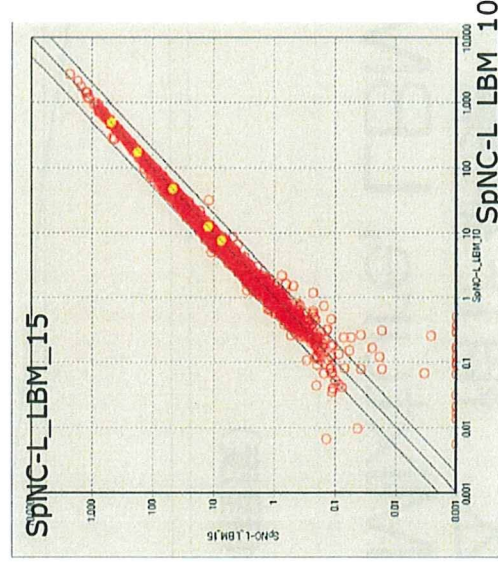
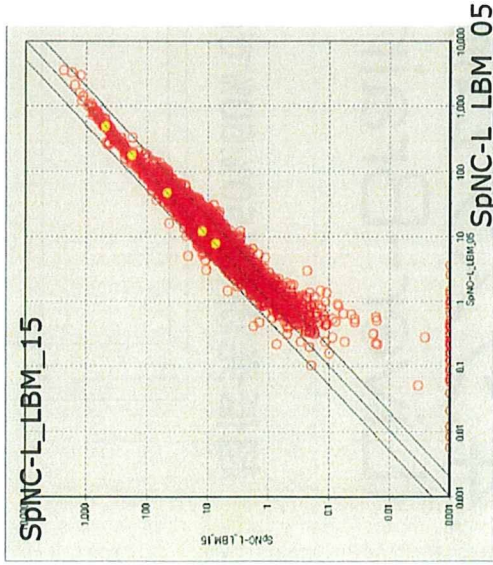
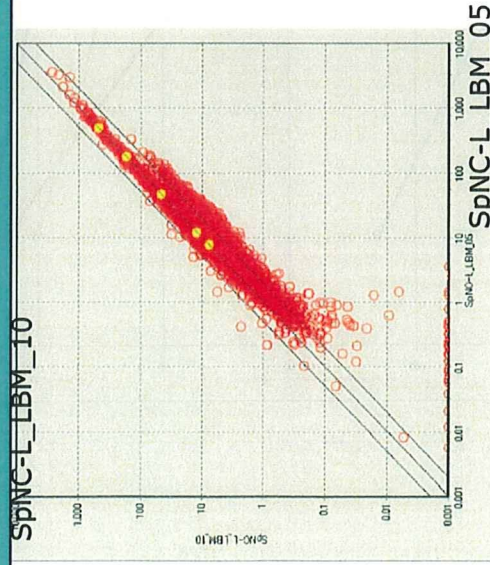
- 超低発現域(50%:50%でraw1程度)



直線に引き伸ばされている。しかし、蛍光値が10倍のグラフと同じ程度のコピー数と なっている。他RNAの影響が強すぎる可能性がある。

1.4.システム組込 補正結果 (Liver-Brain-Mixture, LBMによる検討)

Scatter Plotによる同一実験条件における再現性確認

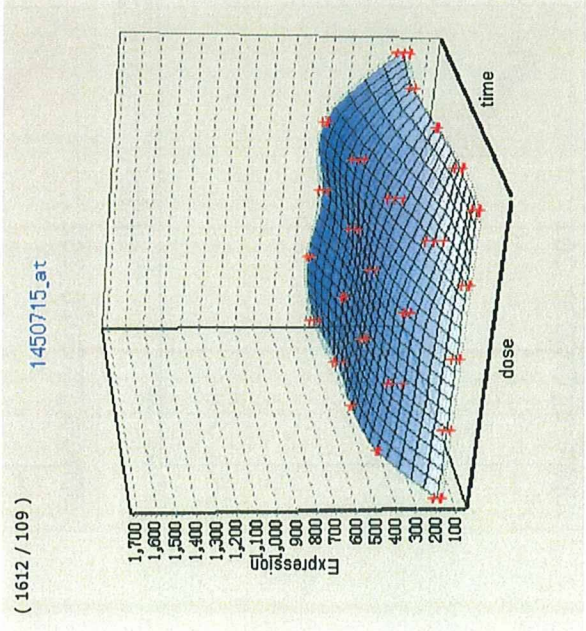


実験条件:LBM Liver100%

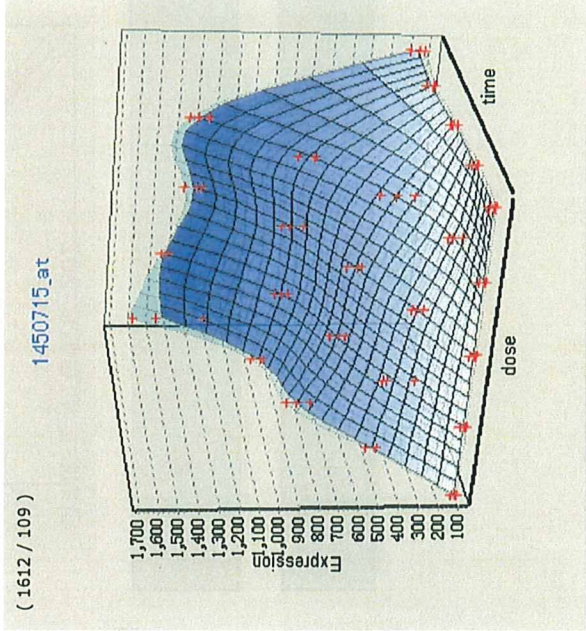
LBM_05は大きめに推定されている。
LBM_10とLBM15の間は低域でも再現されている

1.4. システム組込 補正結果 (TTG20)

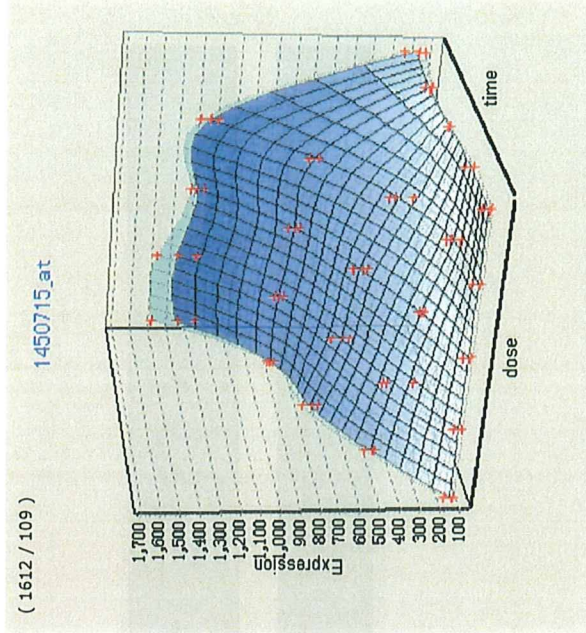
TCDD処置のCyp1a2の結果を、MAS5、M-Lang、QPCRの結果を比較した



