

QUantification tool for Methylation Analysis

<http://quma.cdb.riken.jp/>

QUMA User's manual

2008年4月23日

Version 1.02

熊木 勇一 & 岡野 正樹

ご意見、ご感想、不具合情報等ありましたら、ぜひ quma@cdb.riken.jp までお知らせ下さい。
機能についてのリクエストや使用方法がわからないといった場合でもお気軽にお問い合わせ下さい。

目次

1. QUMA について	5	5.4.4. ゲノム配列の入力	15
2. QUMA のごく簡単な使い方	6	5.4.5. ゲノム配列ファイルの選択1	16
2.1. ゲノム配列ファイルを選択する	6	5.4.6. ゲノム配列ファイルの選択 2	16
2.2. バイサルファイト配列ファイルを選択する	6	5.4.7. バイサルファイト配列の入力	17
2.3. 実行する	7	5.4.8. バイサルファイト配列ファイルの選択1	17
3. QUMA がサポートしているウェブブラウザ	7	5.4.9. バイサルファイト配列ファイルの選択2	18
4. QUMA の概要	8	5.4.10. バイサルファイト配列除外条件	18
5. メチル化状態解析モードの使い方	9	5.4.11. バイサルファイト変換方向	19
5.1. 画面構成と特徴	9	5.4.12. 解析の実行	19
5.2. トップページ	10	5.5. 解析結果ページ	20
5.3. 簡易トップページ	11	5.5.1. 解析結果ページ概要1	20
5.3.1. ゲノム配列ファイルの選択1	11	5.5.2. 解析結果ページ概要2	21
5.3.2. ゲノム配列ファイルの選択2	11	5.5.3. メチル化状態概要図の切り替え1	21
5.3.3. バイサルファイト配列ファイルの選択1	12	5.5.4. メチル化状態概要図の切り替え2	22
5.3.4. バイサルファイト配列ファイルの選択2	12	5.5.5. メチル化状態概要図のダウンロード	23
5.3.5. 解析の実行	13	5.5.6. 解析結果ページ概要3	23
5.4. 高機能トップページ	13	5.5.7. アライメントの表示	25
5.4.1. オプションの表示	13	5.5.8. バイサルファイト配列の除外／非除外1	25
5.4.2. オプション項目	14	5.5.9. バイサルファイト配列の除外／非除外2	26
5.4.3. オプションの非表示	15	5.5.10. バイサルファイト配列の並べ替え1	26
		5.5.11. バイサルファイト配列の並べ替え2	27
		5.5.12. アライメントデータダウンロード	27
		5.5.13. アライメントデータ	28

5.5.14. 解析結果データダウンロード	29	5.8.6. 図の種類1のオプション	39
5.5.15. 解析結果データ	29	5.8.7. 図の種類2	40
5.5.16. メチル化パターン図のダウンロード	30	5.8.8. 図の種類2のオプション	40
5.5.17. メチル化パターン図	30	5.8.9. 図の種類3	41
5.5.18. 図作成ページの表示	31	5.8.10. 図の種類3のオプション	41
5.6. 解析結果ページオプション	31	5.8.11. 図の種類4	42
5.6.1. オプションの表示1	31	5.8.12. 図の種類4のオプション	42
5.6.2. オプションの表示2	32	6. 統計解析モードの使い方	43
5.6.3. オプションの非表示	32	6.1. 画面構成と特徴	43
5.6.4. バイサルファイト配列の並べ替え1	33	6.2. トップページ	44
5.6.5. バイサルファイト配列の並べ替え2	33	6.2.1. オプションの表示	44
5.6.6. バイサルファイト配列除外条件1	34	6.2.2. オプション項目	44
5.6.7. バイサルファイト配列除外条件2	34	6.2.3. ゲノム配列の入力	45
5.7. アライメントページ	35	6.2.4. ゲノム配列ファイルの選択1	45
5.7.1. アライメントページ概要	35	6.2.5. ゲノム配列ファイルの選択2	46
5.7.2. アライメントデータダウンロード	36	6.2.6. バイサルファイト配列1の入力	46
5.7.3. アライメントデータ	36	6.2.7. バイサルファイト配列ファイル1の選択1	47
5.8. 図作成ページ	37	6.2.8. バイサルファイト配列ファイル1の選択2	47
5.8.1. メチル化パターン図のダウンロード	37	6.2.9. バイサルファイト配列2の入力	48
5.8.2. 図の切り替え1	37	6.2.10. バイサルファイト配列ファイル2の選択1	48
5.8.3. 図の切り替え2	38	6.2.11. バイサルファイト配列ファイル2の選択2	49
5.8.4. オプションの表示	38	6.2.12. バイサルファイト配列除外条件	49
5.8.5. 図の種類1	39	6.2.13. バイサルファイト変換方向	50

6.2.14. 解析の実行	50	6.4.6. バイサルファイト配列除外条件1	63
6.3. 統計解析結果ページ	51	6.4.7. バイサルファイト配列除外条件2	63
6.3.1. 統計解析結果ページ概要1	51	6.5. アライメントページ	64
6.3.2. 統計解析結果ページ概要2	52	6.5.1. アライメントページ概要	64
6.3.3. メチル化状態比較の概要図の切り替え1	53	6.5.2. アライメントデータダウンロード	65
6.3.4. メチル化状態比較の概要図の切り替え2	53	6.5.3. アライメントデータ	65
6.3.5. メチル化状態比較の概要図のダウンロード	54	7. 入力配列について	66
6.3.6. 統計解析結果ページ概要3	55	7.1. ゲノム配列について	66
6.3.7. アライメントの表示	56	7.2. バイサルファイト配列について	67
6.3.8. バイサルファイト配列の除外／非除外1	56	8. 配列形式について	68
6.3.9. バイサルファイト配列の除外／非除外2	57	8.1. plain sequence 形式	68
6.3.10. バイサルファイト配列の並べ替え1	57	8.2. FASTA 形式	68
6.3.11. バイサルファイト配列の並べ替え2	58	8.3. GenBank 形式	69
6.3.12. アライメントデータダウンロード	58	8.4. Multi-FASTA 形式	70
6.3.13. アライメントデータ	59	8.5. 配列ファイルが入った zip 形式のアーカイブ(圧縮フォルダ)	71
6.3.14. 統計解析結果データダウンロード	60	8.6. zip 形式のアーカイブの作成方法(マック)	71
6.3.15. 統計解析結果データ	60	8.6.1. マック OS X 10.3 以降の場合	71
6.4. 統計解析結果ページオプション	61	8.6.2. 他のマック OS の場合	73
6.4.1. オプションの表示1	61	8.7. zip 形式の圧縮フォルダの作成方法(ウィンドウズ)	74
6.4.2. オプションの表示2	61	8.7.1. ウィンドウズ Me/XP/ビスタの場合	74
6.4.3. オプションの非表示	61	8.7.2. 他のウィンドウズの場合	75
6.4.4. バイサルファイト配列の並べ替え1	62		
6.4.5. バイサルファイト配列の並べ替え2	62		

1. QUMA について

Bisulfite sequencing 法は DNA メチル化の解析に広く用いられている方法ですが、塩基の変換が行われるために、一般的なバイオインフォマティクスツールでは処理が難しく、これまで多くの研究者は手作業で塩基配列の処理と解析を行っていました。そのため

- 配列の解析に非常に手間がかかる
- 多くの配列を処理するのが困難
- 同じ bisulfite 配列を解析しても、配列解析を行う人によって結果が異なってしまう可能性がある

といった問題点がありました。

そこで我々は CpG メチル化についての bisulfite 配列の処理を行うための、Web ツールの開発を行いました。このツールには以下の特徴があります。

- Web ベースなので、インターネットに接続さえしていれば誰でも使用可能(ソフトウェアのセットアップ等は必要なし)
- sequencer から出力された bisulfite 配列をそのまま使用可能(plasmid vector 配列の除去等は不要)
- 一定の基準で、質の低い配列データを自動除去
- 自動でアライメント処理、図の作成、統計値を計算
- パラメータの設定はほとんど必要なく、容易に利用可能
 - ✓ オプションでは細かいパラメータの設定/変更が可能

・高速な処理(20 配列程度なら 2-3 秒で処理可能)により、ストレスなく使用可能

・はっきりとした条件によって処理が行えるので、条件が同じなら、誰が行っても同じ結果が得られる

・Bisulfite 配列の解析に慣れていない研究者でも、知識/経験を必要とせずに、bisulfite 配列の解析が可能

・Bisulfite 配列の解析に慣れている研究者でも、直感的に理解しやすい形でデータを出力できる

QUMA は <http://quma.cdb.riken.jp/> で公開しています。

まだ不十分点もあるかと思いますが、bisulfite 法を行っている研究者にとっては、有用なツールに仕上がっていると思います。

皆様の研究にお役に立ただければ幸いです。

2. QUMA のごく簡単な使い方

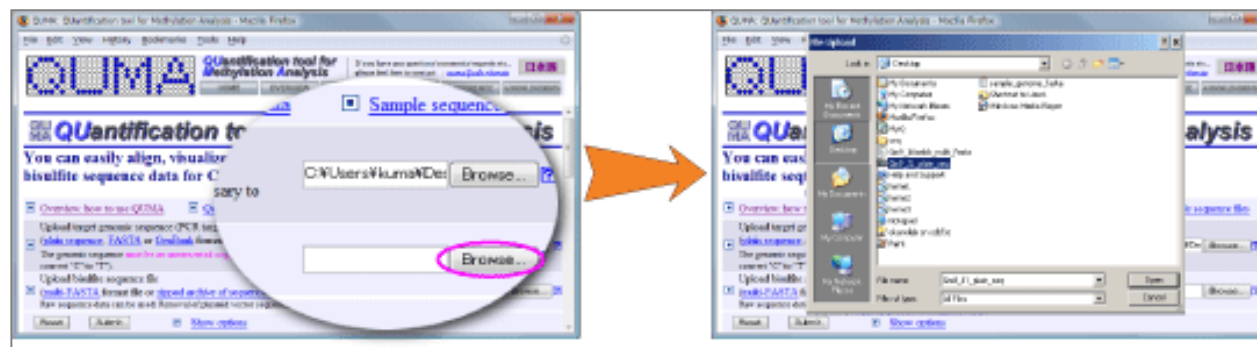
2.1. ゲノム配列ファイルを選択する

バイサルファイトPCRのターゲットの配列(プライマー間の配列)をCをTに変換せずに用いて下さい。(詳細は「[7.1. ゲノム配列について](#)」を参照)



2.2. バイサルファイト配列ファイルを選択する

ベクター配列の除去は必要なく、シーケンサーからの出力配列をそのまま使用可能です。[8.4. Multi-FASTA 形式](#)ファイルまたは [8.5. 配列ファイルが入った zip 形式のアーカイブ\(圧縮フォルダ\)](#)を用いることで複数の配列をアップロードします。(詳細は「[7.2. バイサルファイト配列について](#)」を参照)



4. QUMA の概要

QUMA はウェブで使える DNA メチル化の解析ツールで、バイサルファイト配列データをゲノム配列にアライメントしたり、結果を定量化する、図を作成する、といったことが簡単に短時間で行えます。

QUMA は「[メチル化状態解析モードの使い方](#)エラー! 参照元が見つかりません。」と「[統計解析モードの使い方](#)」の二つの解析モードによって構成されています。メチル化状態解析モードは一つのグループのバイサルファイト配列についてメチル化状態の解析を行い、統計解析モードでは2つのグループのバイサルファイト配列についての統計解析を行います。

トップページ

The image shows the QUMA web application interface. At the top, there is a navigation bar with the QUMA logo and the title "Quantification tool for Methylation Analysis". Below this, there is a main heading "Quantification tool for Methylation Analysis" and a sub-heading "You can easily align, visualize and quantify bisulfite sequence data for CpG methylation analysis". The interface is divided into two main sections: "Results of bisulfite sequencing analysis" and "Results of statistical analysis".

Results of bisulfite sequencing analysis: This section displays a summary of information, including project name, sequence, length of target, number of CpGs, and number of bisulfite sequences. It also shows a table of methylation states for each CpG site, with columns for CpG position, sequence, and methylation percentage. A bar chart is also visible, showing the distribution of methylation levels across the CpG sites.

Results of statistical analysis: This section displays a summary of information, including project name, sequence, length of target, number of CpGs, and number of bisulfite sequences. It also shows a table of CpG positions, with columns for CpG position, sequence, and methylation percentage. A bar chart is also visible, showing the distribution of methylation levels across the CpG sites.


At the bottom of the interface, there are two large green arrows pointing to the left and right, indicating the two analysis modes. The left arrow is labeled "メチル化状態の解析" (Methylation state analysis) and the right arrow is labeled "統計的解析" (Statistical analysis).

5. メチル化状態解析モードの使い方

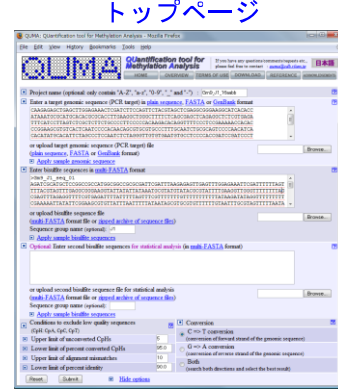
5.1. 画面構成と特徴

QUMA のメチル化状態解析モードは右図のような画面構成になっており、以下の特徴があります。

- シーケンサーから出力されたバイサルファイト配列をそのまま使用可能で、プラスミドベクターの配列を除去する必要はありません
- 多くの場合数秒で、以下の処理を実行可能
 - ✓ バイサルファイトアライメント
 - ✓ 配列の品質チェック
 - ✓ メチル化パターンの解析
 - ✓ 図の作成
- 実際のバイサルファイトアライメントをチェックして、バイサルファイト配列の採用/不採用を変更することが出来ます
- 配列の品質チェックのパラメータを変更して再実行することが容易
- ほとんどのデータをダウンロード可能
- メチル化パターンの図の作成機能では、いろいろなパラメータを変更可能で、ユーザの好みの図に仕上げることが出来ます。



アライメント



トップページ

アライメントの確認

配列の取捨選択

アライメントデータのダウンロード

アライメントデータのダウンロード

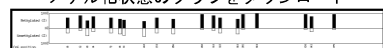
解析結果

メチル化状態のグラフをダウンロード

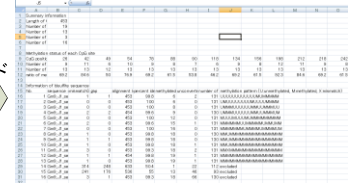
解析結果のダウンロード

メチル化パターンの図をダウンロード

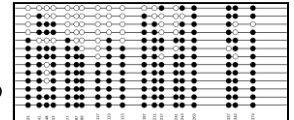
- 多くの場合数秒で処理
- アライメント
- 配列から余分な部分を除去
- 配列の品質チェック
- メチル化パターンを解析



