

Cufflinks Assembly & DE v2.0

BaseSpace App Guide

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。

はじめに	3
ワークフロー	5
グローバル解析のワークフロー	6
発現差解析のワークフロー	7
解析パラメーターの設定	8
解析手法	11
解析出力	12
改訂履歴	20
テクニカルサポート	

ILLUMINA PROPRIETARY

文書番号：1000000006108 v00 JPN
2016年2月

illumina®



本文書およびその内容は、Illumina, Inc. およびその関連会社（以下、「イルミナ」という）の所有物であり、本文書に記載された製品の使用に関連して、イルミナの顧客が契約上使用することのみを意図したものであり、その他の目的を意図したものではありません。本文書およびその内容を、イルミナの書面による事前同意を得ずにその他の目的で利用または配布してはならず、また方法を問わず、その他伝達、開示または複製してはなりません。イルミナは、本文書によって、自身の特許、商標、著作権またはコモンロー上の権利に基づくいかなるライセンスも譲渡せず、また第三者の同様の権利も譲渡しないものとします。

本文書に記載された製品の適切かつ安全な使用を徹底するため、資格を有した、適切なトレーニングを受けた担当者が、本文書の指示を厳密かつ明確に遵守しなければなりません。当該製品の使用に先立ち、本文書のすべての内容を熟読し、理解する必要があるものとします。

本文書に含まれるすべての指示を熟読せず、明確に遵守しない場合、製品を損ない、使用者または他者を含む個人に傷害を負わせ、その他の財産に損害を与える結果となる可能性があります。

イルミナは、本文書に記載された製品（その部品またはソフトウェアを含む）の不適切な使用から生じる責任、または、顧客による当該製品の取得に関連してイルミナから付与される明示的な書面によるライセンスもしくは許可の範囲外で当該製品が使用されることから生じる責任を一切負わないものとします。

© 2016 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina、24sure、BaseSpace、BeadArray、BlueFish、BlueFuse、BlueGnome、cBot、CSPPro、CytoChip、DesignStudio、Epicentre、ForenSeq、Genetic Energy、GenomeStudio、GoldenGate、HiScan、HiSeq、HiSeqX、Infinium、iScan、iSelect、MiniSeq、MiSeq、MiSeqDx、MiSeq FGx、NeoPrep、NextBio、Nextera、NextSeq、Powered by Illumina、SureMDA、TruGenome、TruSeq、TruSight、Understand Your Genome、UYG、VeraCode、verifi、VeriSeq、 パンプキンオレンジ色および遺伝子エネルギーの流れをベースとしたデザインは、Illumina, Inc.の商標または登録商標です。本文書に含まれるその他すべてのブランドおよび名称は、それら個別の所有者に帰属する所有物です。

はじめに

BaseSpace® Cufflinks Assembly & DE v2.0 Appは、RNA-Seq Alignment Appの解析結果を使用して新規転写産物アイソフォームおよび遺伝子発現レベルを迅速に評価することができます。本アプリではCuffmerge、Cuffquant、Cuffnorm、およびCufflinksを使用して、新規転写産物のマージを実行します。また、Cuffmerge、Cuffquant、およびCuffdiffを使用して、発現差解析を実行します。

互換性のあるライブラリー

Cufflinks Assembly & DE Appと互換性のあるライブラリータイプの一覧についてはBaseSpaceサポートページを参照してください。

バージョン

以下のコンポーネントはCufflinks Assembly & DE Appに使用されます。

ソフトウェア	バージョン
Isis (Analysis Software)	2.6.25.12
Bedtools	2.17.0
Cufflinks	2.2.1
BLAST	2.2.26+

ワークフロー要件

- ▶ RNA-Seq Alignment Appからのアライメント結果が必要です。
- ▶ 全グループで最大120アライメントの結果をサポートします。
- ▶ 各グループにおいては最大200 GBサイズのアライメントの結果をサポートします。