MAS5



M-Lang



QPCR

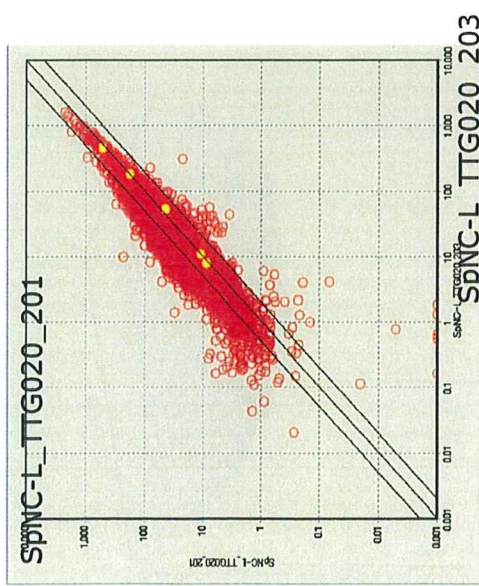
QPCRとM-Langは同じようなサーフェースとなった。

発現レベルがQPCRと同レベルであり、適切であったと思われる

Cyp1a2
1450715_at
cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2

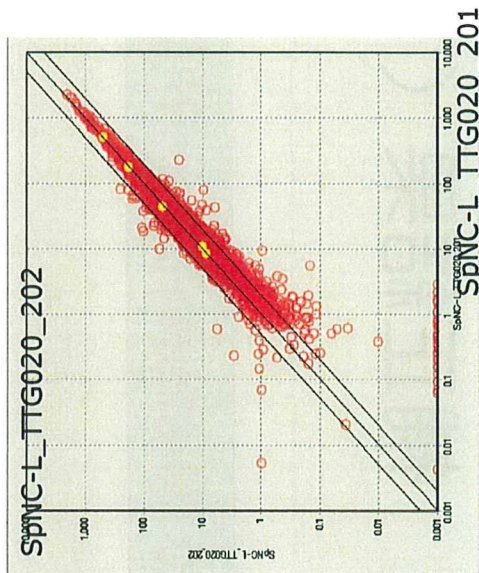
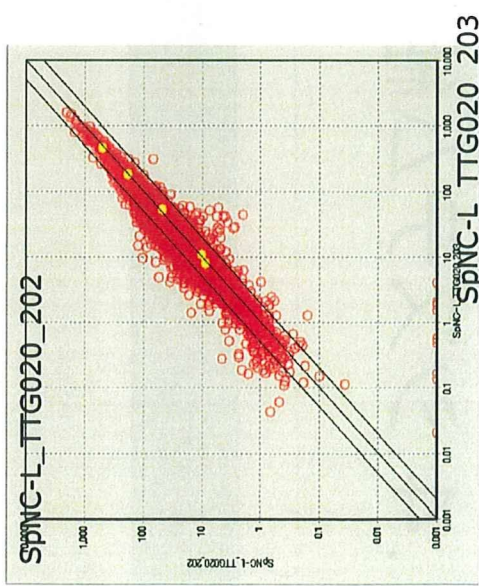
1.4.システム組込 補正結果 (TTG20)