メチル化状態のグラフをダウンロード



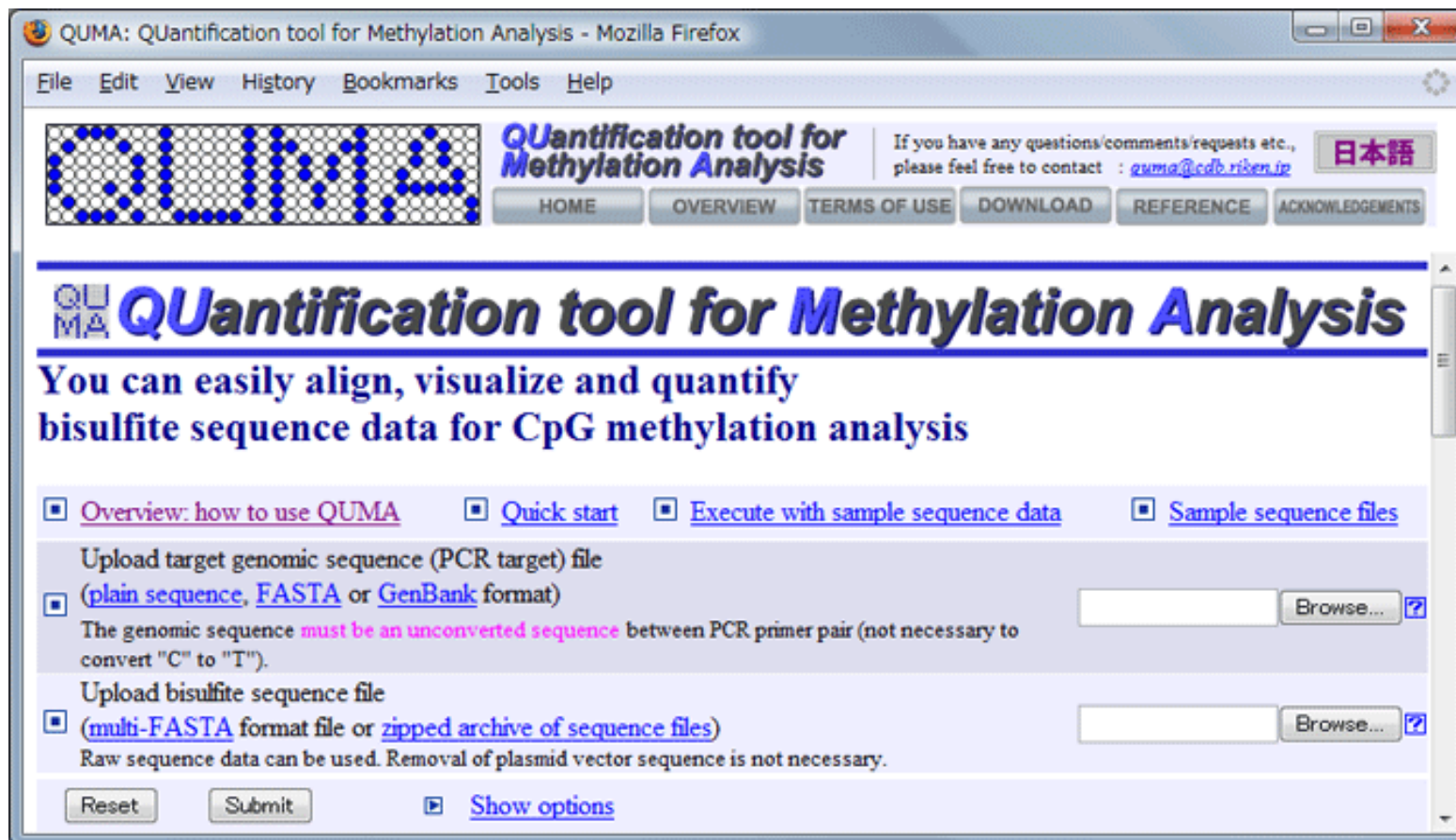
解析結果のダウンロード



メチル化パターンの図をダウンロード

5.2. トップページ

トップページはデフォルトの [5.3. 簡易トップページ](#)と、オプションを表示した [5.4. 高機能トップページ](#)を切り替えることができます。



5.3. 簡易トップページ

簡易トップページでは以下の項目が表示されます。

- ゲノム配列ファイル選択項目
- バイサルファイト配列ファイル選択項目
- 「リセット」ボタンと「実行」ボタン

5.3.1. ゲノム配列ファイルの選択1

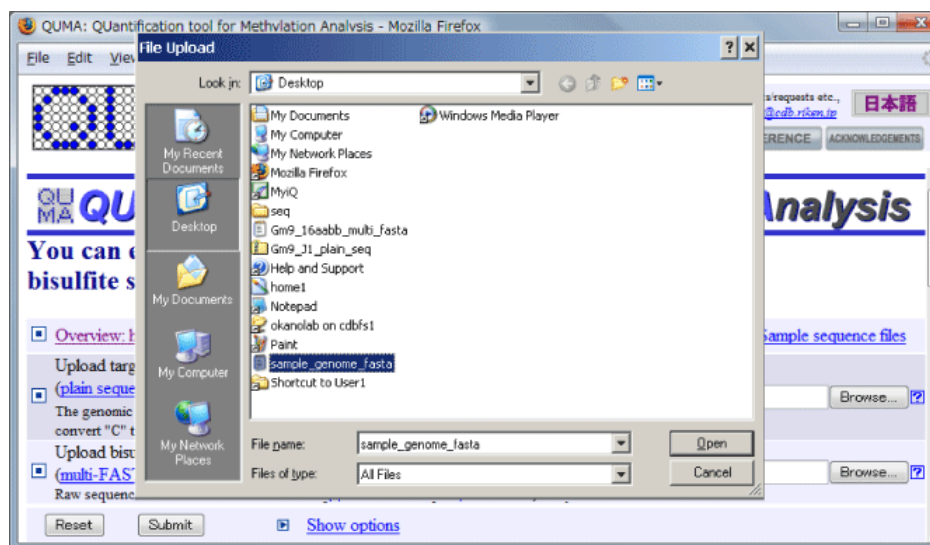
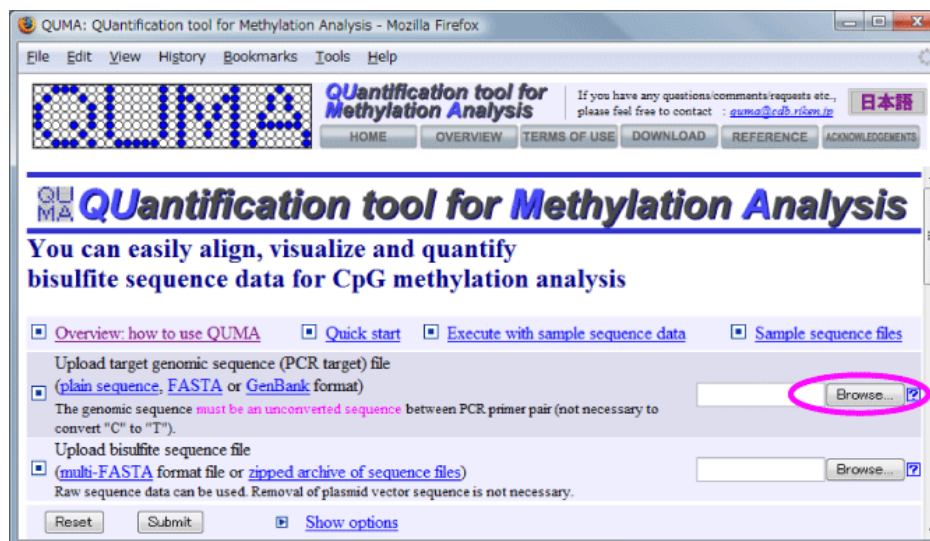
まず、アップロードするゲノム配列を選択するために一つ目のボタンをクリックします。

(この画面では“Browse...”ボタンですが、使用するブラウザによって表示が異なります。)

5.3.2. ゲノム配列ファイルの選択2

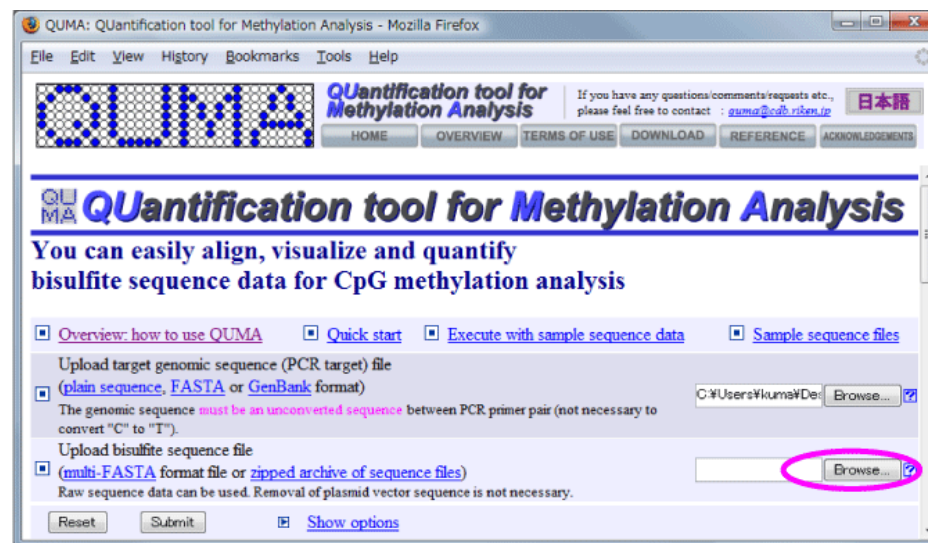
ファイル選択のためのダイアログが表示されますので、アップロードするゲノム配列ファイルを選択します。

使用できるゲノム配列の形式についての詳細は「[7.1. ゲノム配列について](#)」をご覧ください。



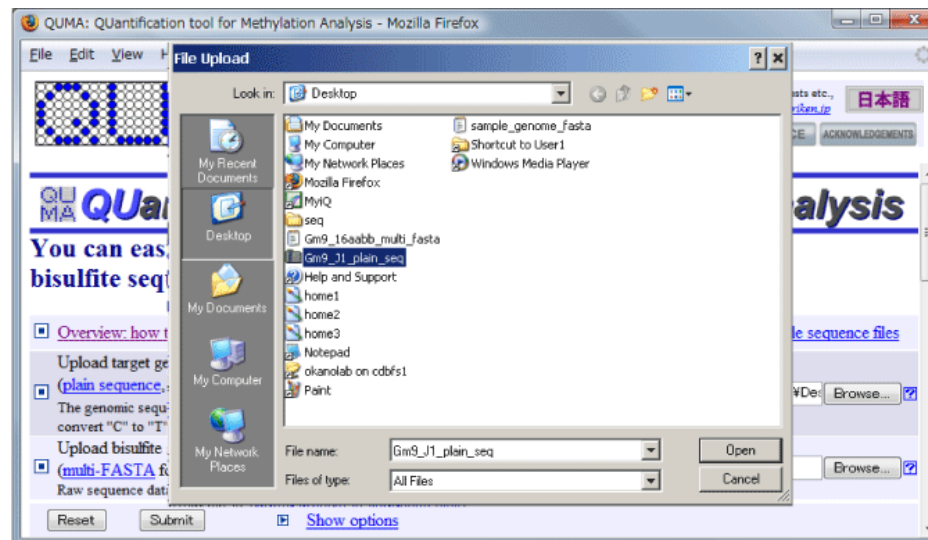
5.3.3. バイサルファイト配列ファイルの選択1

次にアップロードするバイサルファイト配列のファイルを選択するために二つ目のボタンをクリックします。



5.3.4. バイサルファイト配列ファイルの選択2

ファイル選択のためのダイアログが表示されますので、アップロードするバイサルファイト配列ファイルを選択します。使用可能なファイル形式は [8.4. Multi-FASTA 形式](#) または [8.5. 配列ファイルが入った zip 形式のアーカイブ\(圧縮フォルダ\)](#) です。使用できるバイサルファイト配列の形式についての詳細は、「[7.2. バイサルファイト配列について](#)」、「[8.6. zip 形式のアーカイブの作成方法\(マック\)](#)」、「[8.7. zip 形式の圧縮フォルダの作成方法\(ウィンドウズ\)](#)」をご覧ください。



5.3.5. 解析の実行

2つのファイルを指定し終わったら、“実行”ボタンをクリックします。
多くの場合、数秒で結果が出ます。

以降の処理は、「[5.5. 解析結果ページ](#)」で解説されています。

5.4. 高機能トップページ

5.4.1. オプションの表示

オプションを表示するには“オプションを表示する”のリンクをクリックします。

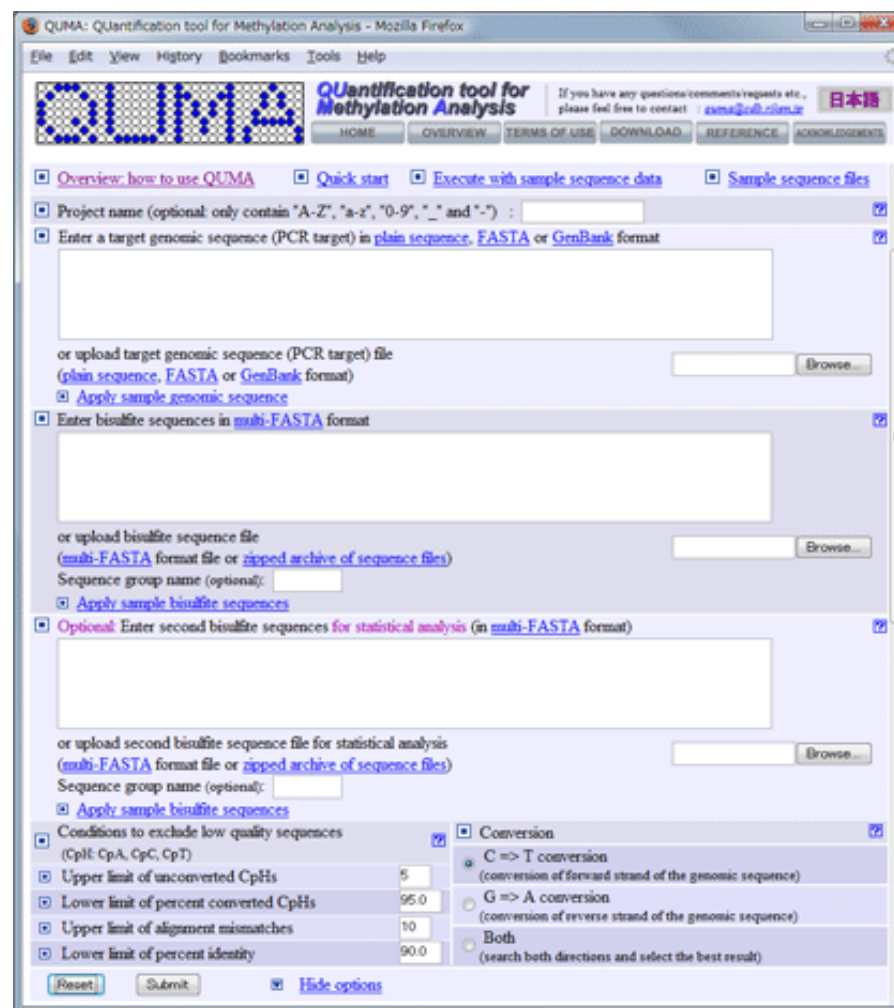


5.4.2. オプション項目

オプションの項目が表示された高機能トップページになります。3つ目の配列入力フィールドについては、[統計解析モードの使い方](#)で使いますので、ここでは触れません。

