

Microarray Data Analysis Tool

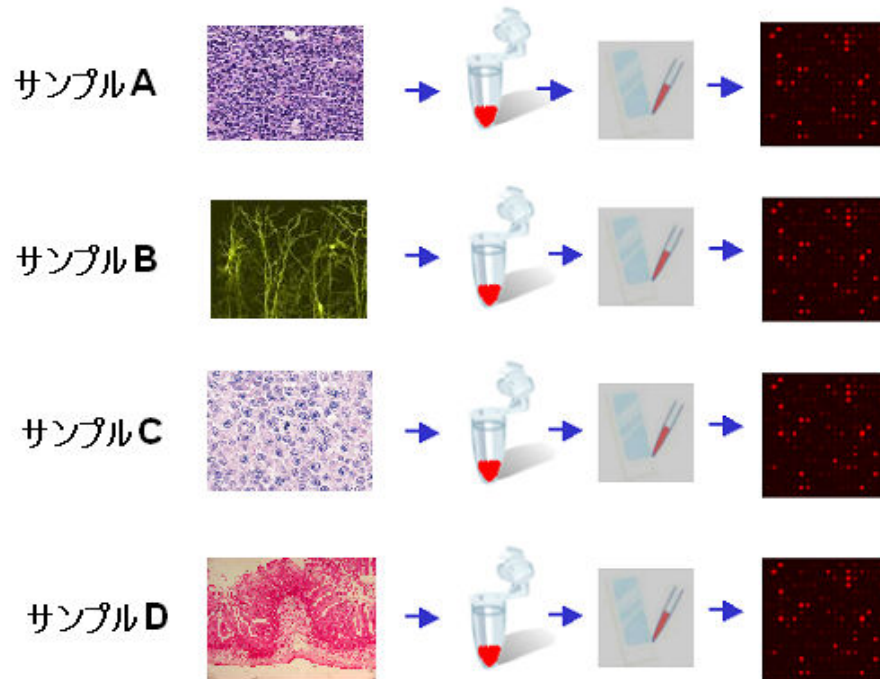
Signal比較解析の進め方

複数比較解析に引き続き、Signal比較解析についてのソフトウェアの使用方法を、実際の解析例と合わせて説明します。

解析テーマは

「4種類のヒト細胞株における、遺伝子発現プロファイルの探索」です。

ヒト細胞を用いた単色実験の解析例を紹介します。まず、4種類のヒト細胞について、マイクロアレイの単色実験を行い、それぞれの遺伝子発現データを得ます。このデータを用いて、本ソフトウェアでデータの正規化や比較計算を行うことで、4種類のサンプルに対して任意の組み合わせで、データの比較・検索を行うことができます。



上記のテーマについて解析を行うには、本ソフトウェアを用いて下記のような処理を行う必要があります。

- ①全実験データの正規化(ノーマライズ)
- ②任意の組み合わせでの、サンプルの比較データの計算
- ③指定条件でのデータ検索による、遺伝子の抽出

Signal比較解析では、様々な条件で得たマイクロアレイ実験の生データを読み込むため、それらのデータを同じ条件で比較できるように、まず最初に正規化を行います。そして正規化を行ったデータに対して、2サンプルごとの発現比(Ratio)の計算を行います。この発現比計算では、自分で比較したい組み合わせを自由に指定することができます。最後にこれらの計算したデータに基づいて遺伝子の検索を行うことで、特定のサンプルで変動している遺伝子の抽出を行うことができます。

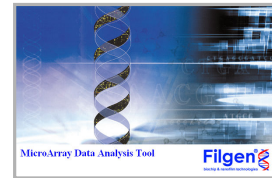
1. ソフトウェアの起動と実験データの読み込み

1-1. ソフトウェアの準備

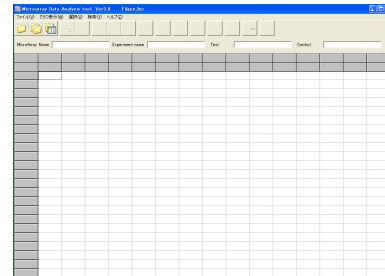
CDに入っている「Microarray Data Analysis Tool」のフォルダを、自分のコンピュータにコピーしてください。

1-2. ソフトウェアの起動


コピーしたフォルダを開き、「MAtool.exe」のアイコンをダブルクリックしてください。右図のタイトル画面が表示され、ソフトウェアが起動します。

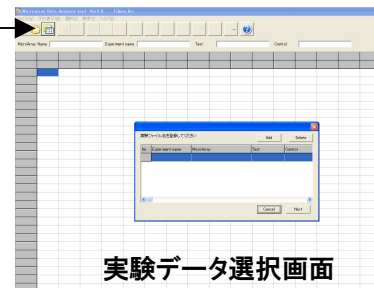


ソフトウェアが起動後は右図のメイン画面が表示されます。

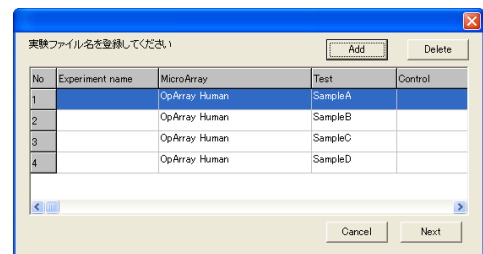


1-3. 実験データ読み込み

 アイコンをクリックすると、右の画面が表示されます。「Add」ボタンをクリックし、対象となる実験データの選択・読み込みを行います。なおSignal比較解析用の実験データファイルは、1サンプル分の実験データしかもっていません。そのためファイル名も「Sample1 vs Sample2」ではなく、「Sample1」、「Sample2」のように1サンプルずつに分かれており、サンプル名の後ろに「Signal比較解析用」と入力されています。