Scatter Plotによる同一実験条件における再現性確認



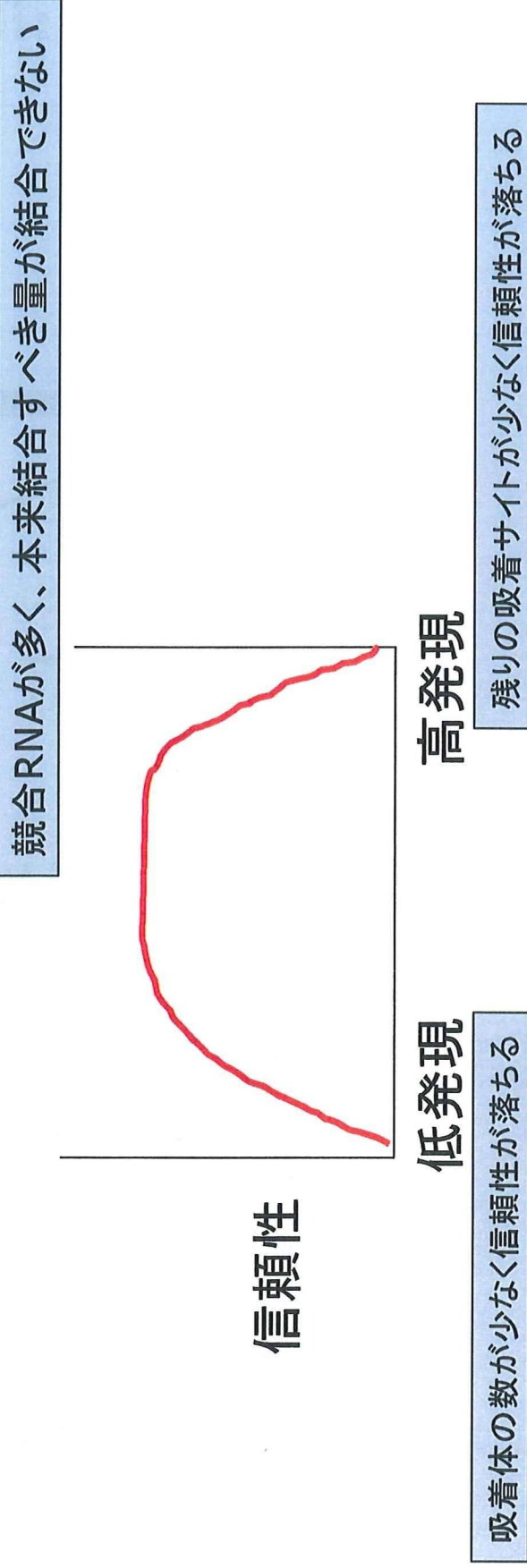
実験条件: TTG020 24H High-Dose

203が少し小さめに推定されているようである。



2.1.プローブ信頼性指標

半特異的結合の結合状態により、補正結果の信頼性を示す指標を作成する。

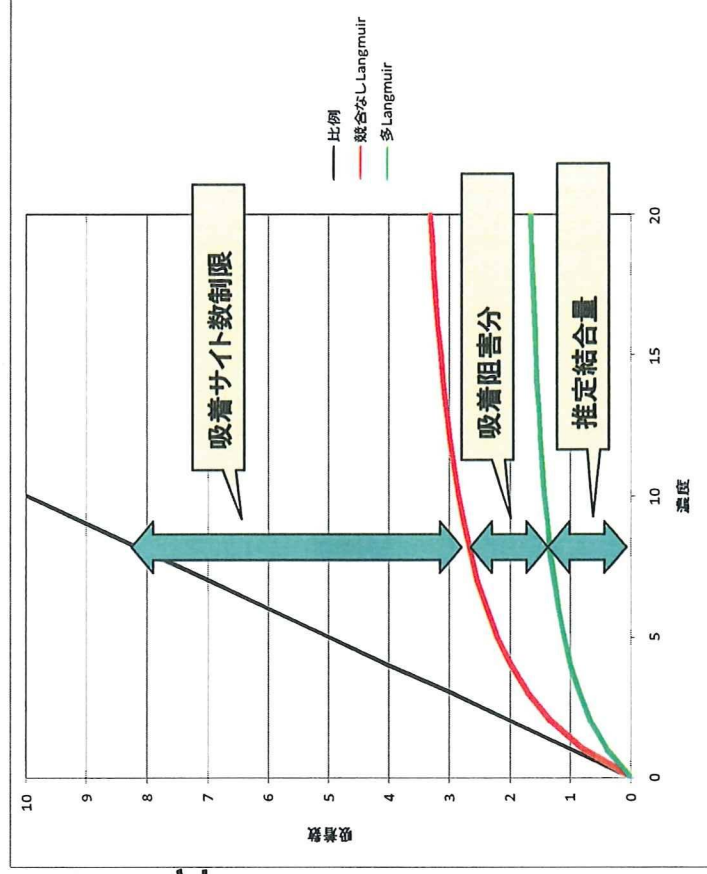


2.2.プローブ信頼性指標アイデア

- ・ 計算アイデア

- 推定された濃度で、次の2項目の影響がなかった場合の吸着数と観測吸着数の比をプローブ補正の信頼性指標とする。

1. 吸着サイト数の制限(飽和影響)
2. 半特異的結合による吸着阻害



Affymetrixが目標として定義したプローブセットを用いて行う。

発現値と本アイデアの指標に関し、どのような分布になるか、確認してみる

2.2.プローブ信頼性指標アイデア

Affymetrixの設計の対象RNAにおける

- ・ 吸着サイト数の制限 (Langmuir方程式)
- ・ 半特異的結合による吸着阻害

プローブ補正信頼性指標1

- ・ 吸着サイト数の制限 (飽和影響)

推定吸着量

サイト数制限がなく、半特異的結合がない場合の吸着量

濃度が高いものほど、小さな値になる(飽和影響)

プローブ補正信頼性指標2

- ・ 半特異的結合による吸着阻害

対象RNAの結合

半特異的結合を含めた全結合

濃度が低いものほど、小さな値になる(半特異的結合影響)

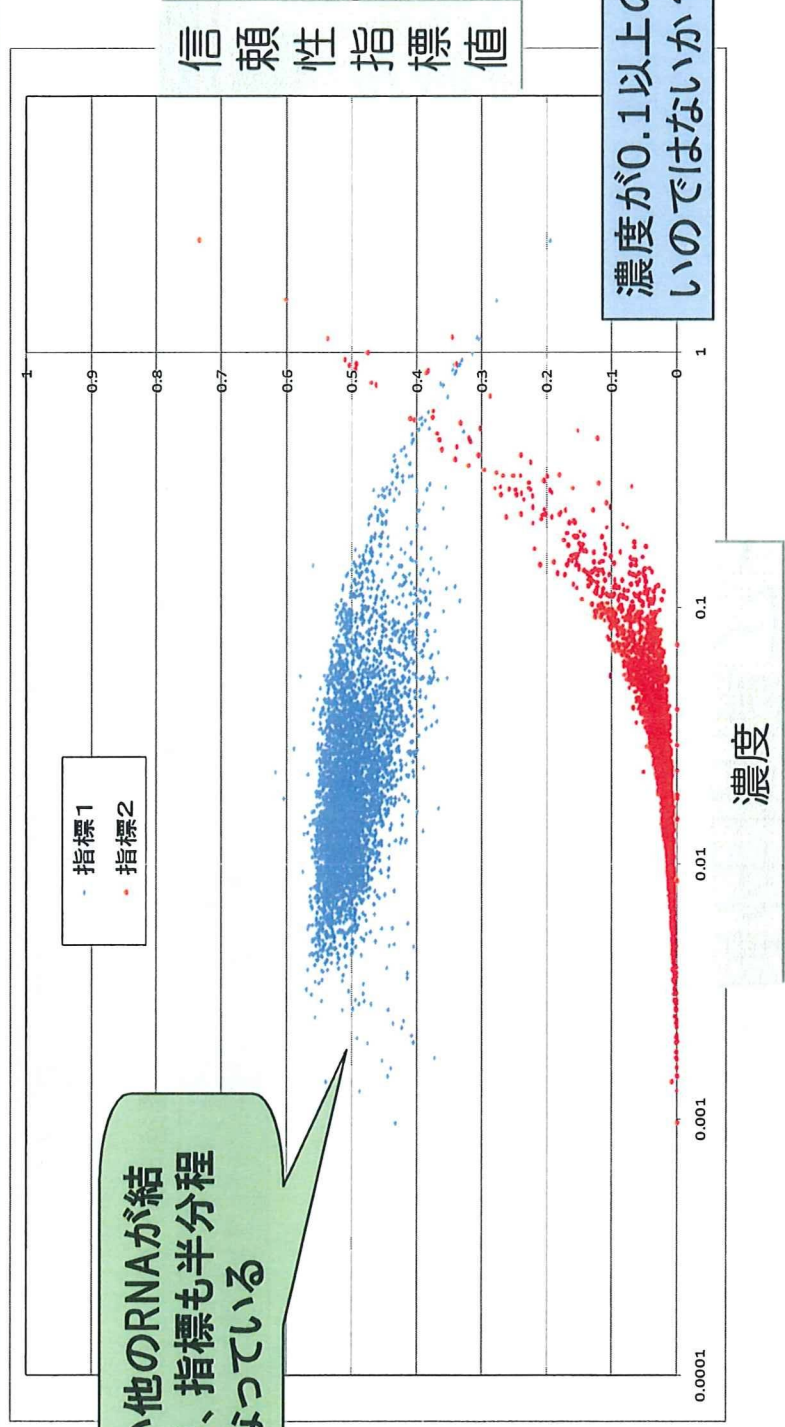
2.3.プローブ信頼性指標計算結果

結果サンプル(4000プローブ)

プローブ補正信頼性指標1
濃度が高いものほど、小さな値になる(飽和影響)