以下の項目が表示されます。

- プロジェクト名入力項目
- ゲノム配列
 - ✓ ゲノム配列直接入力フィールド
 - ✓ ゲノム配列ファイル選択項目
- バイサルファイト配列
 - ✓ バイサルファイト配列直接入力フィールド
 - ✓ バイサルファイト配列ファイル選択項目
 - ✓ グループ名入力項目
- バイサルファイト配列2(統計解析モードで使用)
 - ✓ バイサルファイト配列直接入力フィールド
 - ✓ バイサルファイト配列ファイル選択項目
 - ✓ グループ名入力項目
- 配列品質条件設定項目
 - ✓ 4つの条件について、カットオフの値の設定
- バイサルファイト変換選択項目
 - ✓ 「C=>T 方向」、「G=>A 方向」、「自動判定」から選択
- 「リセット」ボタンと「実行」ボタン



5.4.3. オプションの非表示

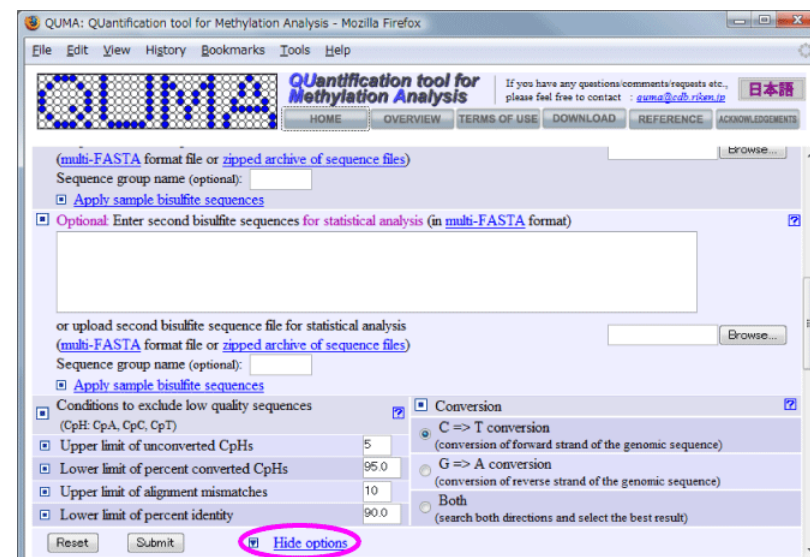
簡易トップページに戻る場合は、“オプションを隠す”のリンクをクリックします。

5.4.4. ゲノム配列の入力

プロジェクト名を入力します(オプション)。入力された場合は、解析結果ファイル名等にプロジェクト名が含まれるようになりますので、後でどんなデータかの識別が行いやすくなりますが、空のままでも問題ありません。プロジェクト名には半角の英数字と“-”、“_”以外は使用できません。

次に、ゲノム配列を入力します。ゲノム配列の入力方法は、①直接入力する方法、②ファイルをアップロードする方法、の2種類の方法があります。

①直接入力する場合は、ゲノム配列をコピー&ペーストなどにより入力します。入力できるゲノム配列の形式は、[8.1. plain sequence 形式](#)、[8.2. FASTA 形式](#)または[8.3. GenBank 形式](#)になります。詳細は「[7.1. ゲノム配列について](#)」をご覧ください。



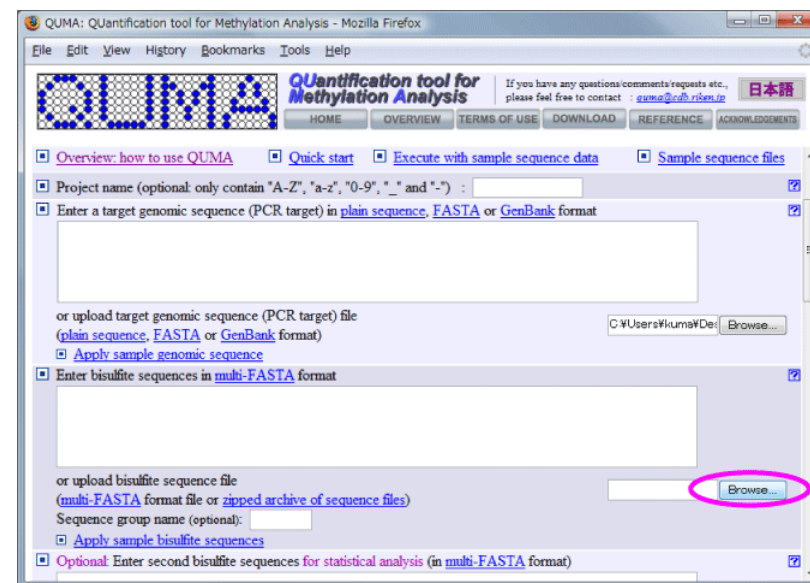
5.4.7. バイサルファイト配列の入力

バイサルファイト配列のグループ名を入力します(オプション)。入力された場合は、解析結果ファイル内にグループ名が含まれるようになりますので、後でどんなデータかの識別が行いやすくなりますが、空のままでも問題ありません。次に、バイサルファイト配列を入力します。バイサルファイト配列の入力方法も、①直接入力する方法、②ファイルをアップロードする方法、の2種類の方法があります。

①直接入力する場合は、バイサルファイト配列をコピー＆ペーストなどにより入力します。入力できるバイサルファイト配列の形式は、[8.4. Multi-FASTA 形式](#)のみです。詳細は「[7.2. バイサルファイト配列について](#)」をご覧ください。

5.4.8. バイサルファイト配列ファイルの選択1

②ファイルをアップロードしてバイサルファイト配列を入力する場合は、アップロードするファイルを選択するために二つ目のボタンをクリックします。



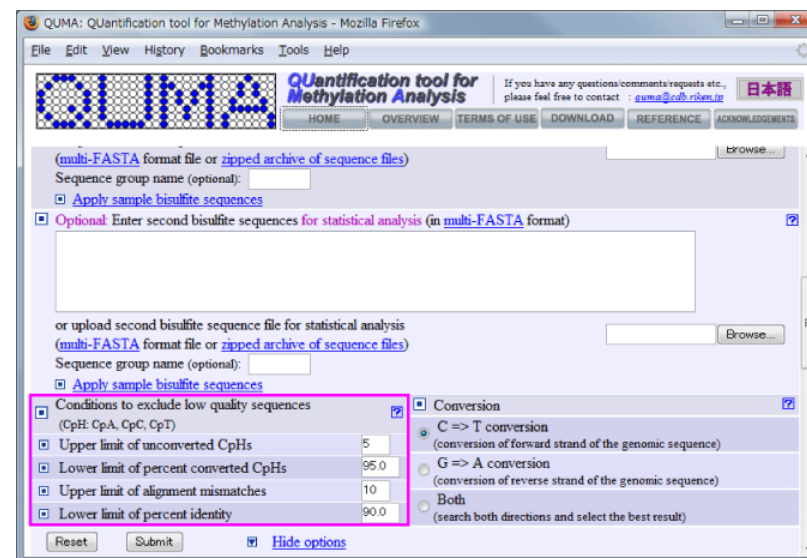
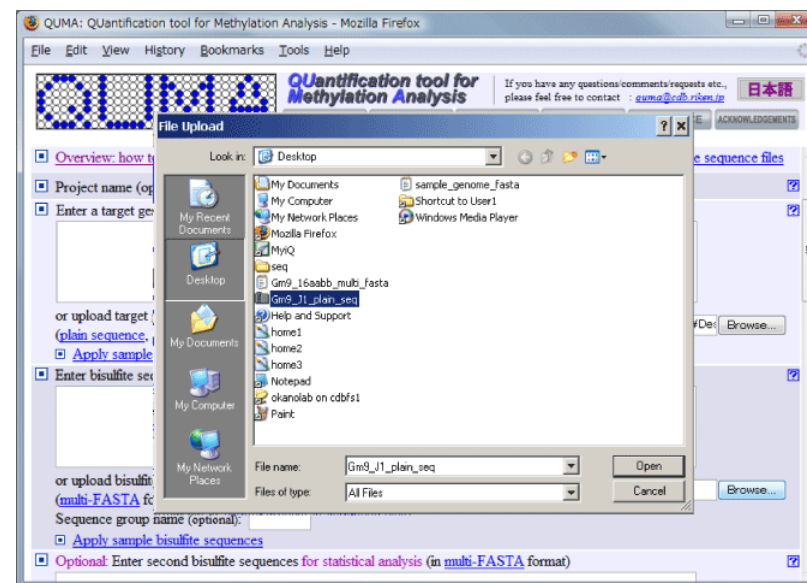
5.4.9. バイサルファイト配列ファイルの選択2

ファイル選択のためのダイアログが表示されますので、アップロードするバイサルファイト配列ファイルを選択します。使用可能なファイル形式は [8.4. Multi-FASTA 形式](#) または [8.5. 配列ファイルが入った zip 形式のアーカイブ \(圧縮フォルダ\)](#) です。使用できるバイサルファイト配列の形式についての詳細は、「[7.2. バイサルファイト配列について](#)」、「[8.6. zip 形式のアーカイブの作成方法 \(マック\)](#)」、「[8.7. zip 形式の圧縮フォルダの作成方法 \(ウィンドウズ\)](#)」をご覧ください。

5.4.10. バイサルファイト配列除外条件

質の低いバイサルファイト配列の除去のための以下のパラメータを必要に応じて変更して下さい。

- バイサルファイト変換されなかった塩基の数の上限
 - ✓ 変換されなかった CpH (CpA, CpC, CpT) の数の上限です
- バイサルファイト変換効率の下限 (%)
 - ✓ “変換された CpH の数 / すべての CpH の数” の下限値です
- ミスマッチの数の上限
 - ✓ ゲノム配列とのアライメントでのミスマッチ塩基数 (ギャップを含む) の上限です
- 相同性の下限 (%)
 - ✓ ゲノム配列とのアライメントでの相同性の下限値です



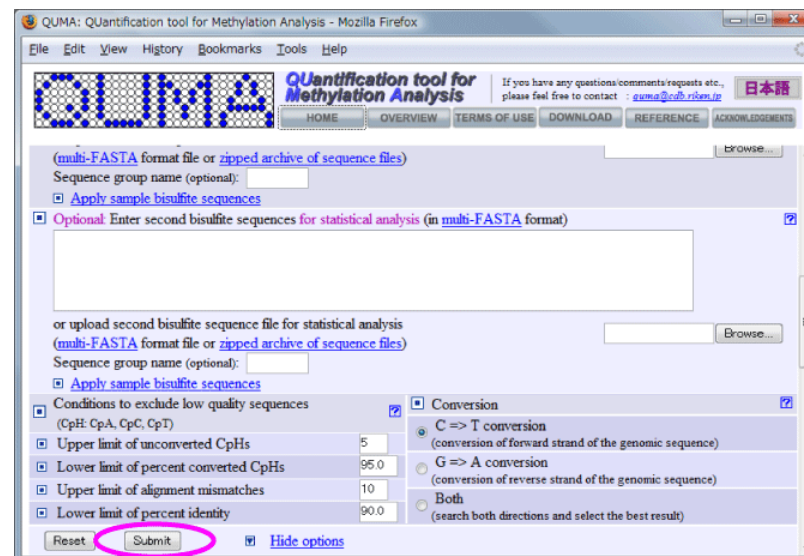
5.4.11. バイサルファイト変換方向

バイサルファイト変換が C=>T, G=>A のどちらの向きか、つまり入力したゲノム配列の forward/reverse 鎖のどちらの鎖がバイサルファイト変換されているとするか(どちらの側の鎖をバイサルファイト PCR で増幅しているか)を指定します。入力したゲノム配列に対してバイサルファイト PCR のプライマーが設計されている場合は“C=>T 変換”になります。ゲノム配列の逆鎖に対して PCR プライマーが設計されている場合は“G=>A 変換”を選択して下さい。“両方”を選択した場合は、両側鎖について解析が行われ、より確からしい結果が自動的に選択されます。



5.4.12. 解析の実行

“実行”ボタンをクリックして解析を開始します。多くの場合、数秒で結果が出ます。

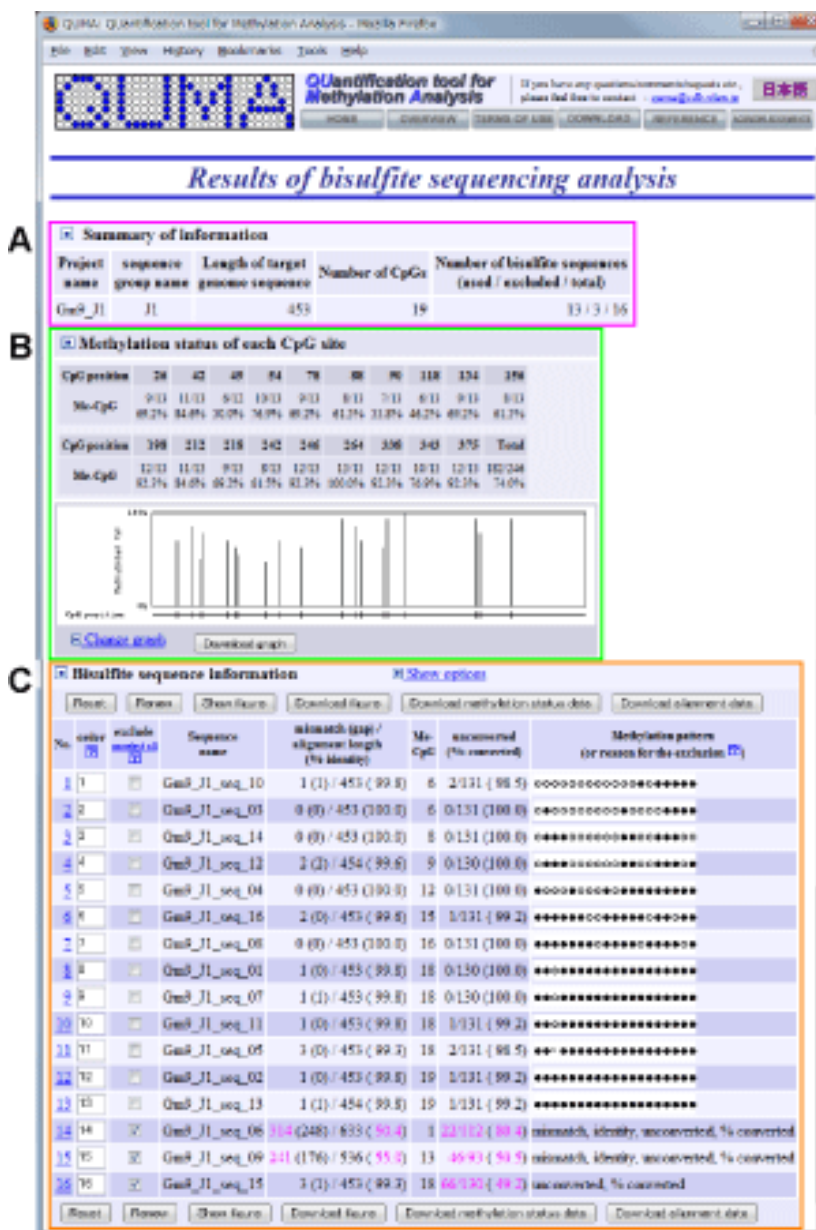


5.5. 解析結果ページ

5.5.1. 解析結果ページ概要1

解析結果ページは以下の3つのセクションで構成されます。

- A. 概要
- B. 各 CpG サイトについてのメチル化状態の情報
- C. 各バイサルファイト配列についての情報



5.5.2. 解析結果ページ概要2

A) 概要

ゲノム配列長、CpG サイトの数、入力されたバイサルファイト配列の数、除外されたバイサルファイト配列の数等の情報が示されます。

B) 各 CpG サイトについてのメチル化状態の情報

各 CpG サイトについて、その位置及びメチル化されていた CpG の割合が示されます。また、各 CpG サイトのメチル化の状態を表した概要図も表示されます。

A Summary of information

Project name	sequence group name	Length of target genome sequence	Number of CpGs	Number of bisulfite sequences (used / excluded / total)
Gm9_J1	J1	453	19	13 / 3 / 16