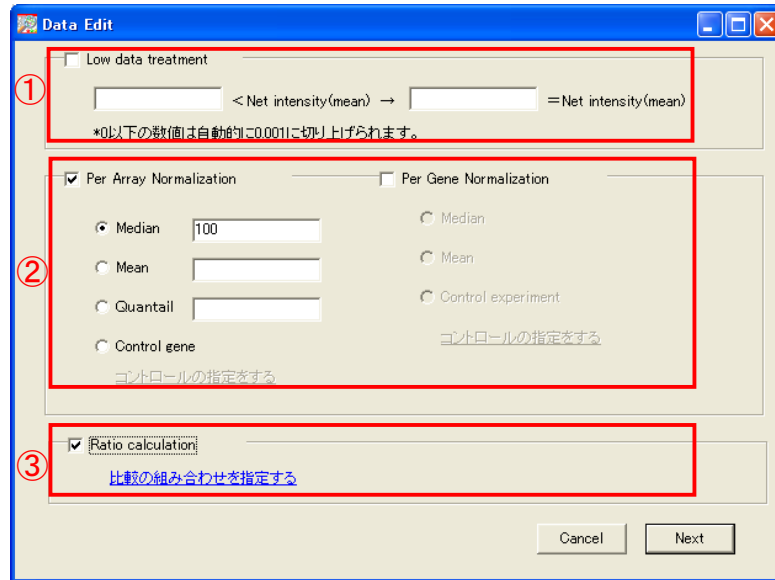
実験データを読み込むと、右図のように選択したファイルの使用マイクロアレイ名、サンプル名等が表示されます。ここでは、「SampleA～D」の4つの実験データを読み込みます。表示の確認が終わったら、「Next」ボタンをクリックして次へ進みます。



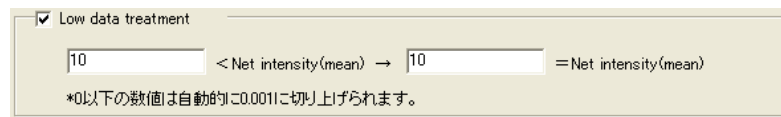
2. 実験データの正規化と比較データの作成

2-1. 正規化と比較の組み合わせの指定

「Next」ボタンをクリックすると、「Data Edit」(下図)の画面が現れます。この画面では正規化の手法や、比較の組み合わせの選択を行います。



①の項目では、弱いシグナル強度のスポットに対して、一定の値に数値を引き上げる処理の設定を行います。例えば、



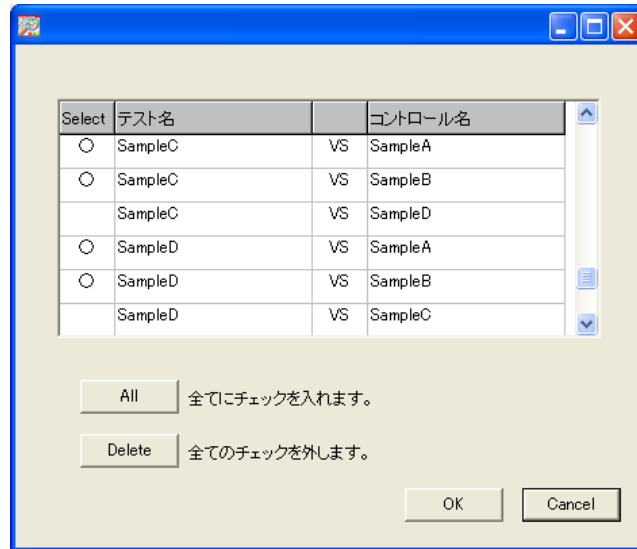
のように設定しますと、正規化前のシグナル強度が「10」未満のスポットは、全て「10」に変換されます。ただし、何も設定を行わなかった場合でも、シグナル強度が「0」以下のスポットは、自動的に「0.001」に変換されます。本解析では、この項目は設定なしとして話を進めていきます。

次に②の項目で正規化の設定を行います。正規化には「Per Array Normalization」と「Per Gene Normalization」の2種類がありますが、本解析ではPer Array Normalizationのみ設定を行います。

この正規化では選択できる手法が4種類ありますが、弊社マイクロアレイ受託解析サービスでは、多くの場合「Median」、または「Quantile」で補正を行っています。Medianは読み込んだ全マイクロアレイデータの中央値を、一定の値に揃えることで正規化を行います。単色のマイクロアレイデータの補正に最もよく使用されているのですが、実験日や実験環境の違いによってマイクロアレイ間に偏りができる場合があります。Quantileはそのような偏りを補正することができますが、発現プロファイルが極端に違うデータ同士に対して使用すると、それらの有意な違いも補正してしまうことがあります。よって最初はMedianで補正を行い、Scatter Plotでマイクロアレイ間の偏りを確認し、偏りがあった場合のみQuantileで補正し直すのがよいでしょう。

本解析ではMedianを選択し、数値入力欄に「100」と入力します。この設定で、全マイクロアレイの中央値を100に揃えることができます。

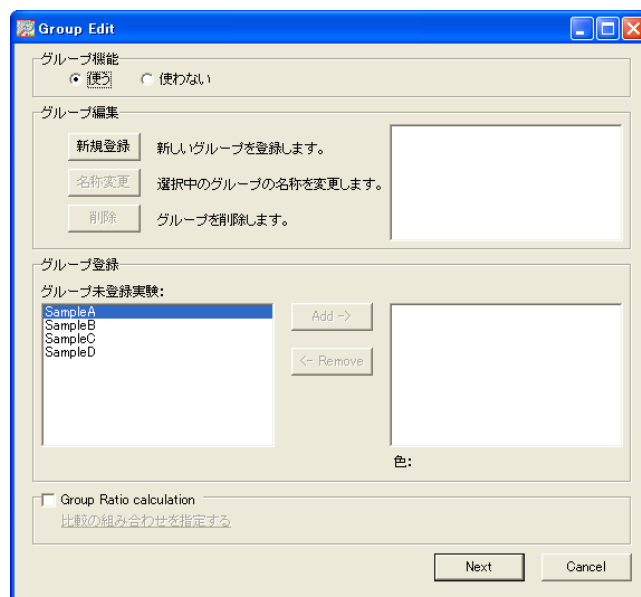
最後に③の項目で、比較するサンプルの組み合わせを指定します。チェックボックスにチェックを入れた後、「比較の組み合わせを指定する」という青色の文章をクリックすると下のような画面が表示されます。