プローブ補正信頼性指標2
濃度が低いものほど、小さな値になる

半分ぐらい他のRNAが結合しており、指標も半分程度の値となっている



3.1. 最大値の検討

ある実験結果の補正を試みた際に、1プローブセット内の全PMプローブが設定最大値(28000)を超過し、値が計算不能となった。

最大値はチップ型番に対して1個として定義している。露光の程度などの影響を考慮し、物理1チップごとに定義すべきではないか？

チップ間で、最大値を変動させる要因として考えられるもの

- 溶液濃度
- ハイブリダイゼーション
- 洗浄
- 露光
- 飛沫
- 背景
- 最大光量

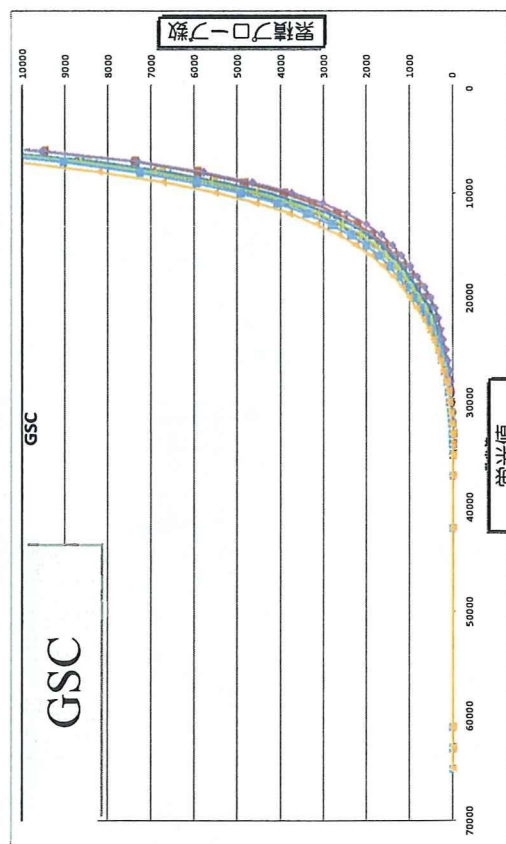
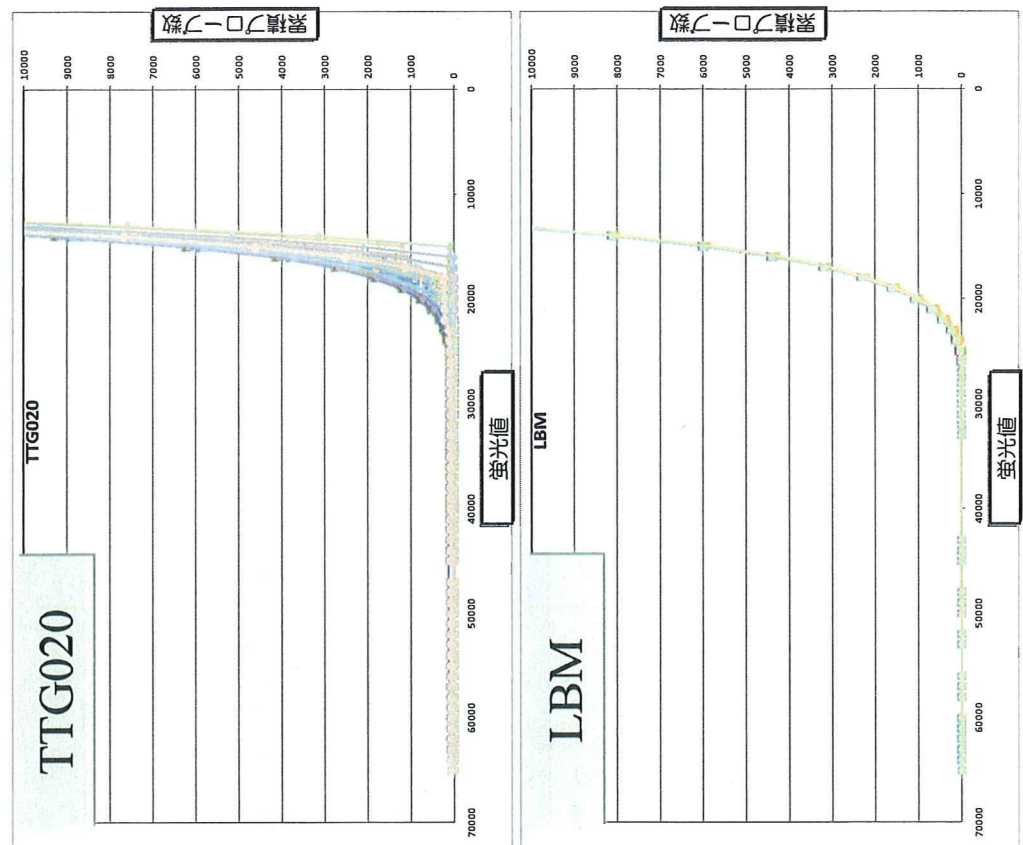
- ・計算システムへ、最大値を入力値とする
- ・測定値から最大値を推定方法の確立を目指す