リファレンスゲノム

以下のリファレンスゲノムを利用することができます：

- ▶ *Homo sapiens* UCSC hg19 (RefSeq & Gencode 遺伝子アノテーション)
- ▶ *Homo sapiens* UCSC hg38 (RefSeq & Gencode 遺伝子アノテーション)
ヒトリファレンスゲノムはPAR-Maskedされており、これは性染色体の重複領域に対するリードのミスマッピングを防ぐために、Y染色体の擬似常染色体領域 (PAR) の領域がNでマスクされていることを意味する。
- ▶ *Arabidopsis thaliana* EnsemblTAIR10 (Ensembl 遺伝子アノテーション)
- ▶ *Bos taurus* UCSC bosTau6 (RefSeq 遺伝子アノテーション)
- ▶ *Caenorhabditis elegans* UCSC ce10 (RefSeq 遺伝子アノテーション)
- ▶ *Danio rerio* UCSC danRer7 (RefSeq 遺伝子アノテーション)
- ▶ *Drosophila melanogaster* UCSC dm3 (RefSeq 遺伝子アノテーション)
- ▶ *Gallus gallus* UCSC galGal4 (RefSeq 遺伝子アノテーション)
- ▶ *Mus musculus* UCSC mm9 (RefSeq 遺伝子アノテーション)
- ▶ *Mus musculus* UCSC mm10 (RefSeq 遺伝子アノテーション)
- ▶ *Oryza sativa japonica* EnsemblIRGSP-1.0 (Ensembl 遺伝子アノテーション)
- ▶ *Rattus norvegicus* UCSC rn5 (RefSeq 遺伝子アノテーション)
- ▶ *Saccharomyces cerevisiae* EnsemblR64-1-1
(Ensembl 遺伝子アノテーション)
- ▶ *Sus scrofa* UCSC susScr3 (RefSeq 遺伝子アノテーション)
- ▶ *Zea mays* EnsemblAGPv3 (Ensembl 遺伝子アノテーション)

ワークフロー

- ▶ **Novel Transcript Merging** : RNA-Seq Alignment Appが新規転写産物アセンブリを実行するとき、Cuffmergeツールが転写産物アセンブリを各サンプルグループ内にマージし、それらをアノテーションからの既知の遺伝子モデルと組み合わせます。Cuffcompareツールは、リファレンスアノテーションとアセンブリした転写産物を比較します。例えば、Cuffcompareはアセンブリした転写産物が既知の転写産物と重複するかどうかを確認します。最後に、Cuffcompareはそれぞれ既知または新規の転写産物に対する存在量を再推定します。
- ▶ **Differential Expression** : Cuffdiffツールは2サンプルグループ間の発現差を計算し、2グループ中の個々のサンプルから分散を推定します。詳しくは、cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/cuffdiff/を参照してください。
 - ▶ Cuffdiffが発現差を計算するには、異なるサンプルグループ間で比較された転写産物のコンセンサセットが必要です。新規転写産物アセンブリを選択するとき、Cuffmergeは各サンプルグループから転写産物のコンセンサセットをマージし、続いてアノテーションからの既知の遺伝子モデルをマージします。新規転写産物が実行されないときは、転写産物のコンセンサセットはリファレンスアノテーションに設定されます。

グローバル解析のワークフロー

図1 Cufflinksグローバル解析ワークフロー



発現差解析のワークフロー

図2 Cufflinks発現差解析のワークフロー



解析パラメーターの設定

- 1 BaseSpaceに進み、[Apps] タブをクリックします。
- 2 カテゴリーにおいて、[RNA-Seq] をクリックし、次に [Cufflinks Assembly & DE] をクリックします。
- 3 ドロップダウンリストから、[version 2.0.0] を選択し、次に [Launch] をクリックし、アプリを開きます。
- 4 [App Session Name] フィールドに解析名を入力します。
初期設定では、解析名にはアプリ名に続き、解析開始日時が記載されます。
- 5 [Save Results To] フィールドから、アプリの結果を保存するプロジェクトを選択します。