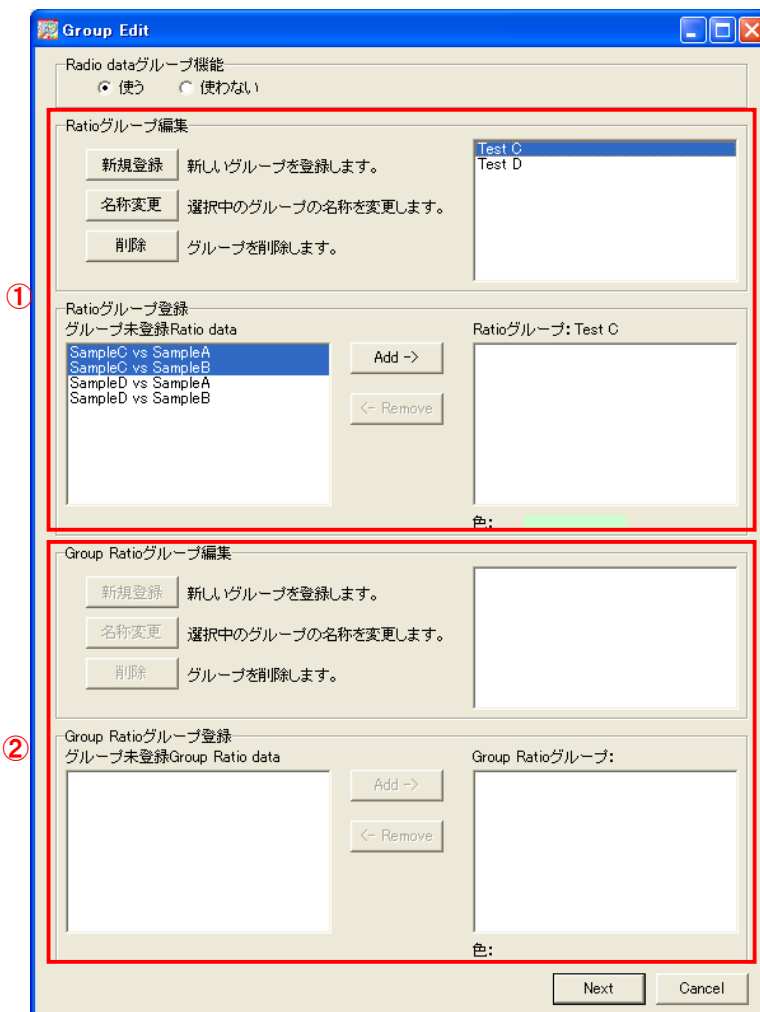
この画面では読み込んだ全てのサンプルデータの組み合わせ(テスト、コントロールの入れ替え含む)が表示されます。各組み合わせの「Select」列をダブルクリックすると、「○」が入力されるので、このようにして比較したい組み合わせを選択してください。なお、本解析では「SampleA」、「SampleB」をコントロールとし、「SampleC」、「SampleD」それぞれに対する発現比を計算したいので、選択する組み合わせは上図のようになります。選択終了後、「OK」ボタンをクリックするとData Editの画面に戻るので、「Next」ボタンをクリックして先に進んでください。

2-2. 様々なデータのグループ化

Data Edit画面から進むと、「Group Edit」画面が現れます。ここで実験データをグループ分けすることで、グループ単位の検索が可能になります。ただし本解析では、4種類の異なる細胞株をサンプルに使用していますので、いずれも同一グループにまとめることができません。そのため、本解析では何も設定せず、「Next」ボタンをクリックし次に進みます。



Group Editから進むと、2つ目のGroup Edit画面が現れます。前の画面では、実験データのグループ化を行ったのに対し、この画面ではRatioデータ(Data Editで指定した比較の組み合わせや、前のGroup Editで計算したGroup Ratio)のグループ化を行います。



①の領域では、Data Editで指定した組み合わせのRatioデータのグループ化を行います。「グループ未登録Ratio data」の欄に、Data Editで指定した発現比計算を行う組み合わせが表示されるので、必要に合わせてグループ分けを行ってください。本解析では、計算した4つの組み合わせを、テストサンプルを基準にして2つのグループに分けます。すなわち

TestC グループ — SampleC vs SampleA
 SampleC vs SampleB

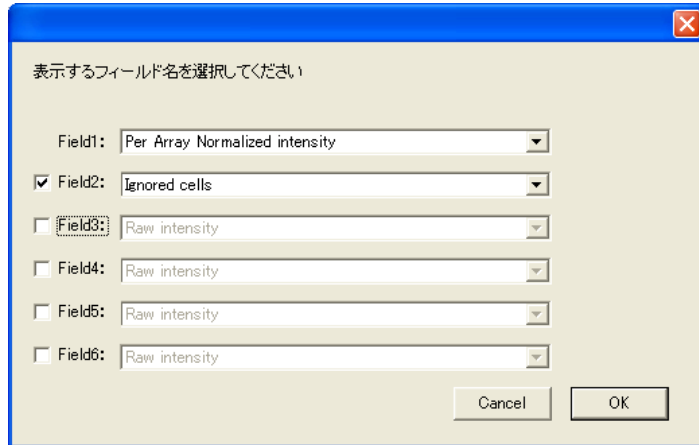
TestD グループ — SampleD vs SampleA
 SampleD vs SampleB

のように、SampleC基準のグループとSampleD基準のグループに分けます。

②の領域では、1つ目のGroup Editで指定した、**実験データグループ全体の発現比のグループ分け**を行います。ただし本解析では、実験データのグループ分けを行っておらず、グループ間発現比の計算を指定していませんので、「グループ未登録Group Ratio data」の欄は空白になっています。よって、今回は①のみ設定を行い、「Next」ボタンをクリックして次に進みます。

2つ目のGroup Editから進むと、表示するフィールドの選択画面が現れます。最大6項目まで選択でき、ここで選択された項目のみがメイン画面に表示されます。選択できる項目は以下のとおりです。