が、今後修正された場合に、システムへの修正を最小限とするために、入力値とする

3.2.最大値の検討（状況把握）

- 蛍光値の最大値近辺の分布状況を示す

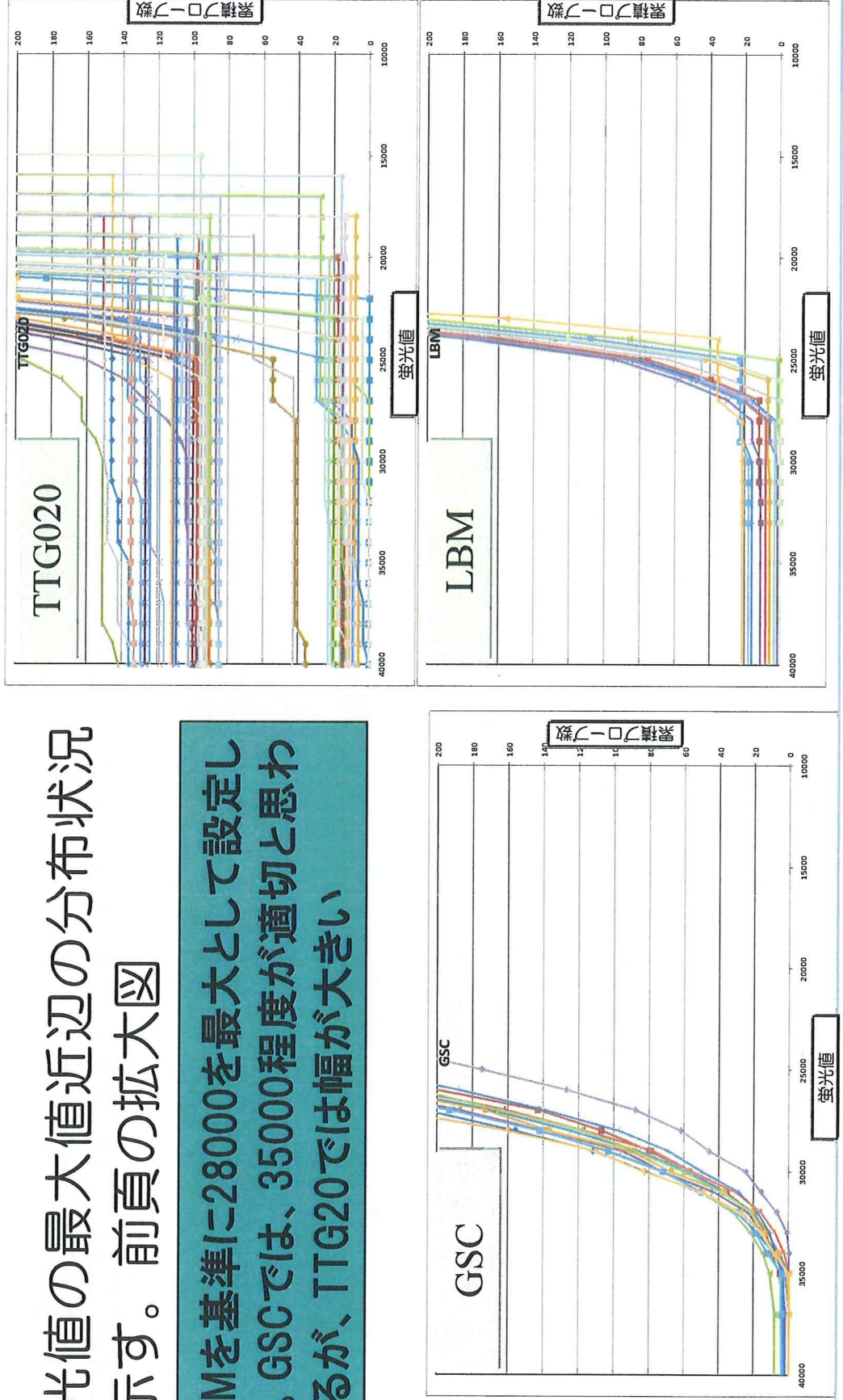
LBMが最も揃っており、TTG020が最も幅がある。



3.2. 最大値の検討（状況把握）

蛍光値の最大値近辺の分布状況を示す。前頁の拡大図

LBMを基準に28000を最大として設定した。GSCでは、35000程度が適切と思われるが、TTG20では幅が大きい



3.2.最大値の検討（状況把握）

最大値近辺の蛍光値分布状況をまとめると

本補正方法における、チップごとの最大値(lmax)は非常に重要な要素であり、適切な推定方法が必要である。

LBM、TTG20、GSCの各プロジェクトを用いて、プロジェクト間でのように違うのが確認した。

当初、LBMをチェックした限りでは、同じ値を用いても差し支えなさそうであったが、他のプロジェクトには難しそうであった。

ゴミが存在し、ハイブリダイゼーションとは関係なく、蛍光を発していると思われるプローブが存在した。

ゴミと考えられるような高輝度のプローブを除去する方法ではどうか？

次に明るいプローブと2000以上差があるものはゴミとみなす

3.3.最大値の検討（状況把握）

データ分布上ゴミとみなせそうなプローブ（LBMの例）

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	64197	65515	28462	65401	57616	58448	48054	62230	65505	53863	25418	26468	56894	65455	65421
2	62484	65317	24982	31723	32885	29703	33120	53453	64657	50817	24994	25198	52826	65415	65416
3	45400	29049	24122	26390	27671	27182	24438	49478	60963	43728	24627	24801	52368	65388	65413
4	27895	27536	23848	26041	27248	27104	23811	27284	44864	30318	24535	24688	27531	63042	65334
5	27852	27008	23739	26031	26987	26556	23599	24483	29778	25007	24499	24586	26194	62884	64901
6	27550	26702	23635	25950	26787	26404	22765	23786	26190	24539	24478	24369	24024	62719	63657
7	27215	26651	23563	25883	26578	25874	22463	23576	25218	24287	23962	24321	23499	53836	61651
8	27115	26437	23562	25238	26379	25806	22414	22863	24727	24031	23877	24178	23017	50430	61005
9	26953	26334	23392	25208	26087	25743	22339	22298	24556	23909	23846	24029	22730	27178	29963
10	26915	26321	23385	25200	26053	25661	22072	22292	24059	23895	23475	23825	22651	23903	29097
11	26665	26173	23229	24945	25960	24882	22058	22282	24054	23858	22960	23128	22468	22217	24890
12	26443	25737	23213	24798	25683	24643	21807	22189	23990	23843	22934	22989	22098	21921	24068
13	26368	25663	23176	24786	25264	24306	21625	22146	23939	23631	22732	22845	22060	21916	23864
14	26330	25549	23133	24642	24970	24299	21624	22059	23916	22867	22495	22781	22023	21726	23765
15	26114	25439	23018	24614	24853	24292	21608	22023	23857	22704	22449	22674	22016	21621	23762
16	26081	25287	22959	24532	24792	24255	21130	21819	23845	22659	22432	22582	21989	21574	23567
17	25998	25082	22957	24471	23945	24141	21087	21816	23702	22169	22430	22564	21699	21475	23549
18	25987	25067	22770	24420	23894	24127	21082	21647	23639	21957	22255	22471	21480	21420	23109
19	25918	24959	22679	24317	23703	24087	21044	21632	23636	21616	22191	22454	21315	21401	22540
20	25739	24929	22334	24254	23687	24024	21006	21397	23517	21521	22098	22450	21172	21074	22487
21	25667	24893	22234	24193	23639	24014	20968	21388	23440	21323	22075	22331	21146	20983	22305
22	25599	24875	22133	24167	23299	23790	20870	20973	23374	21316	21916	22331	21104	20946	22141
23	25570	24849	22097	24086	23247	23783	20826	20960	23283	21060	21904	22301	21076	20832	22091
24	25557	24842	22086	24067	23145	23713	20703	20882	23032	21051	21891	22278	21010	20731	21737
25	25552	24752	22056	23971	23040	23532	20335	20727	22918	20989	21876	22257	20976	20721	21563