注意

手順6から10はRNA-Seq Alignment Appに一覧表示されるフィルターオプションです。
[App Result Groups] セクションにアプリの結果を選択する前にすべてのフィルターを設定できます。

- 6 [Reference Genome] フィールドから、リファレンスゲノムと遺伝子アノテーションのセットを選択します。
このリファレンスゲノムにアラインしたRNA-Seq Alignmentアプリの結果のみCufflinks解析に使用することができます。
- 7 [Strandedness] フィールドから、以下のオプションを選択します：
 - ▶ First Strand
 - ▶ Not Strand Specific
 - ▶ Second Strand
- 8 [Aligner] フィールドから、以下の手法を選択します：
 - ▶ STAR
 - ▶ TopHat(Bowtie)
 - ▶ TopHat(Bowtie2)
- 9 [Novel Transcript Assembly] フィールドから、以下のオプションを選択します：
 - ▶ Novel Assembly was not completed in RNA-Seq Alignment
 - ▶ Novel Assembly was completed in RNA-Seq Alignment
- 10 [Panel] フィールドから、以下のオプションを選択します：
 - ▶ None
 - ▶ TruSight RNA Pan-Cancer
- 11 [App Result Groups] セクションの [Label] フィールドでグループラベル名を入力します。
ペアワイズ発現差解析には少なくとも2グループ必要です。
- 12 プラス (+) をクリックし、追加グループを加えます。
- 13 [POLYA] フィールドで、サンプルがpolyA選択で調製されたかどうかを選択します。
このオプションは、RNA-Seq Alignment Appが新規転写産物アセンブリを実行した場合、利用することができます。
- 14 [Select App Results] フィールドから、当該グループに使用するRNA-Seq Alignment Appから作成された結果を選択します。
複数の選択はレプリケートのあるシングルグループとして扱われます。

- 15 オプション：ペアワイズ発現差解析のため、**[Enable Pairwise Differential Expression Analysis]** のチェックボックスを選択します。
初期設定では、すべてのグループのペアに対し発現差解析が実行されます。
- 16 オプション：以下の手順を完了し、比較したいグループを指定します。
- [Select Pairs of Groups for Differential Expression Analysis]** チェックボックスを選択します。
 - コントロールグループ名を入力します。
 - 比較グループ名を入力します。
 - プラス (+) をクリックし、ペアワイズ発現差解析に加えるペアグループを追加します。
- 比較グループ名およびコントロールグループ名は [App Result Group] セクションのグループラベル名のいずれかと同じになるようにしてください。
- 17 オプション：**[Set Advanced Options]** チェックボックスを選択して、高度なオプションを有効にし、適切なオプションの値を指定します。
- 18 **[Continue]** をクリックしてください。
Cufflinks Assembly & DE Appが解析を開始します。
解析が完了したら、本アプリはセッションのステータスを更新し、電子メール通知を送信します。

高度なオプション

[Advanced Options] は、解析結果を向上するために以下のオプション設定を行います。

表1 Cuffdiffオプションテーブル

オプション	内容説明
Hits Normalization	<p>[Compatible] : Cuffdiffは、FPKMの分母に使用されているマップされたフラグメント数に対して、いくつかのリファレンス転写産物と整合するフラグメントのみカウントします。リボソームのリードが遺伝子の発現差量に影響を与えてしまい誤った結果を生成するといった類のバイアスを低減するため、このオプションは推奨されます。このオプションは初期設定です。</p> <p>[Total] : Cuffdiffはリファレンス転写産物と整合しないフラグメントを含め、FPKMの分母に使用されているマップされたフラグメント数に対して、すべてのフラグメントをカウントします。</p>
False Discovery Rate	比率を入力します。初期設定は0.05です。
Dispersion Method	<p>[Pooled] : この方法は、レプリケートのある各条件すべてからそれぞれモデルを作成した後、つくられたモデル全てを1つのグローバルモデルとして平均化し、実験の全条件に対して使用します。このオプションは初期設定です。</p> <p>[Per-Condition] : この方法は、レプリケートの条件それぞれにモデルを作成します。このオプションは、すべての条件にレプリケートがある場合に利用可能です。</p>