- | | |
|---------------------------------|--|
| Raw intensity: | スポットの蛍光強度 |
| Background: | スポット周囲の蛍光強度 |
| Net intensity: | Raw intensity – Background |
| Per Array Normalized intensity: | Per Array Normalization後のNet intensity |
| Per Gene Normalized intensity: | Per Gene Normalization後のNet intensity |
| Ignored cells: | 0: 解析対象スポット、1: 解析除外スポット |



本解析ではPer Gene Normalizationを行っていないので、正規化後のデータである「Per Array Normalized intensity」と、解析に使用できるスポットかどうかを判断する「Ignored cells」の2つを選択し、「OK」ボタンをクリックします。


実験データ
Ratioデータ

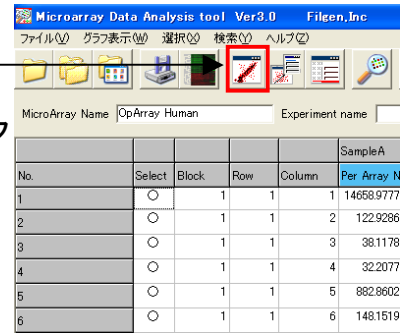
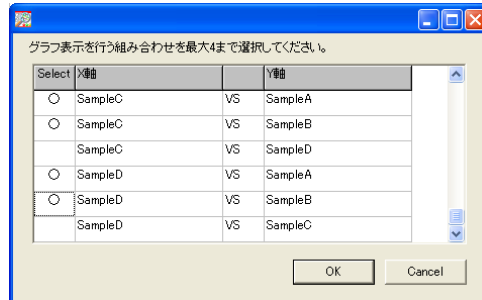
No.	Select	Block	Row	Column	SampleA Per Array No Ignored cells	SampleB Per Array No Ignored cells	SampleC Per Array No Ignored cells	SampleD Per Array No Ignored cells	SampleC vs SampleD ratio	SampleC vs SampleD ratio	SampleC vs SampleD ratio	SampleC vs SampleD ratio					
1	○	1	1	1	1462897774	0	176263668	0	262616989	0	120548	0.0591	0.09195	-0.01166	1.38447		
2	○	1	1	2	122292984	0	126203916	0	9940678	0	0.58739	-0.7676	0.99395	-0.83306	0.89808		
3	○	1	1	3	3811785	0	6521931	0	652706	0	44.09654	0	1.71255	0.77614	1.1822	0.24147	1.19565
4	○	1	1	4	3220771	0	393482	0	2471897	0	32.21847	0	0.76742	-0.88191	0.62816	-0.67708	1.00333
5	○	1	1	5	882280205	0	10326949	0	6953988	0	73271805	0	0.78834	-0.94312	0.67317	-0.57306	0.82394
6	○	1	1	6	148151196	0	10830171	0	6848959	0	148368561	0	0.9599	-0.82139	0.52791	-0.22272	0.96952
7	○	1	1	7	68899178	0	71046165	0	5847492	0	37244918	0	0.65225	-0.65599	0.45485	-1.20388	0.66836
8	○	1	1	8	5224678	0	7144232	0	3814823	0	4622819	0	0.55235	-0.60008	0.42188	-1.2611	0.81824
9	○	1	1	9	1798891	0	235148	0	2120178	0	2614277	0	1.11973	0.04789	0.1753	-0.26718	1.49308
10	○	1	1	10	6591415	0	1030823	0	5852298	0	6144607	0	0.67936	-0.59627	0.65854	-0.84028	0.71756
11	○	1	1	11	2102042	0	2102042	0	1165954	0	1790976	0	0.40930	-1.20009	0.25502	-0.30919	0.62736
12	○	1	1	12	3042124	0	4107965	0	2443498	0	2157360	0	0.86954	-0.00318	0.44207	-0.695	0.86937
13	○	1	1	13	5358395	0	541978	0	3510101	0	4397029	0	0.65414	-0.61233	0.47766	-0.2587	0.81747
14	○	1	1	14	1595596	0	20715714	0	17553179	0	11391143	0	0.87963	-0.16687	0.24637	-0.24654	0.59128
15	○	1	1	15	28962804	0	25327885	0	17924400	0	290335021	0	0.61973	-0.66283	0.10789	-0.4698	1.01238
16	○	1	1	16	5826785	0	9303844	0	3333172	0	4148353	0	0.56687	-0.61891	0.62743	-0.35331	0.73192
17	○	1	1	17	951627884	0	64840461	0	377170347	0	230320466	0	0.69314	-0.54846	0.69794	-0.91882	0.63749
18	○	1	1	18	21489072	0	19170883	0	10668852	0	3722421	0	0.49377	-1.0181	0.69916	-0.93889	0.42143
19	○	1	1	19	10854301	0	845078	0	4215094	0	3038911	0	0.89526	-0.77787	0.70497	-0.44484	0.78997
20	○	1	1	20	28843163	0	27327362	0	17698797	0	19022298	0	0.61385	-0.70451	0.64207	-0.63279	0.69002
21	○	1	1	21	67621385	0	68970237	0	31425891	0	36776898	0	0.4647	-1.10562	0.48562	-1.13411	0.4247
22	○	1	1	22	30898239	0	2496668	0	14950118	0	9139052	0	0.86938	-1.04728	0.60052	-0.25875	0.29399
23	○	1	1	23	2459412	0	28538088	0	15328279	0	19248279	0	0.47229	-1.02225	0.5991	-0.39913	0.56908
24	○	1	1	24	5490377	0	4926399	0	3748919	0	4047901	0	0.68994	-0.54907	0.75437	-0.69665	0.73966
25	○	1	1	25	15708235	0	12652889	0	9934945	0	11239269	0	0.62346	-0.66095	0.71189	-0.69008	0.71090
26	○	1	1	26	93619566	0	30251117	0	62778842	0	59656857	0	0.56770	-0.61673	0.78115	-0.41282	0.63990
27	○	1	1	27	227259145	0	1548274	0	101381989	0	14345131	0	0.44612	-1.16449	0.6548	-0.91087	0.63125
28	○	1	2	1	2152931	0	2959067	0	1727671	0	2351296	0	0.80259	-0.91727	0.57607	-0.79668	1.08225
29	○	1	2	2	3878134	0	5462104	0	2843975	0	3702229	0	0.73396	-0.44685	0.52048	-0.94338	0.95541
30	○	1	2	3	20949218	0	2916794	0	11513214	0	18348529	0	0.54896	-0.88602	0.48896	-1.29001	0.81794
31	○	1	2	4	36352931	0	38857435	0	17478944	0	22133991	0	0.48973	-1.05669	0.44903	-1.18918	0.68988
32	○	1	2	5	6343796	0	7416887	0	3878814	0	607289	0	0.7288	-0.46235	0.623	-0.82611	0.94444