B Methylation status of each CpG site

CpG position	26	42	49	54	78	88	90	118	134	156
Me-CpG	9/13 69.2%	11/13 84.6%	6/12 50.0%	10/13 76.9%	9/13 69.2%	8/13 61.5%	7/13 53.8%	6/13 46.2%	9/13 69.2%	8/13 61.5%

CpG position	198	212	218	242	246	264	338	343	375	Total
Me-CpG	12/13 92.3%	11/13 84.6%	9/13 69.2%	8/13 61.5%	12/13 92.3%	13/13 100.0%	12/13 92.3%	10/13 76.9%	12/13 92.3%	182/246 74.0%

Change graph Download graph

5.5.3. メチル化状態概要図の切り替え1

メチル化状態の概要図は“Change graph”のリンクをクリックすることで切り替えることが可能です。

Summary of information

Project name	sequence group name	Length of target genome sequence	Number of CpGs	Number of bisulfite sequences (used / excluded / total)
Gm9_J1	J1	453	19	13 / 3 / 16

Methylation status of each CpG site

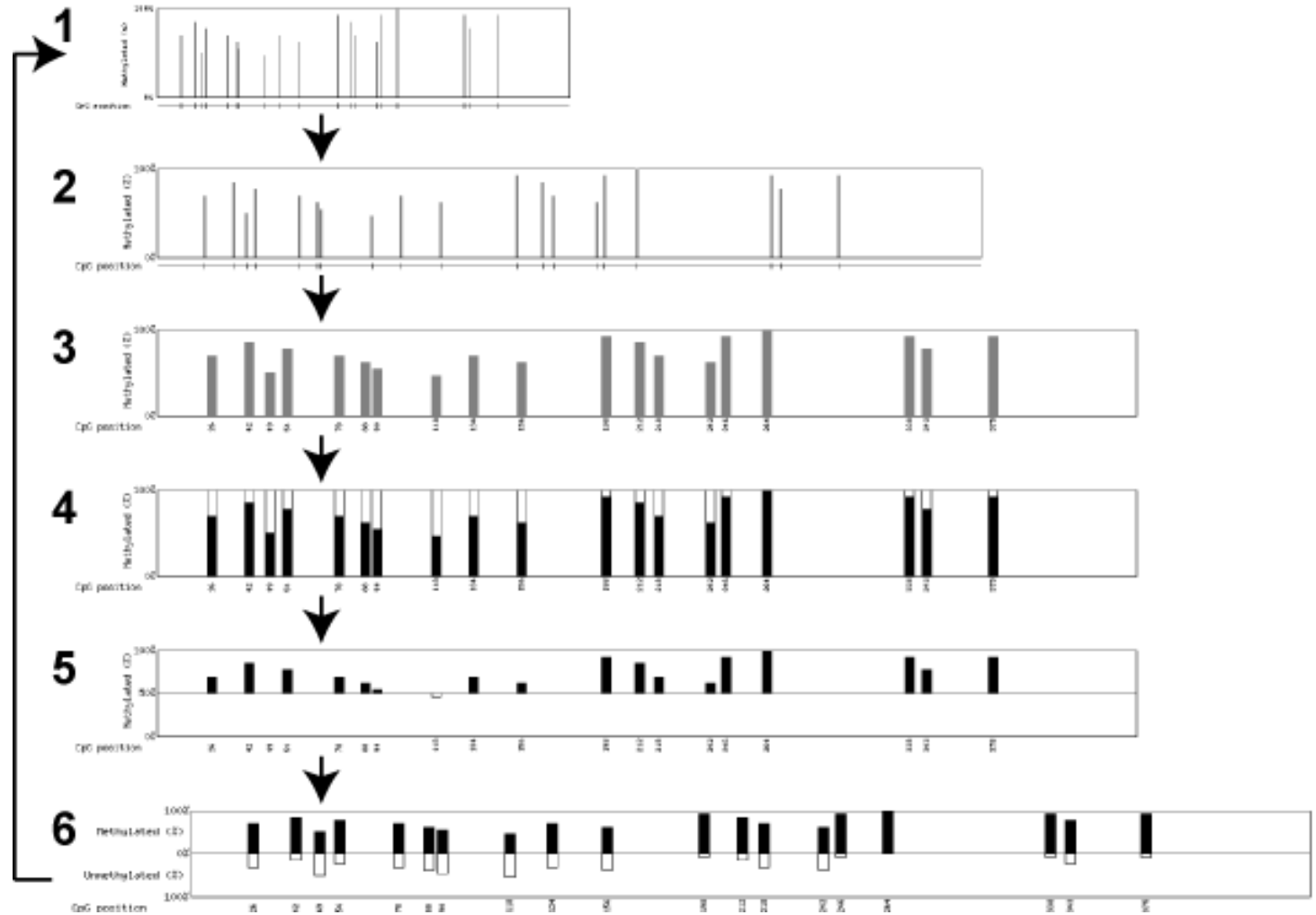
CpG position	26	42	49	54	78	88	90	118	134	156
Me-CpG	9/13 69.2%	11/13 84.6%	6/12 50.0%	10/13 76.9%	9/13 69.2%	8/13 61.5%	7/13 53.8%	6/13 46.2%	9/13 69.2%	8/13 61.5%

CpG position	198	212	218	242	246	264	338	343	375	Total
Me-CpG	12/13 92.3%	11/13 84.6%	9/13 69.2%	8/13 61.5%	12/13 92.3%	13/13 100.0%	12/13 92.3%	10/13 76.9%	12/13 92.3%	182/246 74.0%

Change graph Download graph

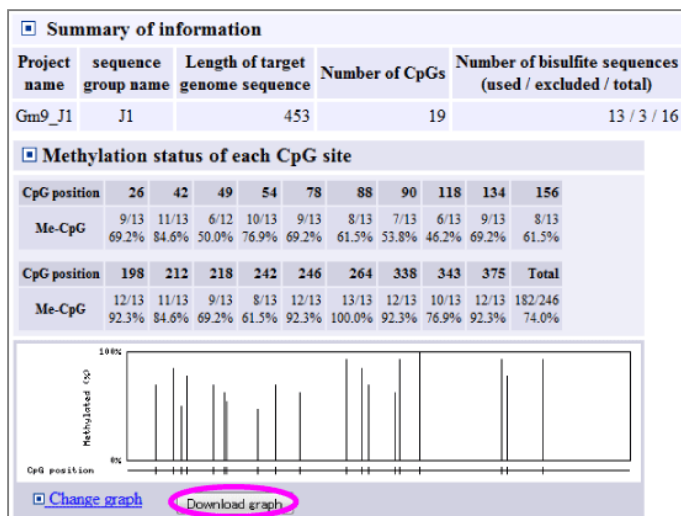
5.5.4. メチル化状態概要図の切り替え2

“Change graph”のリンクをクリックするごとに図が切り替わります。1と2の図は CpG の位置関係をほぼ正確に反映させた図ですが、3-6の図は正確な位置関係を反映させた図ではありません。



5.5.5. メチル化状態概要図のダウンロード

“Download graph”ボタンをクリックすることでメチル化状態の概要図をダウンロードすることができます(その時点で表示されている図がダウンロードされます)。



5.5.6. 解析結果ページ概要3

C) 各バイサルファイト配列についての情報

1. ゲノム配列とのアライメントでのミスマッチの数、相同性等
2. メチル化されている CpG の数
3. バィサルファイト変換されなかった CpA, CpC, CpT の数
4. CpG のメチル化のパターン(黒丸がメチル化された CpG, 白丸がメチル化されていない CpG)

C Bisulfite sequence information [Show options](#)

Reset Renew Show figure **1.** Download figure **2.** Download figure **3.** Download methylation status data **4.** Download alignment data

No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion)
1	1	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_10	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
2	2	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_03	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
3	3	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_14	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
4	4	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_12	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
5	5	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_04	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
6	6	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_16	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
7	7	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_08	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
8	8	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_01	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
9	9	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_07	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
10	10	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_11	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
11	11	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_05	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131 (98.5)	ooxooooooooooooooooo
12	12	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
13	13	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_13	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_06	314 (248) / 633 (50.4)	1	22/112 (80.4)	mismatch, identity, unconverted, % converted
15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_09	241 (176) / 536 (55.0)	13	46/93 (50.5)	mismatch, identity, unconverted, % converted
16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_15	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130 (49.2)	unconverted, % converted

Reset Renew Show figure Download figure Download methylation status data Download alignment data

質が低いと判定されたバイサルファイト配列は除外されて、メチル化のパターン(4.)は表示されません。また、条件に引っかかった値が赤紫色で示されるとともに(1.及び 3.欄)、条件の種類がメチル化パターン欄(4.)に表示されます(下記参照)。除外のための条件の値は変更可能です ("[5.6.1. オプションの表示1](#)"を参照)。

- mismatch:
 - ✓ ゲノム配列とバイサルファイト配列のアライメントのミスマッチの数(ギャップを含む)が上限値を超えた場合です(デフォルト値は 10)。
 - ✓ これは、シーケンシングデータが汚い場合に起こります。
- % ident
 - ✓ ゲノム配列とバイサルファイト配列のアライメントの相同性(%)が下限値を下回った場合です(デフォルト値は 90%)。
 - ✓ これは、シーケンシングデータが汚い場合に起こります。
- Unconv
 - ✓ バィサルファイト変換で未変換の CpH(CpA, CpC, CpT)の数が、上限値を超えた場合です(デフォルト値は)。
 - ✓ これは、バイサルファイト変換が不完全だった場合に起こります。
- % conv
 - ✓ "変換された CpH の数" / "CpH の総数" の%値が下限を下回った場合です(デフォルト値は 95%)。
 - ✓ これは、バイサルファイト変換が不完全だった場合に起こります。
- user desired
 - ✓ これは、"exclude" 欄のチェックボックスをユーザがチェックした場合です。

5.5.7. アライメントの表示

数字のリンクをクリックするとアライメントページが開き、ゲノム配列とバイサルファイト配列のアライメント情報が表示されます。アライメントページについては、「[5.7. アライメントページ](#)」で解説されています。

No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion)
1	1	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_10	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
2	2	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_03	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
3	3	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_14	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
4	4	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_12	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
5	5	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_04	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
6	6	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_16	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
7	7	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_08	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
8	8	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_01	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
9	9	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_07	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
10	10	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_11	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
11	11	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_05	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
12	12	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
13	13	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_13	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_06	314 (248) / 633 (50.4)	1	22/112 (80.4)	mismatch, identity, unconverted, % converted
15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_09	241 (176) / 536 (55.0)	13	46/93 (50.5)	mismatch, identity, unconverted, % converted
16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_15	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130 (49.2)	unconverted, % converted

5.5.8. バイサルファイト配列の除外／非除外1

解析から除外したいバイサルファイト配列がある場合は、“exclude”チェックボックスをチェックします。また、既に除外されているバイサルファイト配列を解析に加える場合は、“exclude”チェックボックスのチェックを外します。そして、“Renew”ボタンをクリックします(二つある“Renew”ボタンのどちらでも構いません)。“unselect all”のリンクをクリックすると全てのチェックが外れます。

No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion)
1	1	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_10	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
2	2	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_03	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
3	3	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_14	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
4	4	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_12	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
5	5	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_04	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
6	6	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_16	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
7	7	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_08	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
8	8	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_01	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
9	9	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_07	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
10	10	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_11	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
11	11	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_05	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
12	12	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
13	13	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_13	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_06	314 (248) / 633 (50.4)	1	22/112 (80.4)	mismatch, identity, unconverted, % converted
15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_09	241 (176) / 536 (55.0)	13	46/93 (50.5)	mismatch, identity, unconverted, % converted
16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_15	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130 (49.2)	unconverted, % converted

5.5.9. バイサルファイト配列の除外／非除外2 変更結果が反映されます。

BiSulfite sequence information [Show options](#)

Reset Renew Show figure Download figure Download methylation status data Download alignment data

No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion)
1	1	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_10	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
2	2	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_03	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
3	3	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_14	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
4	4	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_12	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
5	5	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_04	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
6	6	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_16	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
7	7	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_08	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
8	8	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_01	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
9	9	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_07	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
10	10	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_11	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
11	11	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
12	12	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_13	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
13	13	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_05	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131 (98.5)	user desired
14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_06	314 (248) / 633 (50.4)	1	22/112 (80.4)	mismatch, identity, unconverted, % converted
15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_09	241 (176) / 536 (55.0)	13	46/93 (50.5)	mismatch, identity, unconverted, % converted
16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_15	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130 (49.2)	unconverted, % converted

Reset Renew Show figure Download figure Download methylation status data Download alignment data

5.5.10. バイサルファイト配列の並べ替え1

並べ替えたい配列の“order”欄の数値を変更します(数値の昇順に並べ替えられます)。そして、“Renew”ボタンをクリックします(二つある“Renew”ボタンのどちらでも構いません)。

BiSulfite sequence information [Show options](#)

Reset **Renew** Show figure Download figure Download methylation status data Download alignment data

No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion)
1	6	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_10	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
2	5	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_03	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
3	4	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_14	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
4	3	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_12	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
5	2	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_04	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
6	1	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_16	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
7	7	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_08	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
8	8	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_01	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
9	9	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_07	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
10	10	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_11	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
11	11	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_05	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
12	12	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
13	13	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_13	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_06	314 (248) / 633 (50.4)	1	22/112 (80.4)	mismatch, identity, unconverted, % converted
15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_09	241 (176) / 536 (55.0)	13	46/93 (50.5)	mismatch, identity, unconverted, % converted
16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_15	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130 (49.2)	unconverted, % converted

Reset **Renew** Show figure Download figure Download methylation status data Download alignment data

5.5.11. バイサルファイト配列の並べ替え2 並べ替え結果が反映されます。

No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion)
1	1	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_16	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131 (99.2)	●●●●●○○○○○○○○○○●●●●●
2	2	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_04	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131 (100.0)	●○○○○○○○○○○●●●●●●●●●●
3	3	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_12	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130 (100.0)	●●●●○○○○○○○○●●●●●●●●●●
4	4	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_14	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	●○○○○○○○○○○●●●●●●●●●●
5	5	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_03	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	●○○○○○○○○○○●●●●●●●●●●
6	6	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_10	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	○○○○○○○○○○●●●●●●●●●●
7	7	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_08	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131 (100.0)	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
8	8	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_01	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
9	9	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_07	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
10	10	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_11	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131 (99.2)	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
11	11	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_05	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131 (98.5)	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
12	12	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131 (99.2)	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
13	13	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_13	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131 (99.2)	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_06	314 (248) / 633 (80.4)	1	22/112 (80.4)	mismatch, identity, unconverted, % converted
15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_09	241 (176) / 536 (55.0)	13	46/93 (50.5)	mismatch, identity, unconverted, % converted
16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_15	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130 (49.2)	unconverted, % converted