オプション	内容説明
Minimum Isoform Fraction	<p>最良の結果を得るためには、初期設定値を変更しないでください。初期設定は1e-5です。</p> <p>Cuffdiffは、主要アイソフォームの特定の比率を下回る数値となった他のアイソフォームの存在量を、切り捨てて0とします。</p> <p>このプロセスは最尤推定量（maximum-likelihood estimation, MLE）の推定後かつ帰納的最大確率（maximum a posteriori, MAP）の推定前に行われ、信頼区間の作成および発現差解析の頑健性が向上します。</p>

表2 Cuffdiff/Cuffnormオプションテーブル

オプション	内容説明
Library Normalization Method	ライブラリーサイズのノーマライゼーション法を選択します（すなわちシーケンスの深さ）。

表3 Cuffnorm/Cufflinksオプションテーブル

オプション	内容説明
Hits Normalization	<p>[Compatible] : Cuffnorm/Cufflinksは、FPKMの分母に使用したマップされたフラグメント数に対して、いくつかのリファレンス転写産物と整合するフラグメントのみカウントします。このオプションは初期設定です。</p> <p>[Total] : Cuffnorm/Cufflinksは、リファレンス転写産物と整合しないフラグメントを含め、FPKMの分母に使用したマップされたフラグメント数に対して全フラグメントをカウントします。</p>

表4 Cuffquant/Cufflinksオプションテーブル

オプション	内容説明
Fragment Bias Correction	バイアス検出および補正アルゴリズムを実施するために選択します。これにより転写産物の推定量の精度を向上することができます。
Multi-read Correction	より正確にゲノムの複数の位置にマッピングするリードを評価するために選択します。

表5 Cuffquant/Cufflinks/Cuffdiffオプションテーブル

オプション	内容説明
No Effective Length Correction	転写産物FPKMに対する有効長によるノーマライゼーションを無効にします。

解析手法

Cufflinks Assembly & DE AppはCufflinksを使用してシーケンスデータを解析します。

Cufflinks

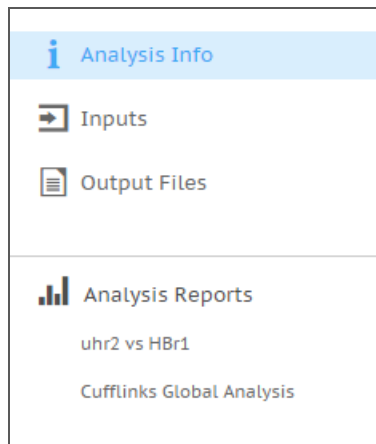
Cufflinksは、アライメントしたRNA-Seqリードを転写産物としてアセンブルし、それらの存在量を推定し、発現差およびトランスクリプトームの制御を検定します。

詳しくは、cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/を参照してください。

解析出力

結果を参照するには、[Projects] タブをクリックして、プロジェクト名、解析を選択してください。

図3 Cufflinks Assembly & DE出力ナビゲーションバー



左のナビゲーションバーを用いて、以下の解析出力にアクセスしてください。

- ▶ [Analysis Info] : ログファイルを含む解析セッションに関する情報。
- ▶ [Inputs] : インプット設定の概要。
- ▶ [Output Files] : サンプル用の出力ファイル。
- ▶ [Analysis Reports]
 - ▶ [control samples vs comparison samples] : コントロールサンプル対比較サンプルの発現差解析。
 - ▶ [Cufflinks Global Analysis] : 集計結果の解析メトリクス。

解析情報

[Analysis Info] のページでは、解析設定および実行詳細について表示します。

行見出し	定義
Name	解析セッション名
Application	この解析を実行したアプリ
Date Started	この解析の開始日時
Date Completed	この解析の終了日時
Duration	解析時間
Session Type	Multi-NodeまたはSingle-Node
Status	解析のステータス。ステータスは [Running] または [Complete] のいずれか、および使用したノード数を示します