するとメイン画面に、選択したフィールドのデータがサンプルごとに表示されます。またRatioデータは、指定した組み合わせのデータが、右側にまとめて表示されます。


3. スキャタープロットの作成

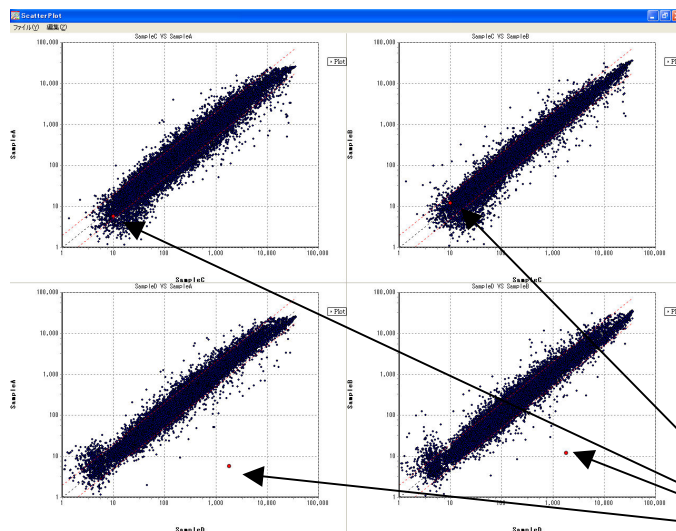
3-1. 表示する組み合わせの選択

メイン画面のScatterPlot表示アイコンをクリックしてください。



すると上図のように、サンプルデータの組み合わせ一覧が表示されます。ここでグラフを作成したい組み合わせを、最大4つまで指定してください。「OK」ボタンをクリックすると、グラフが表示されます。なお、ここでプロットされるデータは、メイン画面上の表示の有無に関わらず、Per Array Normalized intensityの値が用いられます。

Scatter Plotの各プロットをクリックすると、選択されたプロットが赤いプロットに変わります。そして、メイン画面上の対応する遺伝子(行)が青色で選択され、行の先頭にスクロール表示されます。また、1つのグラフのプロットをクリックすると、他のグラフの対応するプロットも赤くなります。さらに、メイン画面のPlot windowアイコンをクリックすると、Scatter Plot中の各プロット個別のデータを表示するPlot window画面が現れます。



Parameter	Value
Experiment name	SampleD vs SampleB
No.	16561
Block	22
Row	5
Column	10
Raw intensity SampleD	3814.03125
Raw intensity SampleB	1092.102679
Background SampleD	54549451
Background SampleB	1041.925972
Net intensity SampleD	3759.66137
解析対象:0	0
oligo_id	H200010784
Ensembl Gene ID	ENS00000136457
Ensembl Transcript ID	ENS00000258969
oligo_exon_or_transcript	E
oligo_type	I
gene_symbol	CHAD

Plot window画面

同スポット


上記までのステップで、お好みの組み合わせでグラフを作成し、サンプル間の遺伝子発現の全体像を見ることができました。


スキャタープロットが中心ライン付近に収束していれば、比較サンプル間の発現差は小さいと解釈が出来ます。ばらつきの幅が広ければサンプル間における発現差が大きいと解釈できます。

次は、変動遺伝子の抽出となります。

4. 発現変動遺伝子の抽出

4-1. Filter Options検索画面の表示

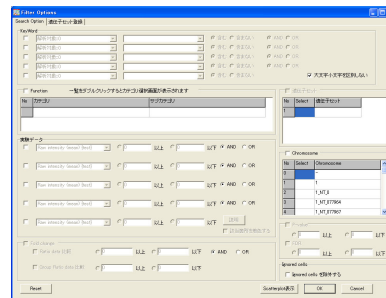
メイン画面のFilter Optionsアイコンをクリックし、Filter Options検索画面を開きます。



No.	Select	Block	Row	Column	SampleA
1	<input type="radio"/>	1	1	1	14658.9777
2	<input type="radio"/>	1	1	2	122.9286
3	<input type="radio"/>	1	1	3	38.1178
4	<input type="radio"/>	1	1	4	32.2077
5	<input type="radio"/>	1	1	5	882.8602
6	<input type="radio"/>	1	1	6	148.1519

Filter Options検索画面では各種検索条件でデータの抽出を行うことができます。

keyword
機能カテゴリー
実験データ
染色体番号
遺伝子セット



4-2. 検索条件を設定

ここでは下記を目的を達するための条件設定を行います。

- ①コントロール遺伝子などを除去し、解析対象遺伝子のみにする。
- ②スポット上にごみ等があり、シグナルに影響するデータを除外する。
- ③発現差のあるデータを抽出する。
- ④ノイズレベルの信頼性の低いデータを除外する。

条件設定の方法

①コントロール遺伝子などを除去し、解析対象遺伝子のみにする。

ここでは、keyword検索を使用します。事前にアレイに搭載されているプローブは「0、2、3」という数字で識別をしています。

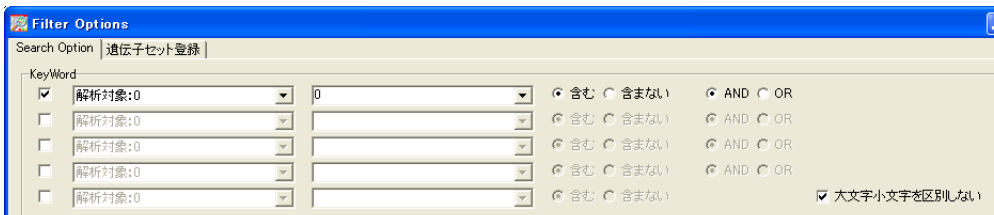
「0」は解析対象遺伝子

「2」は解析対象外遺伝子(Negative Control, Blank, QCコントロールなど)