5.5.12. アライメントデータダウンロード

“Download alignment data”ボタンをクリックすると、全バイサルファイト配列についてのアライメントデータがダウンロードされます。

No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion)
1	1	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_10	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	○○○○○○○○○○●●●●●●●●●●
2	2	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_03	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	●○○○○○○○○○○●●●●●●●●●●
3	3	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_14	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	●○○○○○○○○○○●●●●●●●●●●
4	4	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_12	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130 (100.0)	●●●●○○○○○○○○●●●●●●●●●●
5	5	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_04	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131 (100.0)	●○○○○○○○○○○●●●●●●●●●●
6	6	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_16	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131 (99.2)	●●●●●○○○○○○○○●●●●●●●●●●
7	7	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_08	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131 (100.0)	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
8	8	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_01	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
9	9	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_07	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
10	10	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_11	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131 (99.2)	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
11	11	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_05	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131 (98.5)	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
12	12	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131 (99.2)	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
13	13	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_13	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131 (99.2)	●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_06	314 (248) / 633 (80.4)	1	22/112 (80.4)	mismatch, identity, unconverted, % converted
15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_09	241 (176) / 536 (55.0)	13	46/93 (50.5)	mismatch, identity, unconverted, % converted
16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_15	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130 (49.2)	unconverted, % converted

5.5.13. アライメントデータ

ダウンロードしたアライメントデータのファイルはテキストエディット(マック)やメモ帳(ウィンドウズ)などのテキストエディタで開くことができます。

```

-----
Alignment results No. 1
-----
Summary information
-----
Bisulfite sequence name      Grl_J1_seq_01.pep
Conversion                   C -> T conversion
(Conversion of forward strand of the genomic sequence)
Length of bisulfite sequence  953
Length of target genome sequence  493
Aligned region of bisulfite sequence  44 - 493
Alignment direction         forward
Number of CpG              19
Number of methylated CpG   19
Number of Unconverted CpH (GpA/GpT/GpC)  0
Number of CpH (GpA/GpT/GpC) 130
Number of mismatch (include gap)  1
Number of gap              0
Alignment length           493
Percent identity            99.8 %
Methylation pattern        M1,M2,M3,M4,M5,M6,M7,M8,M9,M10
(0:Unmethylated, 1:Methylated, X:Mismatch)
-----
Target genome sequence
-----
>genome sequence
CGAGGAGCTGAGCTTGGAGAACTCGATCTTCCAGTCTAGCTAGCTGGAGGGGGGAG
CGATCAGCACAATAAATGGGATGACACAGCCGACCTTGAAGGCTGGGTTTCTCAGGGA
GCTCAGAGGCTCTGGAGATTTTCATGCTAGCTCTGCTCTGCCCCCTTCCGCCACAA
GACACAGTTTTTCCGAAAAACAGCCGGAAGGCTGTACTGATCTCCGACACAA
GGTGGGTGGCCCTTGGATCTGGCCAGTCCCGACATCAGACATATGACATCTTAGCC
CTCCAACTCTGAGGTTGTGGAGTCTGCTCCCAAGATCCGATCCGATCCGATCCGAT
GAGCTCTAGCAGATGAACTGAGCATTGAAACATGACAGCTGACAGCTGATGATGAGAACT
TTATGGTCTCTAGCCCTGCGAATCCGGCACT
-----
Bisulfite sequence
-----
>Grl_J1_seq_01.pep
AGATGCGATGCTCCGAGCGGCAATGGGGGGGGGGGATTCGATTTAGGAGCTGAGCTTG
CAGCAATTCATTTTTAGAGCTTGGGTTGGGCGGAGGATTTATATATTAAGTGTG
CGATGCTATAGCGGATTTTGAAGGTTGGGTTTTTTTGAAGGATTTAGAGCTTTCTGTG
AGATTTATTTTAACTTGGTTTTTTTGTTTTTTTTAAAGGATAAGGTTTTTTTT
CGAAAAATATATTCGGAGGCTGTATTTAATTTTTATAATAGGTTGGGTTTTTTTGT
AATTTGGGAGTTTTTAAATATAATAATAGTATATTTAGTTTTTAATTTTTAGGTT
GTGTGAGGTGTTTTTATCGATTCGATTTTAAAGATAGAGATTTTTAGATATTCGA
AATTTGAGGATTAAGGATATATGATATATATATTAATTTTTATGTTTCTTASTG
GTTTTAATTTTTTAACTGAGTGAATTTGGGCTGGGCTGGAGGTCAGCATAAGG
AGAGTCCGAGGCTTGGATGATAGCTTGGGATTTCTATAGCTGCACTAAATAGCTT
GGGTAATGATGCTATAGCTGCTTCCCTGCTGGGAAATTTTATTCGCTCAGCAATTCACA
CAGCATAGGAGCGGAGGATTAAGGCTAAGCCCTGGGCTCCGATGATGATGATGATG
CAGCATTAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CATTAATGATTCGGCAGAGGCTGGGAGAGGCGGTTTTGGGATTTGGGCTCTTGGGCT
TCTTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CAAGGCGGATTAAGGATTTCCAGCAGATCGGGGATAGGCGAGGAGAGATCTGTA
-----
Alignment
-----
'*' : Methylated CpG
'.' : Unmethylated CpG
'-' : Unconverted CpH
'.' : Converted CpH
'X' : Methyl
'-' : Mismatch
-----
Genome      1  CGAGGAGCTGAGCTTGGAGAACTCGATCTTCCAGTCTAGCTAGCTGGAGGGGGGAG
Bisulfite   1  TAGGAGATTTGAGTTTGGAGAACTCGATTTTTAGCTTTAGCTAGCTGGAGGGGGGAG

Genome     61  CGATCAGCACAATAAATGGGATGACACAGCCGACCTTGAAGGCTGGGTTTCTCAGGGA
Bisulfite  61  GTATTATATATAAATGGGATGATATAGCCGATTTTGAAGGTTGGGTTTTTTCAGGGA

Genome    121  GCTCAGAGGCTCTGGAGATTTTCATGCTAGCTCTGCTCTGCCCCCTTCCGCCACAA
Bisulfite 121  GTTTAGAGGTTTTTGGAGATTTTATTTTAGTCTGCTTTGTTTTTTTTTTTATAA

Genome    181  GACACAGTTTTTCCGAAAAACAGCCGGAAGGCTGTACTGATCCGACACAA
Bisulfite 181  GATATAGGTTTTTTTCCAAAAATATATTCGGAGGCTGTATTTAATTTTTTATAA

Genome    241  GGTTGGGTGGCCCTTGGATCTGGCCAGTCCCGACATCAGACATATGACATTTTAGCC
Bisulfite 241  GGTTGGGTGTTTTTGTAAATTTGGTGAATTTTAAATATATATATATATATATTTAGTT

Genome    301  CTCCAACTCTAGGCTGTGTGAATGGCTCCCGCAGGATCCGATCCGATCCGATCCGAT

```


5.5.16. メチル化パターン図のダウンロード

“Download figure”ボタンをクリックすると、メチル化パターンを示す図がダウンロードされます。

□ Bisulfite sequence information □ Show options

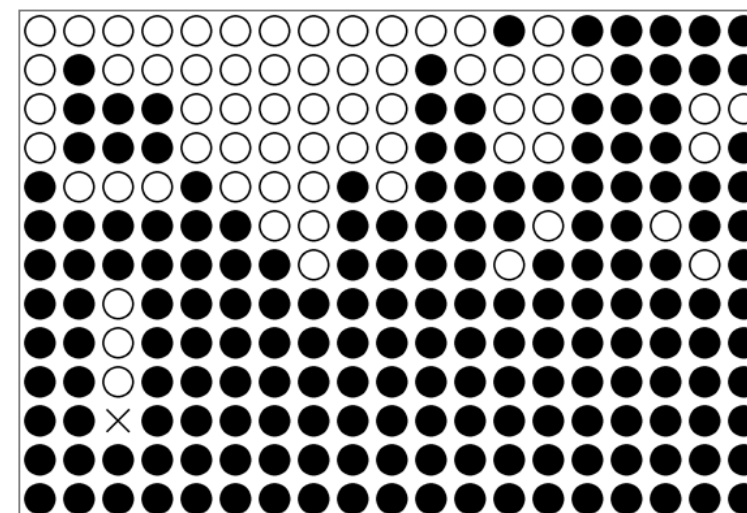
Reset Renew Show figure **Download figure** Download methylation status data Download alignment data

No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion ?)
1	1	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_10	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	○○○○○○○○○○●○○○○
2	2	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_03	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○
3	3	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_14	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○
4	4	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_12	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130 (100.0)	○○○○○○○○○○●○○○○
5	5	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_04	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131 (100.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○
6	6	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_16	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131 (99.2)	○○○○○○○○○○●○○○○
7	7	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_08	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131 (100.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○
8	8	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_01	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○
9	9	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_07	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○
10	10	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_11	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131 (99.2)	○○○○○○○○○○○○○○○○
11	11	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_05	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131 (98.5)	○○●○○○○○○○○○○○○○○
12	12	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131 (99.2)	○○○○○○○○○○○○○○○○
13	13	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_13	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131 (99.2)	○○○○○○○○○○○○○○○○
14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_06	314 (248) / 633 (50.4)	1	22/112 (80.4)	mismatch, identity, unconverted, % converted
15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_09	241 (176) / 536 (55.0)	13	46/93 (50.5)	mismatch, identity, unconverted, % converted
16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_15	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130 (49.2)	unconverted, % converted

Reset Renew Show figure **Download figure** Download methylation status data Download alignment data

5.5.17. メチル化パターン図

解析結果画面で指定した順序及び配列の除外／非除外が反映された図が作成されます。黒丸がメチル化された CpG、白丸がメチル化されていない CpG を示します。ばつ印はアライメントでのミスマッチまたはギャップを示します。5.8. 図作成ページでは、線の太さの変更といった細かいパラメータを変更しての図の作成や、CpG の位置関係を考慮する図の作成などといった異なる形式での図の作成が可能です。



5.5.18. 図作成ページの表示

“Show figure”ボタンをクリックすると、図作成ページが表示され、様々な形式で細かい条件を指定してメチル化パターンを示す図が作成できます。図作成ページについては、「[5.8. 図作成ページ](#)」で解説されています。

The screenshot shows a table titled "Bisulfite sequence information" with a "Show options" link. The table has columns for No., order, exclude, sequence name, mismatch (gap) / alignment length (% identity), Me-CpG, unconverted (% converted), and Methylation pattern. The "Show figure" button is circled in pink.

No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion)
1	1	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_10	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
2	2	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_03	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
3	3	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_14	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
4	4	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_12	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
5	5	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_04	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
6	6	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_16	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
7	7	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_08	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
8	8	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_01	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
9	9	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_07	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
10	10	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_11	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
11	11	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_05	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
12	12	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
13	13	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_13	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_06	314 (248) / 633 (50.4)	1	22/112 (80.4)	mismatch, identity, unconverted, % converted
15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_09	241 (176) / 536 (55.0)	13	46/93 (50.5)	mismatch, identity, unconverted, % converted
16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_15	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130 (49.2)	unconverted, % converted

5.6. 解析結果ページオプション

5.6.1. オプションの表示1

オプションを表示するには“Show options”のリンクをクリックします。

The screenshot shows the same table as above, but with the "Show options" link highlighted in pink.

5.6.2. オプションの表示2 オプション項目が表示されます。

Bisulfite sequence information [Hide options](#)

Sorting conditions (CpA, CpC, CpT) [Conditions to exclude low quality sequences](#)

user specified order number of methylated CpGs Upper limit of unconverted CpGs : 5
 number of unconverted CpGs percent converted CpGs Lower limit of percent converted CpGs : 95.0
 number of mismatches percent identity Upper limit of alignment mismatches : 10
 sequence name Lower limit of percent identity : 90.0

ascending order descending order [Reset with new parameters](#)

[Reset](#) [Renew](#) [Show figure](#) [Download figure](#) [Download methylation status data](#) [Download alignment data](#)

No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion)
1	1	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_10	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
2	2	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_03	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
3	3	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_14	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
4	4	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_12	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
5	5	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_04	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
6	6	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_16	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
7	7	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_08	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
8	8	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_01	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
9	9	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_07	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
10	10	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_11	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
11	11	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_05	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
12	12	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
13	13	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_13	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_06	314 (248) / 633 (50.0)	1	22/112 (80.0)	mismatch, identity, unconverted, % converted
15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_09	241 (176) / 536 (55.0)	13	46/93 (50.5)	mismatch, identity, unconverted, % converted
16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_15	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130 (49.2)	unconverted, % converted

[Reset](#) [Renew](#) [Show figure](#) [Download figure](#) [Download methylation status data](#) [Download alignment data](#)

5.6.3. オプションの非表示 オプション項目を非表示にするには、“Hide options”のリンクをクリックします。

Bisulfite sequence information [Hide options](#)

Sorting conditions (CpA, CpC, CpT) [Conditions to exclude low quality sequences](#)

user specified order number of methylated CpGs Upper limit of unconverted CpGs : 5
 number of unconverted CpGs percent converted CpGs Lower limit of percent converted CpGs : 95.0
 number of mismatches percent identity Upper limit of alignment mismatches : 10
 sequence name Lower limit of percent identity : 90.0

ascending order descending order [Reset with new parameters](#)

[Reset](#) [Renew](#) [Show figure](#) [Download figure](#) [Download methylation status data](#) [Download alignment data](#)

No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion)
1	1	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_10	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
2	2	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_03	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
3	3	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_14	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
4	4	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_12	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
5	5	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_04	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
6	6	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_16	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
7	7	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_08	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
8	8	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_01	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
9	9	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_07	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
10	10	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_11	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
11	11	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_05	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
12	12	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
13	13	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_13	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_06	314 (248) / 633 (50.0)	1	22/112 (80.0)	mismatch, identity, unconverted, % converted
15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_09	241 (176) / 536 (55.0)	13	46/93 (50.5)	mismatch, identity, unconverted, % converted
16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_15	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130 (49.2)	unconverted, % converted

[Reset](#) [Renew](#) [Show figure](#) [Download figure](#) [Download methylation status data](#) [Download alignment data](#)

5.6.4. バイサルファイト配列の並べ替え1

色々な値での並べ替えが可能です。並べ替えに用いる項目及び昇順／降順を選びます。画面はバイサルファイト変換で未変換だった塩基数の降順で並べ替える例です。次に、“Renew”ボタンをクリックします(二つある“Renew”ボタンのどちらでも構いません)。