ログファイル

ファイル名	内容説明
CompletedJobInfo.xml	終了した解析セッションに関する情報
Logging.zip	ワークフローの各手順の詳細な全ログファイル
SampleSheet.csv	サンプルシート
SampleSheetUsed.csv	サンプルシートのコピー
WorkflowError.txt	ワークフロー実行中に作成されたエラーメッセージ
WorkflowLog.txt	ワークフロー手順の詳細、パラメーター、スケジュール、および進行に伴うコマンドライン処理

出力ファイル

[Output Files] ページから、各サンプル解析の出力ファイルにアクセスできます。

- ▶ FPKMファイル
- ▶ DIFFファイル
- ▶ GTFファイル

RNA-Seq Alignment Appの [Novel Transcript Assembly] オプションを選択した場合、GTFファイルが作成されます。

FPKMファイル

Fragments Per Kilobase of sequence per Million mapped reads(FPKM) は、シーケンスの大きさの特徴とマッピングした全リード数でアライメントしたリード数をノーマライズします。

各出力ディレクトリにおいて、以下の出力ファイルが作成されます。

- ▶ genes.fpkm_tracking: GTFアノテーションファイルに指定された遺伝子の発現を定量化します。
- ▶ isoforms.fpkm_tracking: GTFアノテーションファイルに指定された転写産物の発現を定量化します。

DIFFファイル

Cufflinks Appは、発現差を記載するいくつかのDIFFファイルを作成します。このタブ区切りのファイルは、スプライスした転写産物、一次転写産物、遺伝子、およびコーディングシーケンスについてサンプル間の発現差の検定結果を一覧表示します。

ファイル名	内容説明
isoform_exp.diff	発現差のある転写産物のFPKM
gene_exp.diff	発現差のある遺伝子のFPKM。gene_idを共有する転写産物毎のFPKMの和から発現差を検定
tss_group_exp.diff	発現差のある一次転写産物のFPKM。tss_idを共有する転写産物毎のFPKMの和から発現差を検定
cds_exp.diff	コードするシーケンスの異なるFPKM。tss_idとは独立にp_idを共有する転写産物毎のFPKMの和から発現差を検定

DIFFファイルは以下のフォーマットです。

カラムの番号	カラムの名前	例	内容説明
1	Tested id	XLOC_000001	検定する転写産物、遺伝子、一次転写産物、CDS、を表すユニークな識別子
2	gene	Lypla1	検定するgene_name(s)またはgene_id(s)
3	locus	chr1:4797771-4835363	検定する遺伝子または転写産物を容易にブラウジングするためのゲノム上の座標
4	sample 1	Liver	検定する最初のサンプルのラベル（またはラベルが提供されていない場合は番号）
5	sample 2	Brain	検定する2番目のサンプルのラベル（またはラベルが提供されていない場合は番号）
6	Test status	NOTEST	以下のうちの一つになります： OK（検定成功） NOTEST（検定用のアライメントが十分ではありません） LOWDATA（複雑すぎるまたは浅いシーケンス） HIDATA（座位にあるフラグメントが過剰です） FAIL、悪条件の共分散行列またはその他の数値的例外が検定を妨げる場合
7	FPKM _x	8.01089	サンプル _x の遺伝子FPKM
8	FPKM _y	8.551545	サンプル _y の遺伝子FPKM
9	log ₂ (FPKM _y /FPKM _x)	0.06531	fold change y/xの（底2）ログ
10	test stat	0.860902	観測されたFPKM発現差の有意性を計算するために使用された検定統計量の値
11	p value	0.389292	検定統計量の未補正p値
12	q value	0.985216	検定統計量のFDR補正したp値
13	significant	なし	多重検定に対するBenjamini-Hochberg補正後、pがFDRより大きいかどうかにより、「yes」または「no」のいずれかになります。