Magendaはエラーと思われる。黄色は次の順位と離れすぎているのでエラーかもしれない
 いプローブ

3.3.最大値の検討（状況把握）

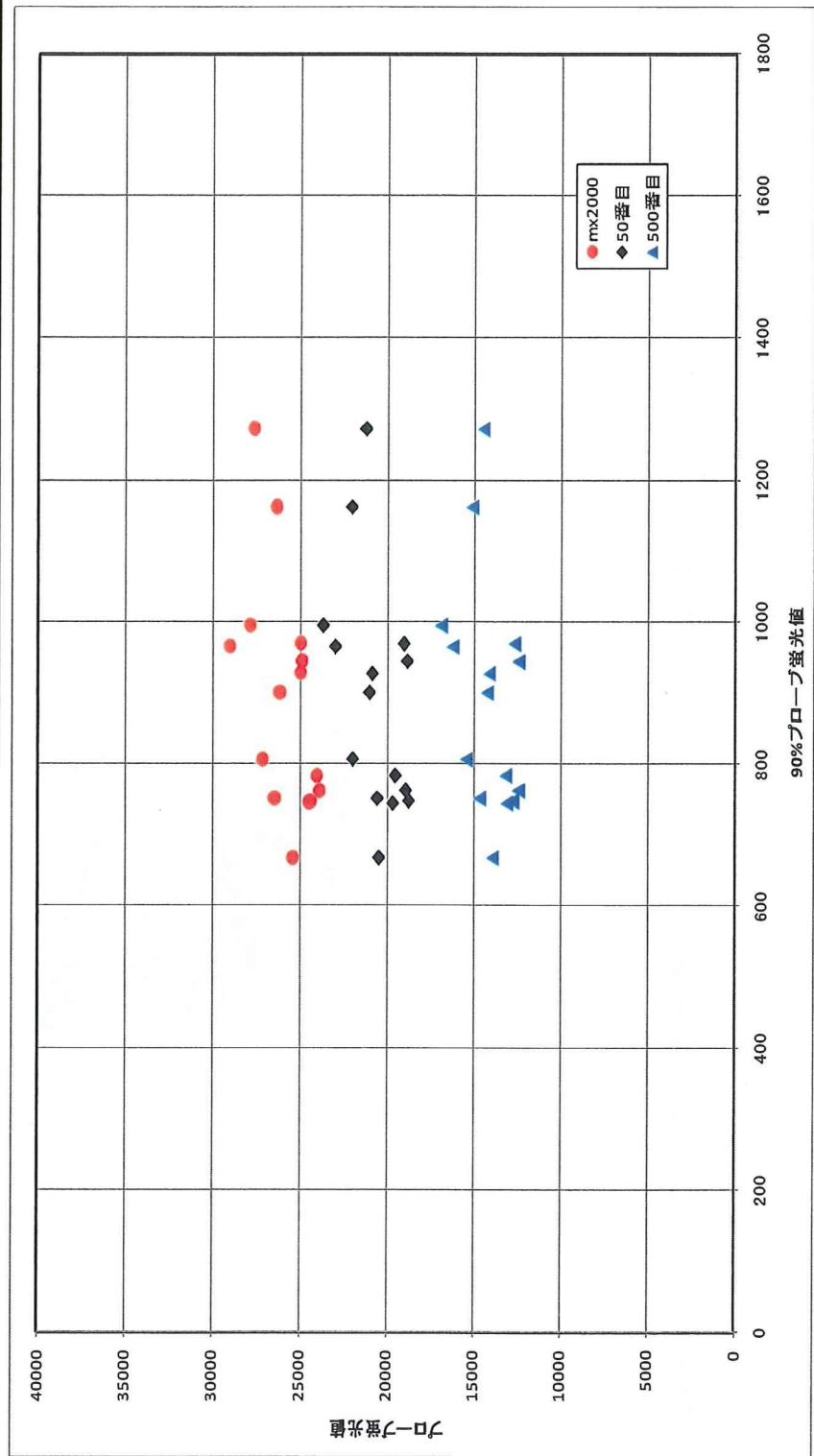
データ分布上ゴミとみなせそうなプローブ(GSCの例)

	111	112	121	122	131	132	141	142	151	152	161	162
1	35877	65496	65372	65358	34967	35771	65487	34905	65530	33213	65389	34783
2	35361	65481	65368	65295	34562	34970	65378	34264	65491	32513	65360	34757
3	34877	65223	65342	35460	34300	34925	65351	34037	65479	32430	65352	34489
4	34873	65159	65342	35077	34263	34580	34431	33923	42868	32355	61226	34110
5	34814	35047	65203	34989	34037	34382	34224	33534	37547	32152	34975	34074
6	34687	34679	65198	34938	33869	34072	34150	33358	34956	32071	34952	34038
7	34611	34658	65185	34447	33631	33901	34094	33348	34469	32027	34815	34024
8	34597	34434	63636	33954	33612	33845	33856	33348	34405	31929	34566	34018
9	33934	34321	35734	33910	33491	33786	33710	32960	34025	31921	34165	33956
10	33851	34033	35441	33803	33484	33175	33251	32749	33906	31684	34130	33943
11	33851	33977	35389	33797	33303	33168	33021	32734	33775	31468	34061	33598
12	33813	33542	34680	33655	33033	33132	32964	32493	33733	31410	34026	33567
13	33657	33110	34669	33567	32988	32964	32699	32391	33478	31177	33861	33505
14	33598	32997	34628	33498	32893	32847	32186	32326	33210	31153	33277	33451
15	33330	32908	34566	33265	32707	32697	32165	32098	33187	31123	33263	33204
16	33284	32788	33615	32968	32507	32521	32134	32089	33118	31045	33227	32950
17	33036	32605	33464	32895	32362	32452	32130	31867	32621	30667	33212	32842
18	33033	32401	33434	32811	32113	32439	32015	31852	32559	30642	33121	32735
19	32934	32368	33149	32646	32075	32385	31891	31839	32537	30491	33069	32706
20	32892	32333	33129	32600	32063	32357	31633	31786	32228	30490	32592	32564