- user specified order
 - ✓ “order”欄の数値で並べ替え
- number of methylated CpGs
 - ✓ メチル化されている CpG の数で並べ替え
- number of unconversions
 - ✓ バイサルファイト変換で未変換だった CpH (CpA, CpC, CpT) の数で並べ替え
- percent conversion
 - ✓ バイサルファイト変換効率率(“変換された CpH の数/すべての CpH の数”) で並べ替え
- number of mismatches
 - ✓ ゲノム配列とのアライメントでのミスマッチ数で並べ替え
- percent identity
 - ✓ ゲノム配列とのアライメントでの相同性で並べ替え
- sequence names
 - ✓ 配列名で並べ替え
- ascending order 値の昇順で並べ替え
- descending order 値の降順で並べ替え

5.6.5. バイサルファイト配列の並べ替え2

並べ替え結果が反映されます。

Bisulfite sequence information

Sorting conditions (CpH: CpA, CpC, CpT) Conditions to exclude low quality sequences

user specified order number of methylated CpGs Upper limit of unconverted CpGs : 5
 number of unconverted CpGs percent converted CpGs Lower limit of percent converted CpGs : 95.0
 number of mismatches percent identity Upper limit of alignment mismatches : 10
 sequence name Lower limit of percent identity : 90.0

ascending order descending order Reset with new parameters

Reset **Renew** Show figure Download figure Download methylation status data Download alignment data

No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion)
1	1	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_10	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
2	2	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_03	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
3	3	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_14	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
4	4	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_12	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
5	5	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_04	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
6	6	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_16	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
7	7	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_08	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
8	8	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_01	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
9	9	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_07	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
10	10	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_11	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
11	11	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_05	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
12	12	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
13	13	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_13	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_06	314 (248) / 633 (50.4)	1	22/112 (80.4)	mismatch, identity, unconverted, % converted
15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_09	241 (176) / 536 (55.0)	13	46/93 (50.5)	mismatch, identity, unconverted, % converted
16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_15	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130 (49.2)	unconverted, % converted

Reset **Renew** Show figure Download figure Download methylation status data Download alignment data

Bisulfite sequence information

Sorting conditions (CpH: CpA, CpC, CpT) Conditions to exclude low quality sequences

user specified order number of methylated CpGs Upper limit of unconverted CpGs : 5
 number of unconverted CpGs percent converted CpGs Lower limit of percent converted CpGs : 95.0
 number of mismatches percent identity Upper limit of alignment mismatches : 10
 sequence name Lower limit of percent identity : 90.0

ascending order descending order Reset with new parameters

Reset **Renew** Show figure Download figure Download methylation status data Download alignment data

No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion)
1	1	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_16	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
2	2	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_14	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
3	3	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_13	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
4	4	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_12	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
5	5	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_11	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
6	6	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_10	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
7	7	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_08	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
8	8	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_07	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
9	9	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_05	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131 (98.5)	oooooooooooooooooooo
10	10	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_04	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
11	11	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_03	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	oooooooooooooooooooo
12	12	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131 (99.2)	oooooooooooooooooooo
13	13	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_01	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	oooooooooooooooooooo
14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_15	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130 (49.2)	unconverted, % converted
15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_09	241 (176) / 536 (55.0)	13	46/93 (50.5)	mismatch, identity, unconverted, % converted
16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_06	314 (248) / 633 (50.4)	1	22/112 (80.4)	mismatch, identity, unconverted, % converted

Reset **Renew** Show figure Download figure Download methylation status data Download alignment data

5.6.6. バイサルファイト配列除外条件1

質の低いバイサルファイト配列の除去のためのパラメータが変更できます。値を変更したら、“Reset with new parameters”ボタンをクリックします(並べ替えた順序や、配列の除外/非除外についてもリセットされます)。

- Upper limit of unconversion
 - ✓ バイサルファイト変換で未変換だった CpH(CpA, CpC, CpT)の数の上限です
- Lower limit of percent conversion
 - ✓ バイサルファイト変換効率(“変換された CpH の数/すべての CpH の数”)の下限値です
- Upper limit of alignment mismatch
 - ✓ ゲノム配列とのアライメントでのミスマッチ塩基数(ギャップを含む)の上限です
- Lower limit of percent identity
 - ✓ ゲノム配列とのアライメントでの相同性の下限値です

5.6.7. バイサルファイト配列除外条件2

変更した条件が反映されます。

The screenshot shows the 'Bisulfite sequence information' interface. The 'Conditions to exclude low quality sequences' section has several input fields: 'Upper limit of unconverted CpGs' (1), 'Lower limit of percent converted CpGs' (99), 'Upper limit of alignment mismatches' (1), and 'Lower limit of percent identity' (99). The 'Reset with new parameters' button is circled in pink.

No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (pp) / alignment length (% Identity)	Me-CpG	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion)
1	1	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_10	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	○○○○○○○○○○○○○○○○○○
2	2	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_03	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○○○
3	3	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_14	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○○○
4	4	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_12	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130 (100.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○○●
5	5	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_04	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131 (100.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○○○
6	6	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_16	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131 (99.2)	●○○○○○○○○○○○○○○○○○
7	7	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_08	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131 (100.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○○○
8	8	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_01	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	●○○○○○○○○○○○○○○○○○
9	9	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_07	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	●○○○○○○○○○○○○○○○○○
10	10	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_11	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131 (99.2)	●○○○○○○○○○○○○○○○○○
11	11	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_05	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131 (98.5)	●●○○○○○○○○○○○○○○○○
12	12	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131 (99.2)	●○○○○○○○○○○○○○○○○○
13	13	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_13	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131 (99.2)	●○○○○○○○○○○○○○○○○○
14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_06	114 (248) / 633 (50.4)	1	22/112 (80.4)	mismatch, identity, unconverted, % converted
15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_09	241 (176) / 536 (55.0)	13	46/93 (50.5)	mismatch, identity, unconverted, % converted
16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_15	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130 (49.2)	unconverted, % converted

The screenshot shows the same interface after applying the new parameters. The 'Reset with new parameters' button is circled in pink. The table below shows the updated results.

No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (pp) / alignment length (% Identity)	Me-CpG	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion)
1	1	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_03	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○○○
2	2	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_14	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○○○
3	3	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_04	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131 (100.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○○○
4	4	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_08	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131 (100.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○○○
5	5	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_01	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	●○○○○○○○○○○○○○○○○○
6	6	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_07	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130 (100.0)	●○○○○○○○○○○○○○○○○○
7	7	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_11	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131 (99.2)	●○○○○○○○○○○○○○○○○○
8	8	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131 (99.2)	●○○○○○○○○○○○○○○○○○
9	9	<input type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_13	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131 (99.2)	●○○○○○○○○○○○○○○○○○
10	10	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_06	114 (248) / 633 (50.4)	1	22/112 (80.4)	mismatch, identity, unconverted, % converted
11	11	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_10	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	unconverted, % converted
12	12	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_12	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130 (100.0)	mismatch
13	13	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_09	241 (176) / 536 (55.0)	13	46/93 (50.5)	mismatch, identity, unconverted, % converted
14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_16	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131 (99.2)	mismatch
15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_15	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130 (49.2)	mismatch, unconverted, % converted
16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm0_J1_seq_05	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131 (98.5)	mismatch, unconverted, % converted

5.7. アライメントページ

5.7.1. アライメントページ概要

アライメントページには以下の4つの情報が表示されます。

A) 概要

アライメントに関する各種情報が表示されます

B) ゲノム配列

C) バイサルファイト配列

ゲノム配列とアライメントされなかった領域は薄い色で示されます。

D) アライメント

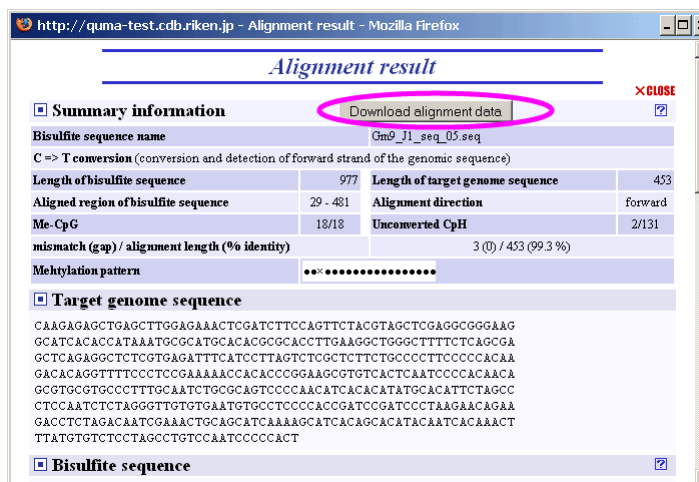
CpG サイトのメチル化されている C、CpG サイトのメチル化されていない C、バイサルファイト変換されなかった C (CpA, CpC, CpT)などは違う色で表示されます。

The screenshot displays the 'Alignment result' page for a CpG island. It is divided into four main sections labeled A, B, C, and D.

- A) Summary information:** A table providing key statistics:

Bi-allelic sequence name	Gdb_11_11q_50.1m		
C → T conversion (conversion and detection of bisulfite strand of the genomic sequence)			
Length of Bi-allelic sequence	511	Length of target genome sequence	401
Aligned region of Bi-allelic sequence	20 - 41	Alignment direction	Forward
Me-CpG	100%	Conserved CpG	24%
mismatch (gap) / alignment length (% identity)	3 (5) / 45 (99.1%)		
Methylation pattern	m: *****		
- B) Target genome sequence:** A block of raw genomic DNA sequence.
- C) Bi-allelic sequence:** A block of DNA sequence where CpG sites are highlighted in light blue to indicate methylation status.
- D) Alignment:** A detailed view of the alignment between the bisulfite-treated sequence and the target genome. It shows the reference sequence, the aligned sequence, and a series of vertical bars indicating the alignment. CpG sites are color-coded: green for methylated (C), red for unmethylated (T), and blue for non-CpG sites (A, G, C, T).

5.7.2. アライメントデータダウンロード
 “Download alignment data”ボタンをクリックすると、このバイサルファイト配列についてのアライメントデータがダウンロードされます。



5.7.3. アライメントデータ
 ダウンロードしたアライメントデータのファイルはテキストエディット(マック)やメモ帳(ウィンドウズ)などのテキストエディタで開くことができます。



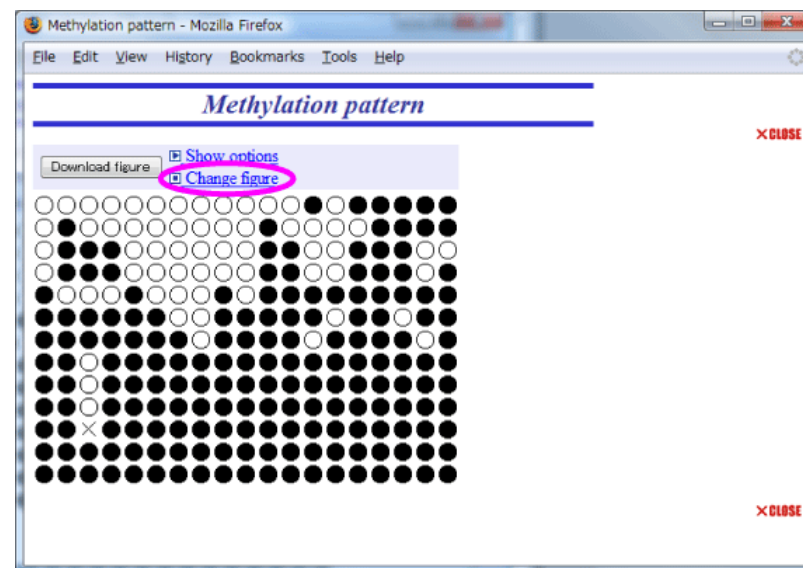
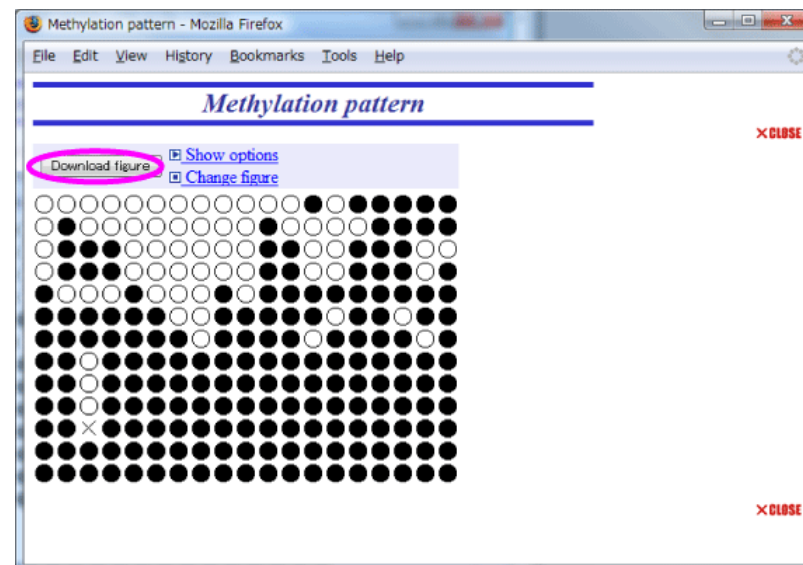
5.8. 図作成ページ

5.8.1. メチル化パターン図のダウンロード

“Download figure”ボタンをクリックすると、メチル化パターンを示す図がダウンロードされます。図の切り替えを行った場合等も表示されている図がダウンロードされます。