詳しくは、[cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/manual/](https://github.com/cole-trapnell-lab/cufflinks)のCufflinksマニュアルを参照してください。

GTFファイル

遺伝子転写産物フォーマット (Gene Transfer Format, GTF) ファイルは、マージされた転写産物のセットを提供します。各行は、リファレンスアノテーションからの転写産物と今回の転写産物とが重複する性質を説明するアノテーションフィールド (class_code) を含みます。以下の表は、cufflinksマニュアル (cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/manual/) からの抜粋であり、とり得るクラスコードを記述しています。

=	一致
j	新規アイソフォーム
e	リファレンスエクソンおよび少なくとも10 bpのリファレンスイントロンと重複するシングルエクソンの転写産物で、pre-mRNAフラグメントの可能性を示します
i	シングルエクソン転写産物全体がリファレンスイントロンにある
r	リピート。現在のところ、リファレンスシーケンスを見ることで判定されており、少なくとも塩基の50%が小文字である転写産物に適用されます
p	ポリメラーゼ反応が進みすぎたフラグメントの可能性
u	不明。遺伝子間の転写産物
o	不明。リファレンスとの全体的な重複
.	トラッキングファイルのみ。多重分類を示唆します

i, j, u, またはoのクラスコードとアノテーションされた転写産物は、可能性のある新規転写産物を表します。

詳しくは、cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/manual/のCufflinksマニュアルを参照してください。

解析レポート

The Cufflinks Assembly & DE Appは、すべてのサンプルの集計サマリーおよびサンプルペア毎の統計サマリーを提供します。

ペアワイズ発現差解析

Cufflinks Assembly & DE Appは、解析レポートページ上でコントロールおよび比較のサンプルグループの発現差統計を提供します。統計をダウンロードするには、[\[PDF Summary Report\]](#) をクリックしてください。

Overview

表6 Overviewテーブル

統計データ	定義
Control samples (group name)	コントロールグループのRNA-Seq Alignment Appの結果にリンク
Comparison samples (group name)	比較グループのRNA-Seq Alignment Appの結果にリンク
FPKM tables	遺伝子および転写産物のFPKMテーブルにリンク

Assembly

Assemblyテーブルは、RNA-Seq Alignment Appの [Novel Transcript Assembly] オプションを選択した場合、利用することができます。本アプリでは、コントロールグループ、比較グループ、およびコントロールグループと比較グループのマージに関する解析を提供します。内容説明の一部は、cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/cuffcompare/#transfrag-class-codesからの抜粋です。

表7 Assemblyテーブル

統計データ	内容説明
Gene Count	サンプル毎に同定した遺伝子数
Transcript Count	サンプル毎に同定した転写産物数
Link to gene models	遺伝子転送フォーマット (gene transfer format, GTF) ファイルの結果にリンク
Equal (=)	イントロン鎖の完全一致
Potential novel (j)	新規アイソフォーム (フラグメント) の可能性。少なくとも1つのスプライスジャンクションをリファレンス転写産物と共有
Unknown, intergenic (u)	不明。遺伝子間の転写産物
Overlap with opposite-strand exon (x)	エクソンが逆ストランドのリファレンスと重複
Other	その他の転写産物のタイプ

Differential Expression

Differential Expressionテーブルは、パネルを選択した場合、オンターゲット遺伝子のみ示します。

表8 Differential Expressionテーブル

統計データ	定義
Annotation Gene Count	アノテーション中の遺伝子および新規遺伝子の遺伝子数
Assessed Gene Count	検定することができた遺伝子数
Δ Gene Count	有意な発現差がある遺伝子数
Annotation Transcript Count	アノテーション中の転写産物および新規転写産物の転写産物数
Assessed Transcript Count	検定することができた転写産物数
Δ Transcript Count	有意な発現差がある転写産物数
Cuffdiff results	選択したCuffdiff結果にリンク