ゴミとみなしたプローブ以外で最大となったプローブの値を基準にlmaxを設定する方法が適切であると思われる。

3.3.最大値の検討（状況把握）

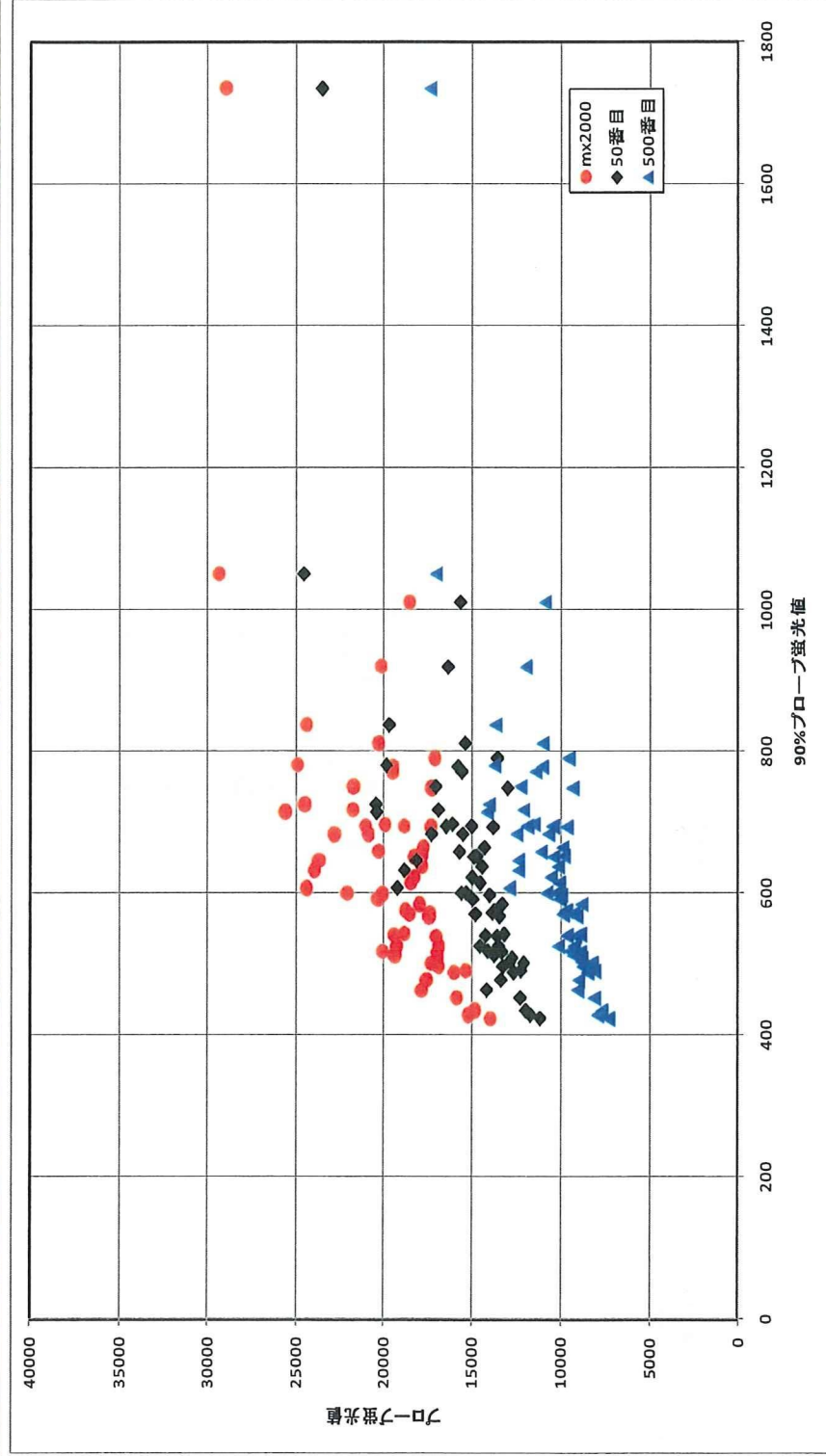
2000以上ギャップによる最大値判定と50番目、500番目蛍光値の分布(LBM)



ゴミと考えられるプロープを取り除くと、25000~30000の間であり、一定値であるとみなせる可能性がある

3.3.最大値の検討（状況把握）

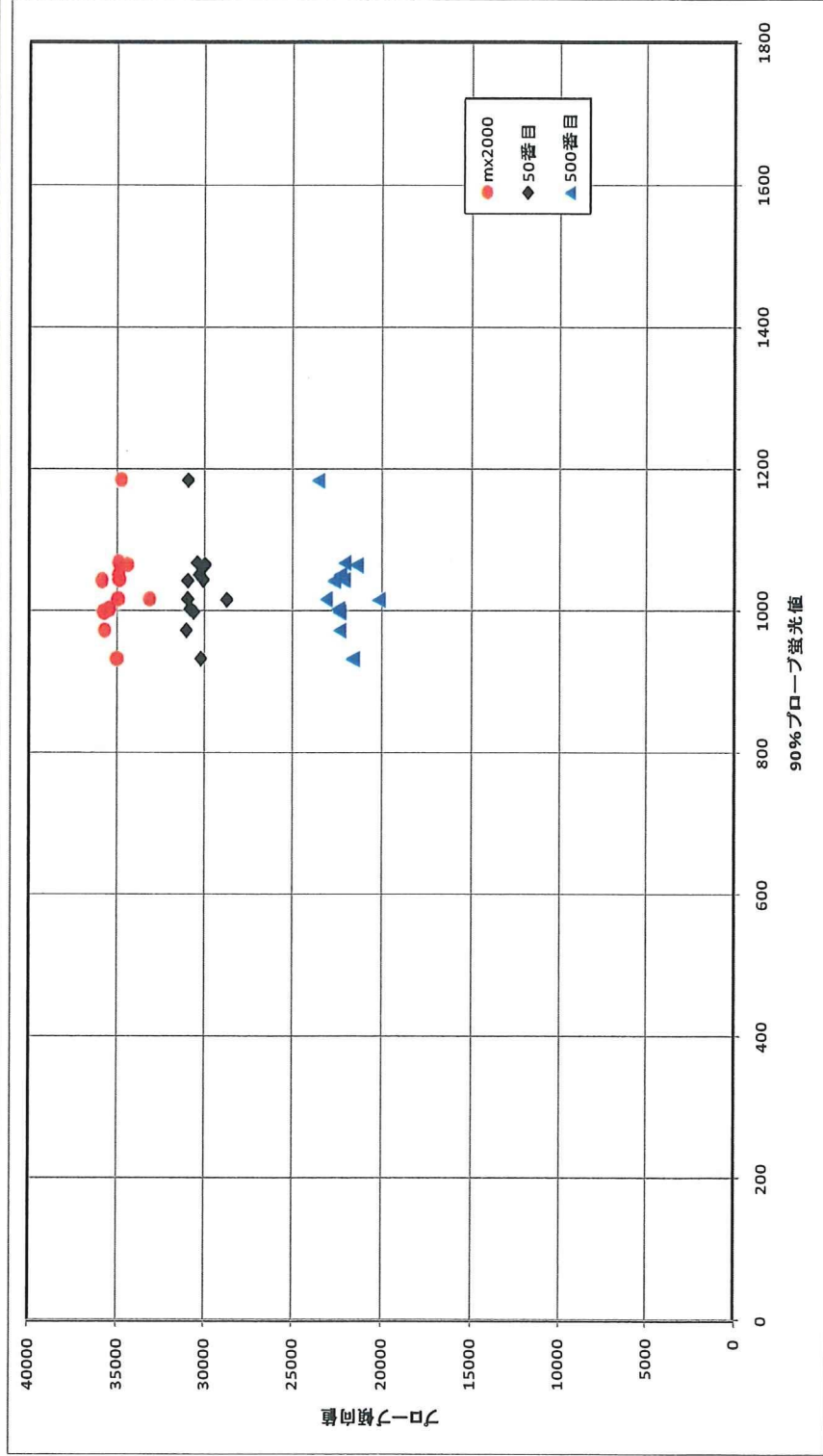
2000以上ギャップによる最大値判定と50番目、500番目蛍光値の分布(TTG20)