「3」はデータベースの更新により対応プローブの情報が削除された遺伝子

***アレイの種類により解析対象の条件設定が必要ない場合もあります。**

まずは、左のチェックボックスをクリックし、該当項目で「解析対象:0」と、「0」を選択してください。これで、解析対象遺伝子のみを抽出する条件設定ができました。

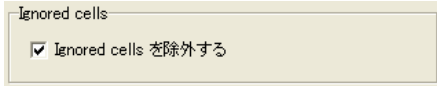


②スポット上にごみ等があり、シグナルに影響するデータを除外する。

ここでは、Ignore cellの設定を使用します。

事前にアレイに搭載されているデータの中でごみなどの影響を受け、正確なシグナルを算出できていない

可能性があるデータはメイン画面で表示されているIgnored cellsの項目が「1」になっています。上図、チェックボックスをクリックすることで、Ignored cellsを除外することが出来ます。

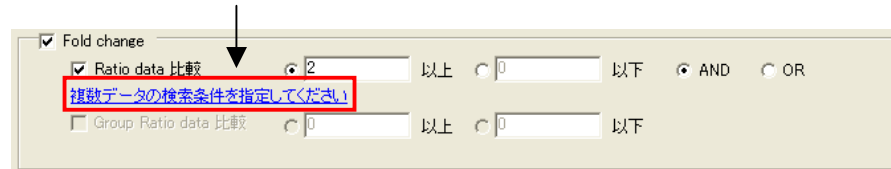


③発現差のあるデータを抽出する。

4ページで指定したサンプルごとの発現比の検索には、「Fold change」検索を使用します。「Ratio data 比較」ではサンプル間の発現比、「Group Ratio data 比較」では実験グループ間の発現比の検索条件の指定を行います。本解析ではグループ間発現比の計算を行っていませんので、「Group Ratio data 比較」の項目は指定できないようになっています。

左のチェックボックスをクリックし、検索条件を入力します。(下図は「Ratio data 比較」を2以上にした例です。)

続いて、「複数データの検索条件を指定してください」の項目をクリックします。

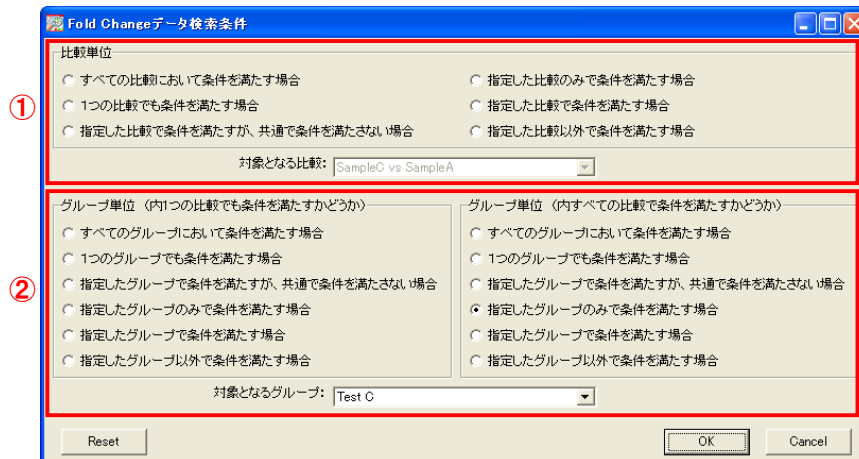


「Fold Changeデータ検索条件」画面が開き、指定した検索条件に対して、どのRatioデータを対象として実行するか選択することができます。

Ratioデータは、①:比較(1組の発現比)単位、②:グループ(5ページで指定した、発現比データを格納したグループ)単位で行うことができ、それぞれ下図の同一番号の領域で、条件を指定します。

例えば、①の領域で「指定した比較で条件を満たす場合」にチェックを入れ、「対象となる比較」に「SampleC vs SampleA」を選択した場合、SampleCのSampleAに対する発現比が2以上の遺伝子が検索されます。

また②の右側の領域で、「指定したグループのみで条件を満たす場合」にチェックを入れ、「対象となるグループ」に「Test C」を選択した場合、Test Cグループに格納されている全てのRatioデータ(本解析ではSampleC vs SampleAとSampleC vs SampleB)の発現比が2以上であり、さらにその他のグループに格納されているRatioデータの発現比が2未満の遺伝子が検索されます。本解析では、このグループ検索を用いた検索条件の設定(下図)を使用します。




④ノイズレベルの信頼性の低いデータを除外する。

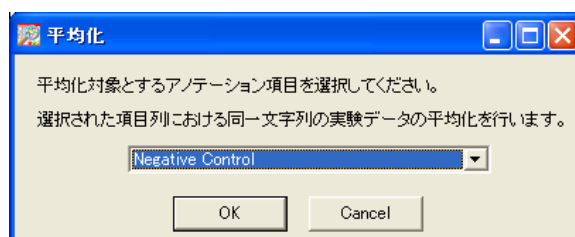
ここでは複数比較解析の場合と同様、実験データ検索を使用します。Signal比較解析の場合、各サンプルデータごとに共通のCutoff値を設定することが多いです。

まず、共通のCutoffの値を決めます。この処理は、データ検索時の検索条件の設定で必要になってくるので、一番最初に行う必要があります。共通のCutoffには、①小さめの値(各サンプルネガティブコントロールの最小値)を用いて、全ての実験データが条件を満たす遺伝子を抽出する場合、②大きめの値(ネガティブコントロール値の2倍)を用いて、実験データのうち1つでも条件を満たす遺伝子を抽出する場合の2種類があります。(共通のCutoffの値は便宜、検索結果と照らし合わせて最終的に決めてください。)