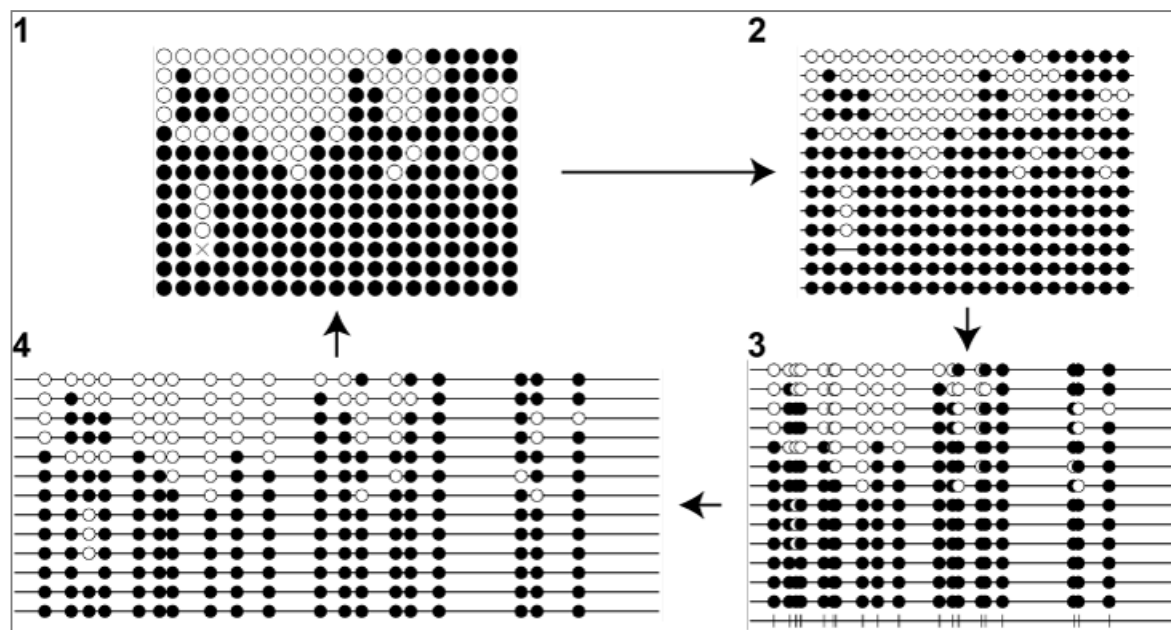
5.8.2. 図の切り替え1

“Change figure”リンクをクリックする度に図の種類が切り替わります。



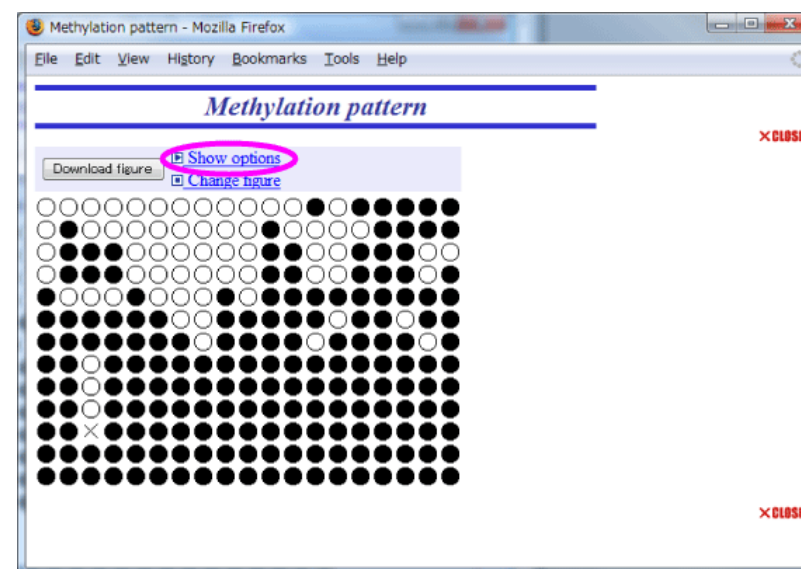
5.8.3. 図の切り替え2

右図の4種類の図が順に表示されます。



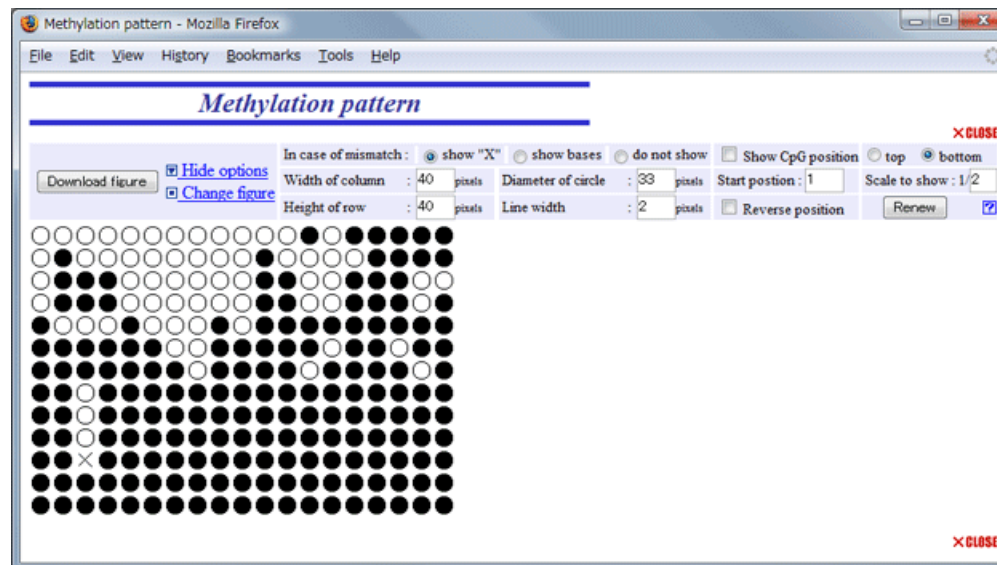
5.8.4. オプションの表示

“Show options”リンクをクリックすると、オプション項目が表示されます。



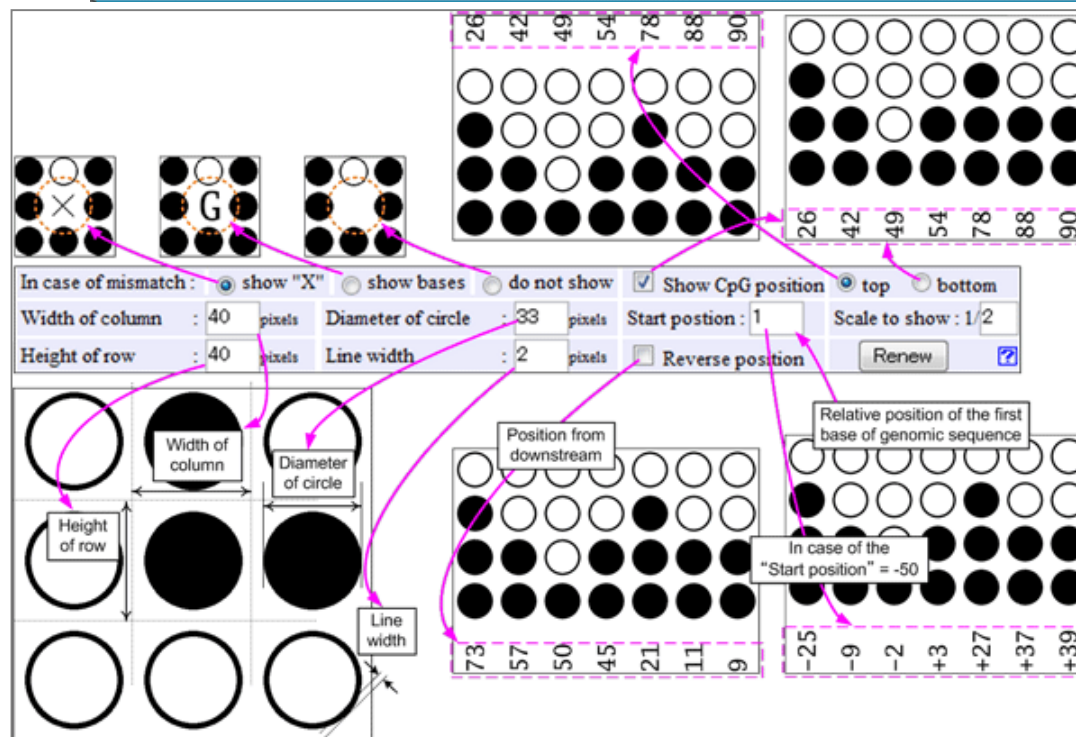
5.8.5. 図の種類1

この図ではゲノム配列上の CpG の位置に関係なく等間隔でメチル化の状態が表示されます。



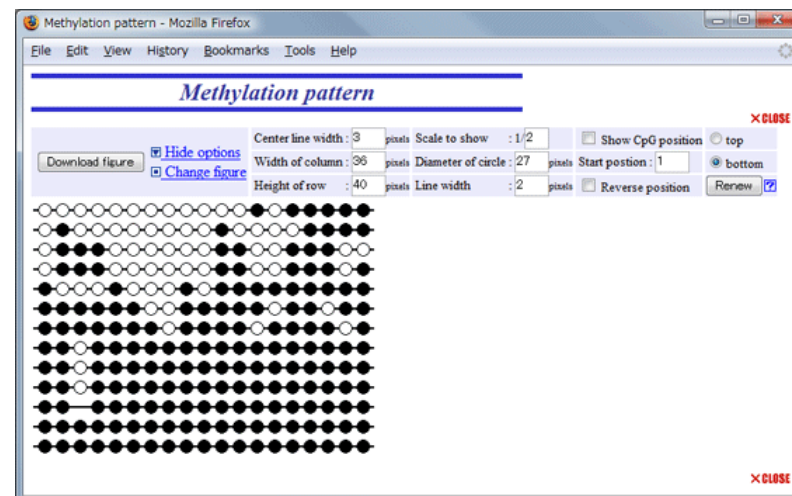
5.8.6. 図の種類1のオプション

各オプションパラメータの意味を右図に示します。また、“Scale to show”は実際の画像のサイズに対して、どれだけの大きさに画面で表示するかを意味します。“Renew”ボタンをクリックすると変更したオプションパラメータが反映されます。



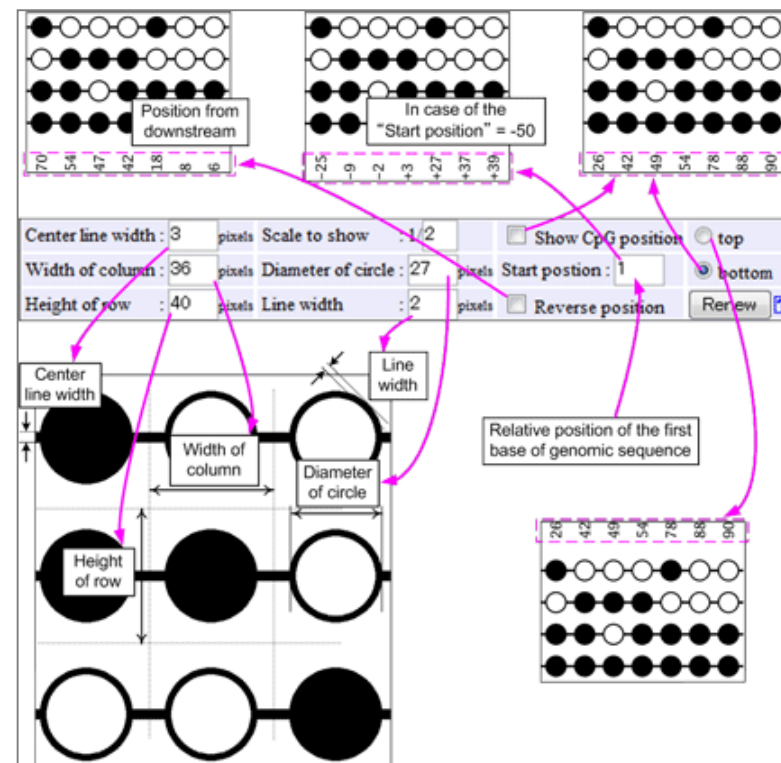
5.8.7. 図の種類2

この図は各パイサルファイト配列ごとに中心線を表示した図で、ゲノム配列上の CpG の位置に関係なく等間隔でメチル化の状態が表示されます。



5.8.8. 図の種類2のオプション

各オプションパラメータの意味を右図に示します。また、“Scale to show”は実際の画像のサイズに対して、どれだけの大きさに画面で表示するかを意味します。“Renew”ボタンをクリックすると変更したオプションパラメータが反映されます。



5.8.9. 図の種類3

この図は、ゲノム配列上の CpG の位置をほぼ正確に反映させた図ですが、CpG が隣接している場合は丸が重なってしまいます (CpG が疎な領域向き)。

5.8.10. 図の種類3のオプション

各オプションパラメータの意味を右図に示します。また、“Scale to show”は実際の画像のサイズに対して、どれだけの大きさに画面で表示するかを意味します。“Renew”ボタンをクリックすると変更したオプションパラメータが反映されます。

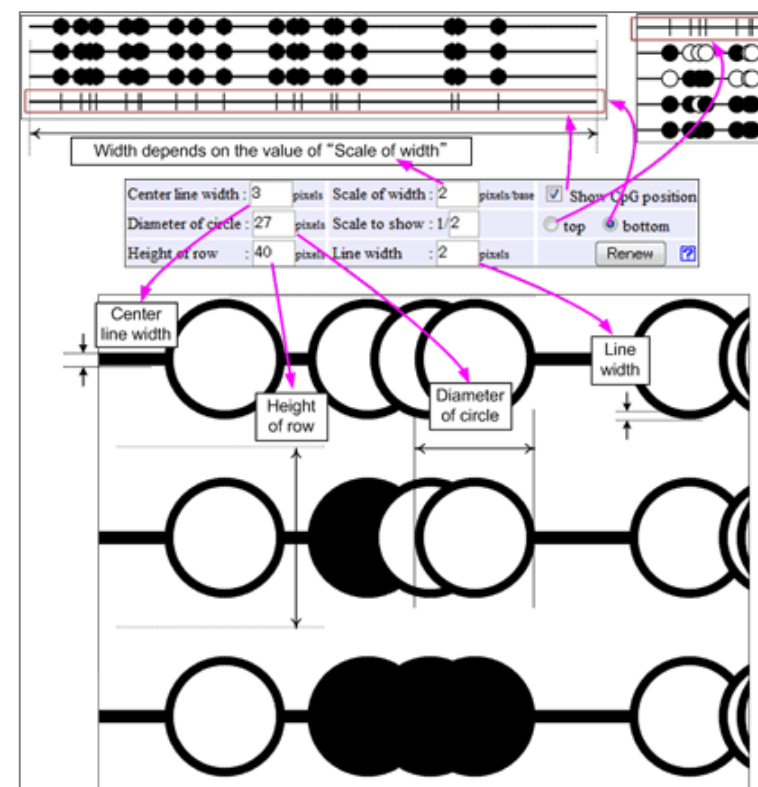
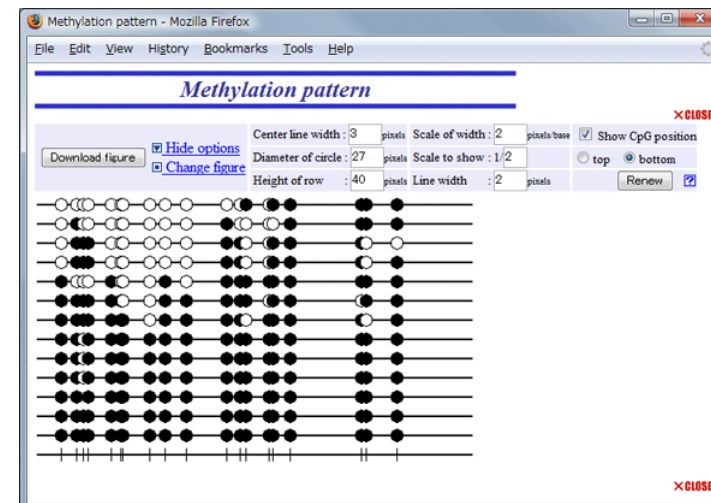
CpG サイトを意味する丸の中心間の間隔は
 (CpG サイトの位置の差) × (“Scale of width”の値)

となり、

Center line の幅は

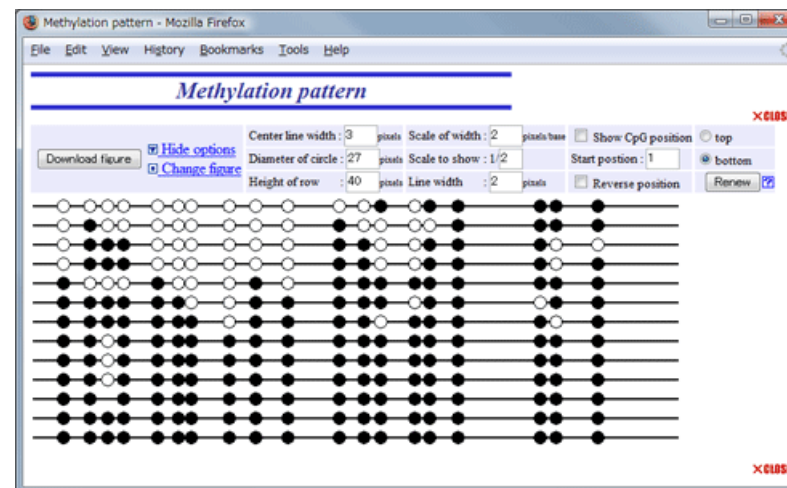
(塩基配列長) × (“Scale of width”の値)