90パーセンタイルのプロープがかなり低い場合には、最大も低くなっており、光学系から問題が発生している可能性がある

3.3.最大値の検討（状況把握）

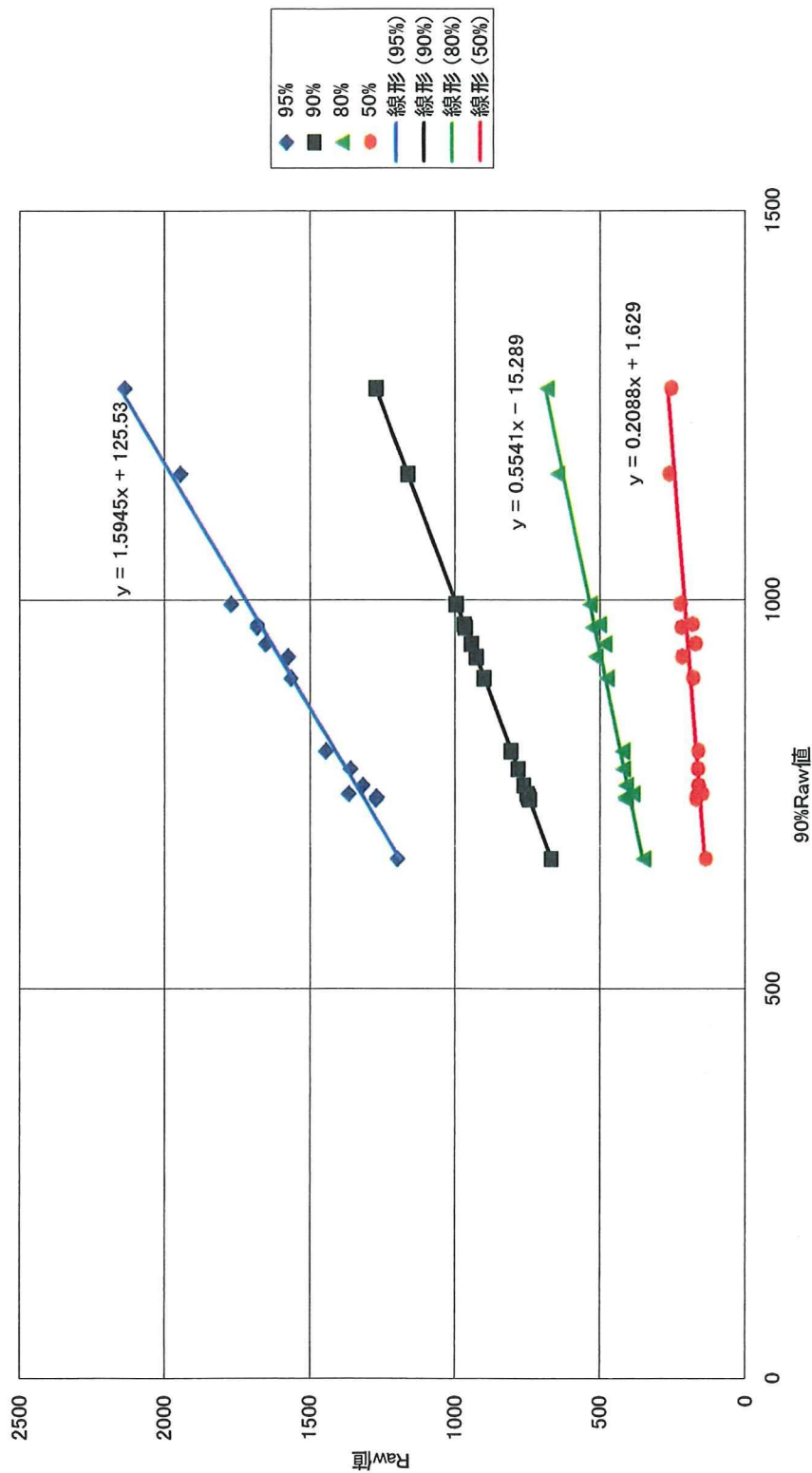
2000以上ギャップによる最大値判定と50番目、500番目蛍光値の分布(GSC)



ゴミと考えられるプローブを取り除くと、35000前後に最大値があり、一定値であるとみなせる可能性
がある

3.3.最大値の検討（状況把握）

LBMにおける、Probe単位パーセンタイルの関係



チップごとに係数がかけられているように思われる

3.3.最大値の検討（状況把握）

LBMのプロポーブ単位の生値の順位をチェックし、異常値と考えられるプロポーブを特定し、計測誤りのない最大と想定される値の抽出を試みた。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	64197	65515	28462	65401	57616	58448	48054	62230	65505	53863	25418	26468	56894	65455	65421
2	62484	65317	24982	31723	32885	29703	33120	53453	64657	50817	24994	25198	52826	65415	65416
3	45400	29049	24122	26390	27671	27182	24438	49478	60963	43728	24627	24801	52368	65388	65413
4	27895	27536	23848	26041	27248	27104	23811	27284	44864	30318	24535	24688	27531	63042	65334
5	27852	27008	23739	26031	26987	26556	23599	24483	29778	25007	24499	24586	26194	62884	64901
6	27550	26702	23635	25950	26787	26404	22765	23786	26190	24539	24478	24369	24024	62719	63657
7	27215	26651	23563	25883	26578	25874	22463	23576	25218	24287	23962	24321	23499	53836	61651
8	27115	26437	23562	25238	26379	25806	22414	22863	24727	24031	23877	24178	23017	50430	61005
9	26953	26334	23392	25208	26087	25743	22339	22298	24556	23909	23846	24029	22730	27178	29963
10	26915	26321	23385	25200	26053	25661	22072	22292	24059	23895	23475	23825	22651	23903	29097
11	26665	26173	23229	24945	25960	24882	22058	22282	24054	23858	22960	23128	22468	22217	24890
12	26443	25737	23213	24798	25683	24643	21807	22189	23990	23843	22934	22989	22098	21921	24068
13	26368	25663	23176	24786	25264	24306	21625	22146	23939	23631	22732	22845	22060	21916	23864
14	26330	25549	23133	24642	24970	24299	21624	22059	23916	22867	22495	22781	22023	21726	23765
15	26114	25439	23018	24614	24853	24292	21608	22023	23857	22704	22449	22674	22016	21621	23762
16	26081	25287	22959	24532	24792	24255	21130	21819	23845	22659	22432	22582	21989	21574	23567
17	25998	25082	22957	24471	23945	24141	21087	21816	23702	22169	22430	22564	21699	21475	23549
18	25987	25067	22770	24420	23894	24127	21082	21647	23639	21957	22255	22471	21480	21420	23109
19	25918	24959	22679	24317	23703	24087	21044	21632	23636	21616	22191	22454	21315	21401	22540
20	25739	24929	22334	24254	23687	24024	21006	21397	23517	21521	22098	22450	21172	21074	22487
21	25667	24893	22234	24193	23639	24014	20968	21388	23440	21323	22075	22331	21146	20983	22305
22	25599	24875	22133	24167	23299	23790	20870	20973	23374	21316	21916	22331	21104	20946	22141
23	25570	24849	22097	24086	23247	23783	20826	20960	23283	21060	21904	22301	21076	20832	22091
24	25557	24842	22086	24067	23145	23713	20703	20882	23032	21051	21891	22278	21010	20731	21737
25	25552	24752	22056	23971	23040	23532	20335	20727	22918	20989	21876	22257	20976	20721	21563

Magendaはエラーと思われる。黄色は次の順位と離れすぎているのでエラーかもしれないプロポーブ