まず各サンプルデータごとの、ネガティブコントロールの値を求めます。Signal比較解析では、解析を行うごとに正規化の手法やパラメータが違うことがあるので、ネガティブコントロールの値も毎回違います。そのため解析を行うごとに、自分で計算を行わなければいけません。以下にその手順を示します。

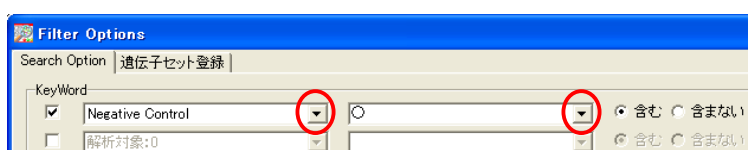
まず平均化処理を行い、データ内のネガティブコントロールスポット蛍光強度の平均値を求めます。

この処理を行うには、メイン画面上の平均化アイコンをクリックし、平均化対象アノテーション項目に、「Negative Control」を選択してください(下図)。この状態で「OK」ボタンをクリックすると、計算が開始され、処理が終了するとメイン画面が表示されます。



次にメイン画面のデータの中から、平均化を行ったネガティブコントロールのデータを抽出します。

メイン画面上のFilter Optionsアイコンをクリックし、Key Word検索で左側の入力欄には「Negative Control」、右側の入力欄には「○」を指定します。指定を行うには、▼(下図)の部分をクリックし、表示される項目の中から目的の項目名をクリックしてください。項目の指定が終わったら、「OK」ボタンをクリックし、抽出を実行します。



それぞれのサンプルデータについて、ネガティブコントロールの値が表示されます。通常CutOffは、正規化を行った後のデータに対して行うことが多いので、基準とするネガティブコントロール値も、各サンプルのPer Array Normalized intensityの値を用います(下図)。また本解析では、4サンプルのデータがあるので、この中から最も小さい値をCutOffに使用します。

	SampleA	SampleA	SampleB	SampleB	SampleC	SampleC	SampleD	SampleD			Flag	
No.	Per Array Normalized intensity	Ignored cells	Per Array Normalized intensity	Ignored cells	Per Array Normalized intensity	Ignored cells	Per Array Normalized intensity	Ignored cells	P-value	FDR	解析対象:0	Negative Control
90	57.64255	0	53.66399	0	61.42175	0	63.8642	0	1	1	2	○
Mean value	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Standard deviation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

最後に、前ページで計算したネガティブコントロールの値を、CutOff値として設定を行います。

Filter Optionsの「実験データ」項目で、左のチェックボックスをクリックし、項目「Per Array Normalized intensity」でCutoff値を入力し、かつ複数データの検索条件の選択において、①の例では「すべての実験において条件を満たす場合」、②では「1つの実験でも条件を満たす場合」を選択します。

下図は、①の条件設定を行ったノイズ除去の設定例です。

前ページの例では、Per Array Normalized intensityにおける4サンプルでの最小値が「54」だったので、このように設定を行いました。

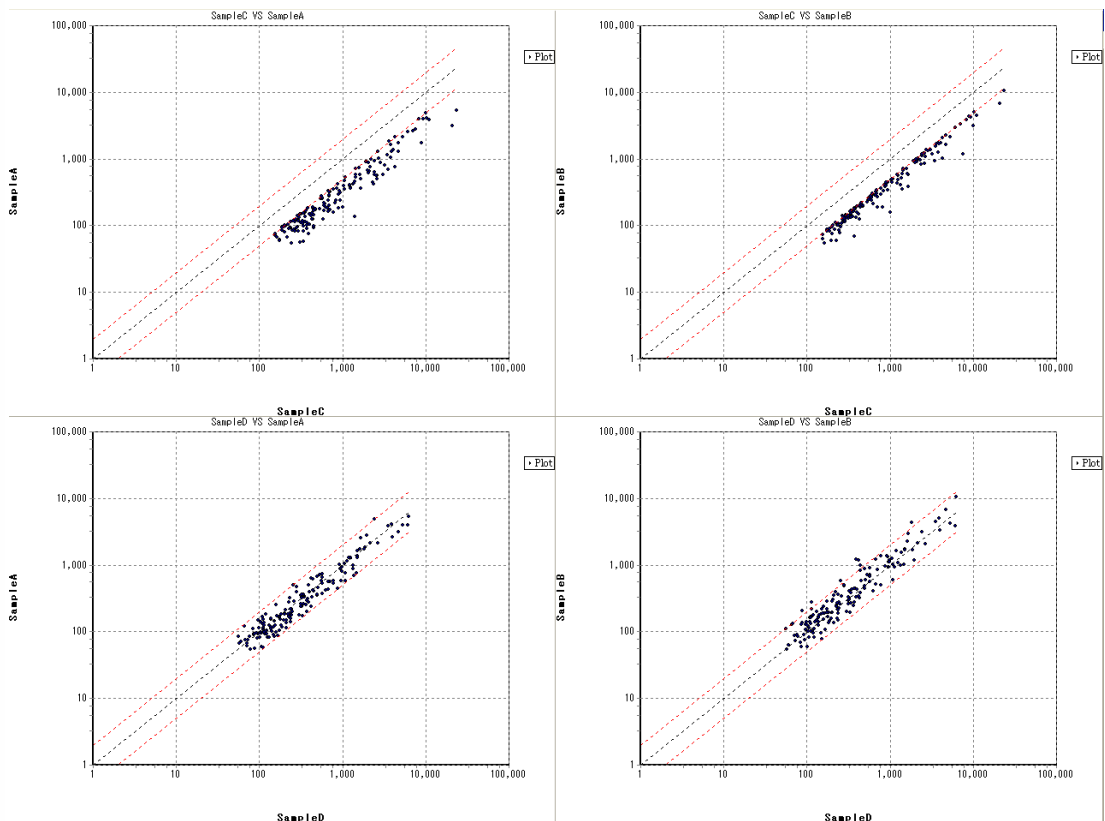
以上が検索条件の設定例です。ただし、「④ノイズレベルの信頼性の低いデータを除外する」は、ネガティブコントロール値の計算があるので、一番最初に行ってください。よって、変動遺伝子抽出の検索条件の設定を行う時は、④→①→②→③の順番に設定を行います。最後にFilter Options検索画面右下の「OK」ボタンを押すとデータの抽出が実行され、下図のようにメイン画面にデータが表示されます。