Differential Expression Heat Map

Differential Expression Heat Mapは、比較可能な多数のサンプルにわたる遺伝子発現レベルを示します。ヒートマップは、パネルを選択した場合、オンターゲット遺伝子のみ示します。

遺伝子系統樹は、遺伝子のクラスタリング結果および2つの遺伝子クラスター間の相関を示します。

発現遺伝子は、異なる色が割り当てられています。

- ▶ 赤：低発現遺伝子
- ▶ 黒：平均的発現遺伝子
- ▶ ネオングリーン：高発現遺伝子

遺伝子を指定するために、[Jump to Gene] のドロップダウンリストを拡張し、遺伝子を選択します。

サンプルを指定するために、[Jump to Sample] のドロップダウンリストを拡張し、サンプルを選択します。

スケーラブルベクターグラフィックス (scalable vector graphics, SVG) としてプロットを保存するには、[Save Plot as SVG] をクリックします。

TeamViewer Sessionとしてプロットのデータを出力するために、[Export Heatmap Data (TVS)] をクリックします。

Gene Browser

Differential Expression Gene Browserは、コントロールサンプルおよび比較サンプルのグループに対する遺伝子のlog₂(FPKM) カウントに関するインタラクティブな散布図を示します。このテーブルは、パネルを選択した場合、オンターゲット遺伝子のみを示します。以下のマトリクスの結果をフィルターすることができます。

表9 Individual Gene Resultsテーブル

統計データ	定義
Test ID	検定された遺伝子を表すユニークな識別子
Gene	遺伝子シンボル
Locus	検定済み遺伝子および転写産物に容易にブラウジングするためのゲノム上の座標
Status	検定のステータス結果は、以下のように設定されています： <ul style="list-style-type: none"> • OK：検定通過 • NOTEST：検定用に十分アライメントされていません • FAIL：悪条件の共分散行列または検定を妨げる他の数値例外があります • HIDATA：多数のフラグメントが座位にあります • LOWDATA：複雑もしくは浅くシーケンスされた領域の検定では、豊富な信頼ある計算でサポートします
log ₂ (control group)	コントロールグループのlog FPKM
log ₂ (comparison group)	比較グループのlog FPKM
log(Ratio)	比較グループおよびコントロールグループのlog fold-change比
q Value	発現差に対して多重検定補正したp値。この値は、有意な発現差をフィルタリングするために使用
Significant	<ul style="list-style-type: none"> • True：q値は偽発見率より小さい • False：q値は偽発見率より大きいまたは等しい 初期設定の偽発見率は0.05

Cufflinksグローバル解析

Cufflinks Assembly & DE Appは、すべてのサンプルの集計サマリーを提供します。統計をダウンロードするには、[PDF Summary Report] をクリックしてください。

Overview

表10 Overviewテーブル

統計データ	定義
Sample group X (e.g. 1, 2, 3...)	グループXのRNA-Seq Alignment Appの結果にリンク
FPKM tables	遺伝子および転写産物のFPKMテーブルにリンク

Summary

表11 Summaryテーブル

統計データ	定義
Sample ID	サンプルID
Read Length	リード長
Number of Reads	パスフィルターしている当該サンプルの総リード数
% Total Aligned	十分なリードを含みリファレンスにアライメントされた、パスフィルターしているリードの割合
% Abundant	ミトコンドリアおよびリボソームシークエンスなどに、アライメントされた転写産物のパスフィルターしているリードの割合
% Unaligned	リファレンスにアライメントしないリードの割合
Median CV Coverage Uniformity	PicardツールのCollectRnaSeqMetricsユーティリティによってレポートされる、最も高発現している転写産物1000のカバレッジの変動係数の中央値。理想値=0
% Stranded	ストランド情報を維持したリードの割合

Assembly

Assemblyテーブルは、RNA-Seq Alignment Appの [Novel Transcript Assembly] オプションを選択した場合、利用することができます。集計したサンプルグループに対するアセンブリ解析を提供します。内容説明の一部は、[cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/cuffcompare/#transfrag-class-codes](https://github.com/cole-trapnell-lab/cufflinks/cuffcompare/#transfrag-class-codes)からの抜粋です。