No.	Select	Block	Row	Column	SampleA Per Array No. Ignored cells	SampleB Per Array No. Ignored cells	SampleC Per Array No. Ignored cells	SampleD Per Array No. Ignored cells	SampleC vs ratio	SampleC vs ratio	SampleC vs ratio	SampleD vs ratio
2774	<input checked="" type="radio"/>	4	15	20	415.65802	0	1074.11155	0	3.22648	1.68996	3.33866	1.73927
2969	<input checked="" type="radio"/>	4	23	26	532.97477	0	1074.16024	0	2.01541	1.01107	2.15232	1.10589
4567	<input checked="" type="radio"/>	6	25	24	970.52034	0	978.76526	0	2.34185	1.22785	2.08285	1.05856
13164	<input checked="" type="radio"/>	17	24	15	1819.43652	0	1660.265	0	2.00691	1.00498	2.19932	1.13706
14359	<input checked="" type="radio"/>	19	10	22	261.70015	0	257.75392	0	2.11809	1.08276	2.15051	1.10468
14370	<input checked="" type="radio"/>	19	11	6	356.71133	0	385.12773	0	3.07165	2.02878	4.28174	2.0982
14485	<input checked="" type="radio"/>	19	15	13	2567.6459	0	2937.14362	0	2.37032	1.24508	2.07213	1.05112
14512	<input checked="" type="radio"/>	19	16	13	3942.63005	0	3865.21501	0	2.10755	1.07557	2.15534	1.10792
14889	<input checked="" type="radio"/>	20	1	12	280.0502	0	328.48833	0	2.45025	1.29293	2.08894	1.06277
14944	<input checked="" type="radio"/>	20	3	13	993.17987	0	977.1761	0	2.23736	1.16179	2.274	1.18523
15140	<input checked="" type="radio"/>	20	10	20	745.64282	0	707.94895	0	2.11534	1.08089	2.22797	1.15573
17230	<input checked="" type="radio"/>	23	1	4	355.6707	0	446.12753	0	2.96978	1.58004	2.38357	1.25312
17586	<input checked="" type="radio"/>	23	14	9	3986.44799	0	4153.82815	0	2.36099	1.23939	2.26685	1.18005
17603	<input checked="" type="radio"/>	23	14	26	751.61569	0	1031.79972	0	5.754	2.52457	4.19151	2.06747
18029	<input checked="" type="radio"/>	24	1	20	346.59939	0	289.92594	0	2.23199	1.15927	2.66817	1.41595
18109	<input checked="" type="radio"/>	24	4	19	250.33591	0	241.24057	0	2.20343	1.13975	2.2895	1.19314
18204	<input checked="" type="radio"/>	24	11	15	2807.25208	0	1185.42112	0	2.72178	1.44455	6.44557	2.68831
18326	<input checked="" type="radio"/>	24	12	20	504.15942	0	576.78502	0	3.31001	1.72684	2.89323	1.53268
18435	<input checked="" type="radio"/>	24	16	21	573.00012	0	683.33416	0	2.50436	1.32444	2.1	1.07039
18571	<input checked="" type="radio"/>	25	3	25	4878.46208	0	3118.82501	0	2.03727	1.02664	3.1867	1.67206
20231	<input checked="" type="radio"/>	26	25	8	584.07083	0	601.30131	0	2.77156	1.4707	2.69214	1.42875
20737	<input checked="" type="radio"/>	27	15	1	568.04479	0	856.15858	0	4.61982	2.20784	3.06516	1.61596
20941	<input checked="" type="radio"/>	27	22	16	309.62087	0	447.31344	0	3.0542	1.6108	2.11406	1.08001
20951	<input checked="" type="radio"/>	27	22	26	2118.428	0	2101.47779	0	2.03968	1.02835	2.05614	1.03994
20956	<input checked="" type="radio"/>	27	23	4	2629.67461	0	3283.2247	0	2.69889	1.43237	2.16166	1.11214
21151	<input checked="" type="radio"/>	28	1	10	1300.95172	0	1071.26102	0	2.05505	1.03917	2.49567	1.31943
21315	<input checked="" type="radio"/>	28	7	12	1634.84572	0	1720.23509	0	2.33897	1.22402	2.22002	1.15057
21348	<input checked="" type="radio"/>	28	8	18	915.256	0	934.2071	0	2.07339	1.05199	2.03135	1.02244
21548	<input checked="" type="radio"/>	28	16	2	431.39725	0	509.34507	0	3.14786	1.65437	2.66612	1.41474
21594	<input checked="" type="radio"/>	28	17	21	255.60038	0	246.68154	0	2.22171	1.15167	2.30204	1.20291
21793	<input checked="" type="radio"/>	28	25	4	333.10626	0	324.56057	0	2.01548	1.01112	2.06855	1.04862
01000	<input checked="" type="radio"/>	28	25	11	257.67056	0	255.18069	0	2.22031	1.15076	2.15743	1.10932

本解析では、遺伝子の抽出に以下のような条件を設定しました。

実験データ: Per Array Normalized intensityが、全ての実験で54以上の発現を示す
Ratioデータ: SampleC vs SampleAとSampleC vs SampleBでは発現比が2倍以上
かつ、SampleD vs SampleAとSampleD vs SampleBでは2倍以下

この結果、163個の遺伝子が抽出されました。
また、この163個に対してScatter Plotを作成すると下図のようになります。



SampleAとSampleBに対して、SampleCでは全て発現比が2倍以上(上段2つ)、またSampleDでは全て2倍以下(下段2つ)になっていることを、視覚的に表現できました。

結論として、この163遺伝子はサンプルCの細胞で、特に高発現している遺伝子だといえます。また、この後Gene Ontology解析やPathway解析を行うことで、これらの遺伝子がどのような機能やパスウェイと関連があるかを調べることができます。

以下の手順は、1比較解析と同じ流れになりますので、1比較解析の「[4.遺伝子セットの登録方法](#)」以降を参照してください。