表12 Assemblyテーブル

統計データ	内容説明
Gene Count	サンプル毎に同定した遺伝子数
Transcript Count	サンプル毎に同定した転写産物数

統計データ	内容説明
Link to gene models	遺伝子転送フォーマット (gene transfer format, GTF) ファイルの結果にリンク
Equal (=)	イントロン鎖の完全一致
Potential novel (j)	新規アイソフォーム (フラグメント) の可能性。少なくとも1つのスプライスジャンクションをリファレンス転写産物と共有
Unknown, intergenic (u)	不明。遺伝子間の転写産物
Overlap with opposite-strand exon (x)	エクソンが逆ストランドのリファレンスと重複
Other	その他の転写産物のタイプ

Summary Plots

- ▶ スケーラブルベクターグラフィックス (scalable vector graphics, SVG) としてプロットを保存するには、**[Save Plot as SVG]** をクリックします。
- ▶ カンマ区切り値形式 (CSV) としてプロットからのデータをエクスポートするには、**[Export Data as CSV]** をクリックします。

表13 Summary Plotsテーブル

プロット名	内容説明
Sample Correlation	<p>サンプル相関行列はサンプルの類似性を示しており、これは発現レベルの相関性に基づいています。相関性に基づいた階層的クラスタリングが実行されます。</p> <p>相関レベルは+1および-1の範囲で表されます。</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1：すべて正の相関 • 0：相関なし • -1：負の相関 <p>相関ポイントは異なる色を表します。</p> <ul style="list-style-type: none"> • 白：-1 • 緑：-0.33 • 黄：0.33 • 赤：1 <p>隣接する2ポイント間の色は補間されます；黄緑は0ポイントを表します。</p>
PCA	<p>主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) の2次元散佈図および3次元プロットは、最大の分散を得る2つおよび3つの成分に沿ってサンプルを示します。</p> <p>主成分が少なくとも3つある場合、3次元プロットが作成されます。3次元プロットは回転および拡大、縮小することができます。ポータブルネットワークグラフィックス (portable network graphics, PNG) としてプロットを保存することができます。</p>

改訂履歴

文書	日付	変更内容
文書番号： 1000000006108 v00	2016年 2月	Cufflinks Assembly & DEをサポート、パラ メーター設定更新、解析更新

テクニカルサポート

テクニカルサポートについては、イルミナテクニカルサポートにお問い合わせください。

表14 イルミナ一般問合せ先

ウェブサイト	jp.illumina.com
電子メール	techsupport@illumina.com

表15 イルミナカスタマーサポート電話番号

地域	電話番号	地域	電話番号
北米	1.800.809.4566	台湾	00806651752
日本	0800.111.5011	中国	400.635.9898
アイルランド	1.800.812949	デンマーク	80882346
イタリア	800.874909	ドイツ	0800.180.8994
英国	0800.917.0041	ニュージーランド	0800.451.650
オーストラリア	1.800.775.688	ノルウェー	800.16836
オーストリア	0800.296575	フィンランド	0800.918363
オランダ	0800.0223859	フランス	0800.911850
シンガポール	1.800.579.2745	ベルギー	0800.81102
スイス	0800.563118	香港	800960230
スウェーデン	020790181	その他の国	+44.1799.534000
スペイン	900.812168		

製品安全データシート (SDS) : イルミナのウェブサイト support.illumina.com/sds.html から入手できます。

製品関連文書 : イルミナのウェブサイトからPDF形式でダウンロードできます。
support.illumina.com にアクセスして製品を選び、**[Documentation & Literature]** を選択します。



イルミナ株式会社
東京都港区芝5-36-7
三田ベルジュビル22階
サポート専用フリーダイヤル
0800-111-5011
techsupport@illumina.com
jp.illumina.com