となります。



5.8.11. 図の種類4

この図では、ゲノム配列上の CpG の位置をある程度は反映させていますが、CpG が隣接している場合に重ならないように表示しているため、正確な配置ではありません。



5.8.12. 図の種類4のオプション

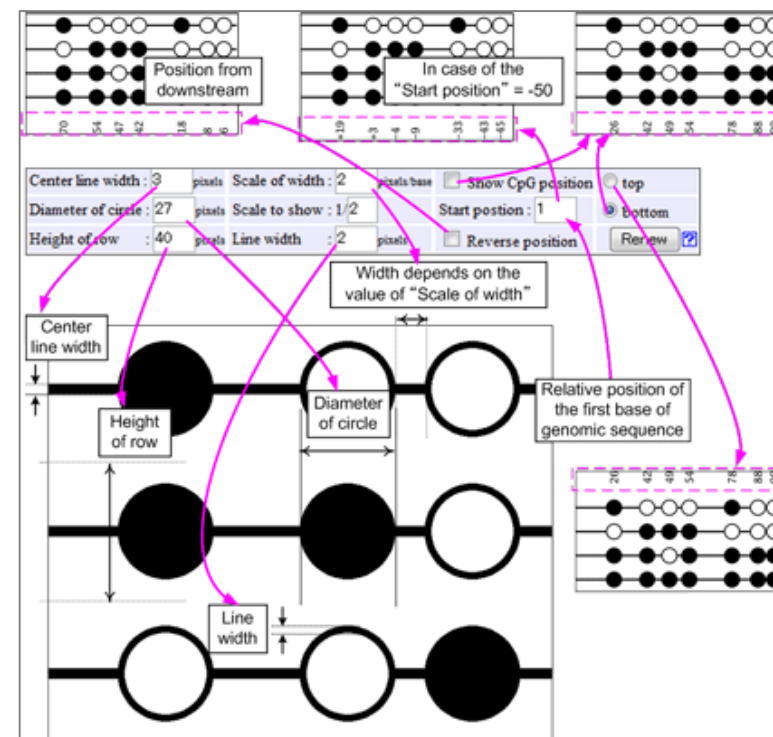
各オプションパラメータの意味を左図に示します。また、“Scale to show”は実際の画像のサイズに対して、どれだけの大きさを画面で表示するかを意味します。“Renew”ボタンをクリックすると変更したオプションパラメータが反映されます。

CpG サイトを意味する丸の間隔(丸自体を含まず)は
 $(\text{CpG サイトの位置の差} - 2) \times (\text{“Scale of width”の値})$

となり、

丸の中心間隔は
 $(\text{CpG サイトの位置の差} - 2) \times (\text{“Scale of width”の値}) + (\text{“Diameter of circle”の値})$

となります。



6. 統計解析モードの使い方

6.1. 画面構成と特徴

QUMA の統計解析モードは右図のような画面構成になっており、メチル化状態解析モードとは以下の違いがあります。

- ゲノム配列と2つのグループのバイサルファイト配列を入力として使用
- メチル化状態比較の概要図を提供
- メチル化パターン図の作成機能は無し
- 各 CpG サイトのメチル化についての 2 つのグループ間での違いの統計的有意性は [9.1. フィッシャーの正確確率検定](#)で調べています
- 全ての CpG サイトを含めたメチル化についての 2 つのグループ間での違いの統計的有意性は [9.2. マン-ホイットニーの U 検定](#)で調べています

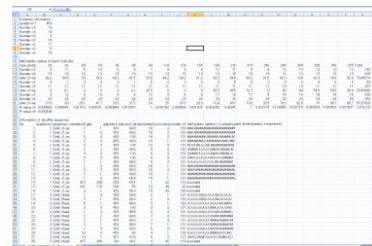
トップページ

ゲノム配列と2つのグループのバイサルファイト配列をアップロードまたはコピー&ペーストするだけ

- ・シーケンサーから出力されたバイサルファイト配列をそのまま使用可能
- ・バイサルファイト配列から、プラスミドベクターの配列を除去する必要なし

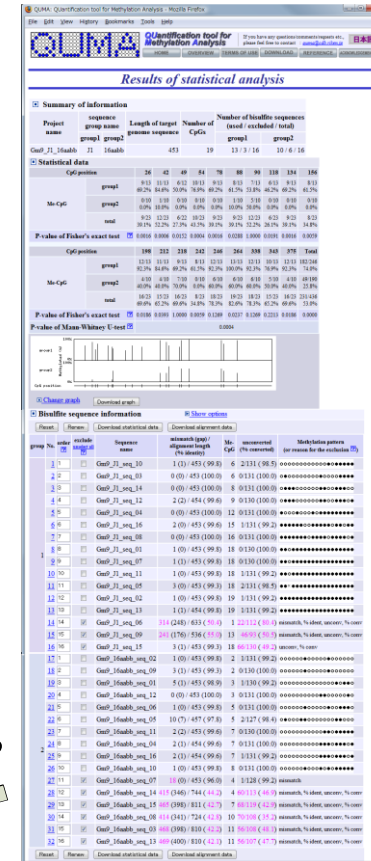


- ・多くの場合数秒で処理
- ・アライメント
- ・配列から余分な部分を除去
- ・配列の品質チェック
- ・メチル化パターンを解析
- ・統計解析

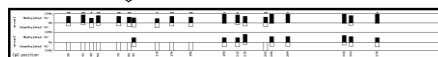


統計解析結果のダウンロード

解析結果



メチル化状態の比較のグラフをダウンロード



アライメント



アライメントの確認
↔
配列の取捨選択

アライメントデータのダウンロード

アライメントデータのダウンロード



6.2. トップページ

6.2.1. オプションの表示

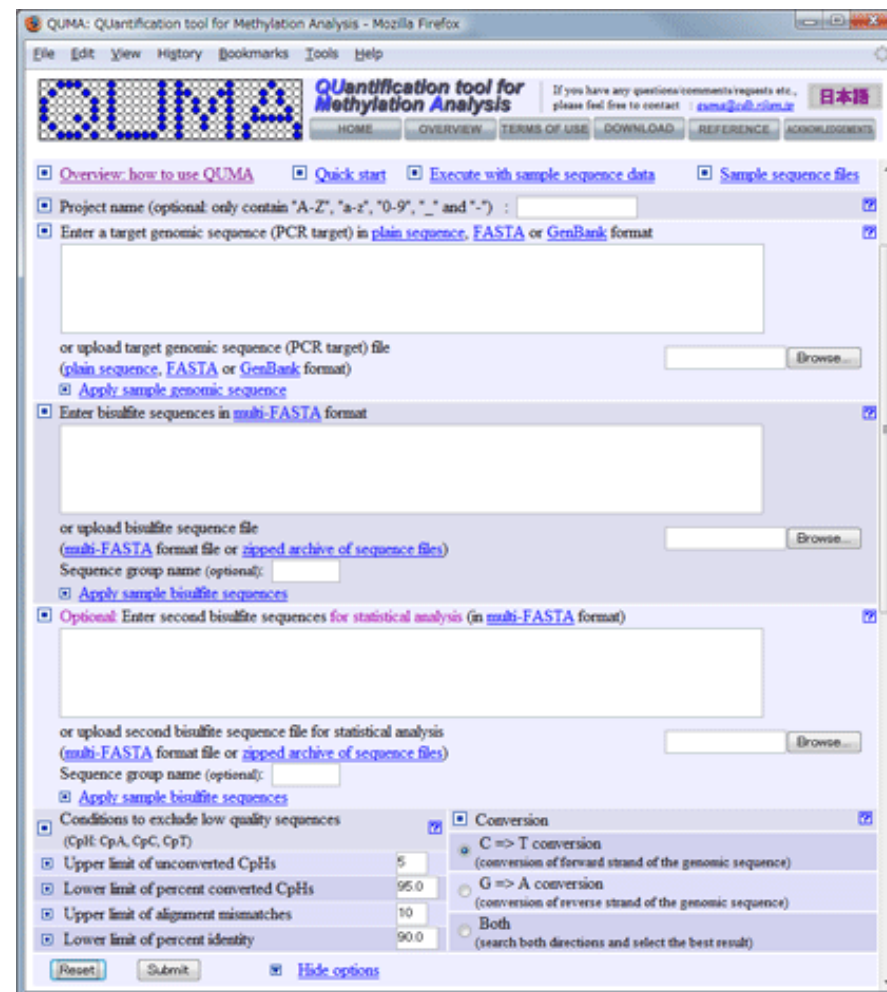
“オプションを表示する”のリンクをクリックしてオプションを表示します。
(下図)



6.2.2. オプション項目

オプションの項目が表示されます。(右図)

ゲノム配列と2つのグループのバイサルファイト配列を入力するための、3つの配列入力フィールドが現れます。



6.2.3. ゲノム配列の入力

プロジェクト名を入力します(オプション)。入力された場合は、解析結果ファイル名等にプロジェクト名が含まれるようになりますので、後でどんなデータかの識別が行いやすくなりますが、空のままでも問題ありません。プロジェクト名には半角の英数字と“-”、“_”以外は使用できません。

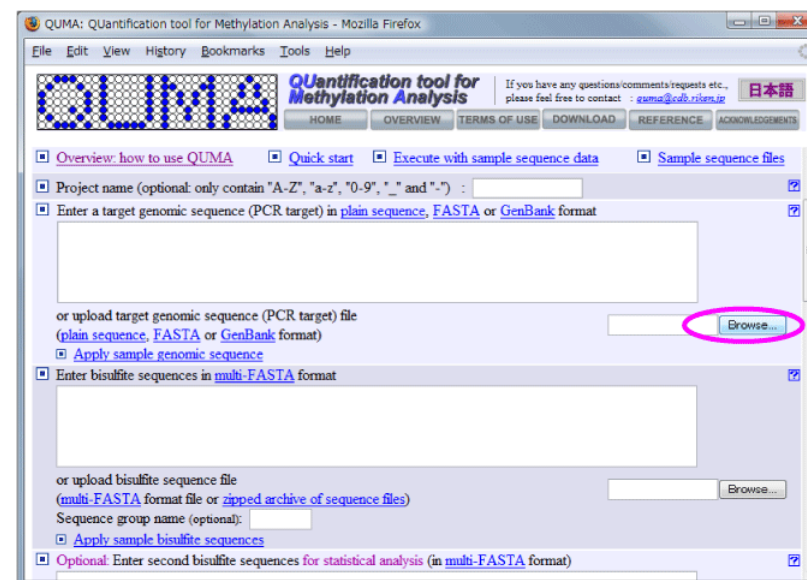
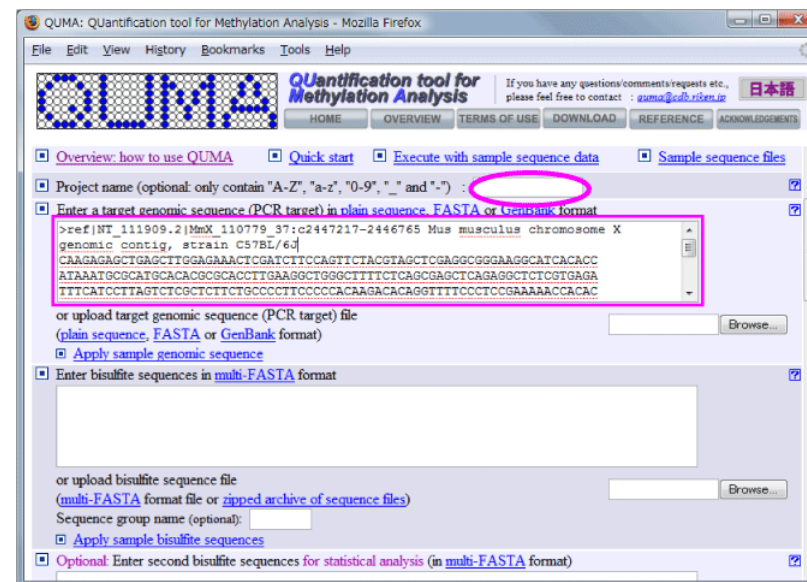
次に、ゲノム配列を入力します。ゲノム配列の入力方法は、①直接入力する方法、②ファイルをアップロードする方法、の2種類の方法があります。

①直接入力する場合は、ゲノム配列をコピー&ペーストなどにより入力します。入力できるゲノム配列の形式は、[8.1. plain sequence 形式](#)、[8.2. FASTA 形式](#)または [8.3. GenBank 形式](#)になります。詳細は「[7.1. ゲノム配列について](#)」をご覧ください。

6.2.4. ゲノム配列ファイルの選択1

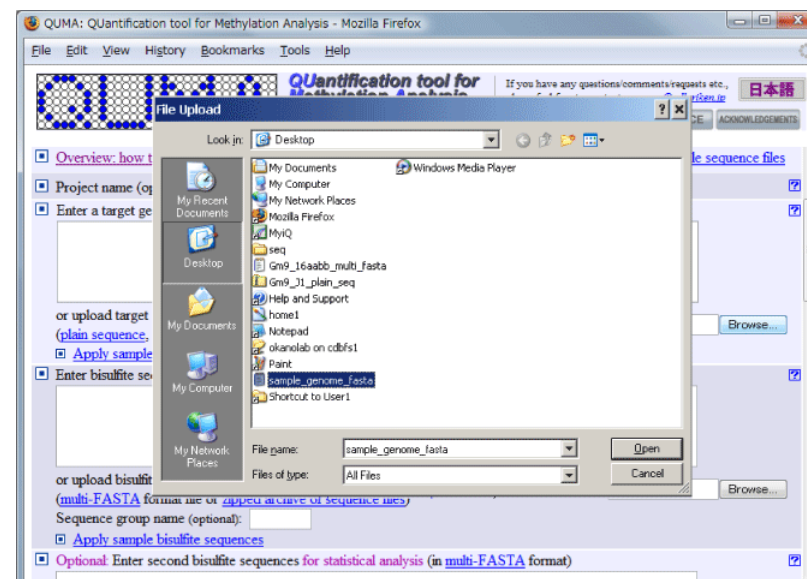
②ファイルをアップロードしてゲノム配列を入力する場合は、アップロードするファイルを選択するために一つ目のボタンをクリックします。

(この画面では“Browse...”ボタンですが、使用するブラウザによって表示が異なります。)



6.2.5. ゲノム配列ファイルの選択2

ファイル選択のためのダイアログが表示されますので、アップロードするゲノム配列ファイルを選択します。使用できるゲノム配列の形式についての詳細は「[7.1. ゲノム配列について](#)」をご覧ください。



6.2.6. バイサルファイト配列1の入力

1つ目のグループのバイサルファイト配列のグループ名を入力します(オプション)。入力された場合は、解析結果ファイル内にグループ名が含まれるようになりますので、後でどんなデータかの識別が行いやすくなりますが、空のままでも問題ありません。

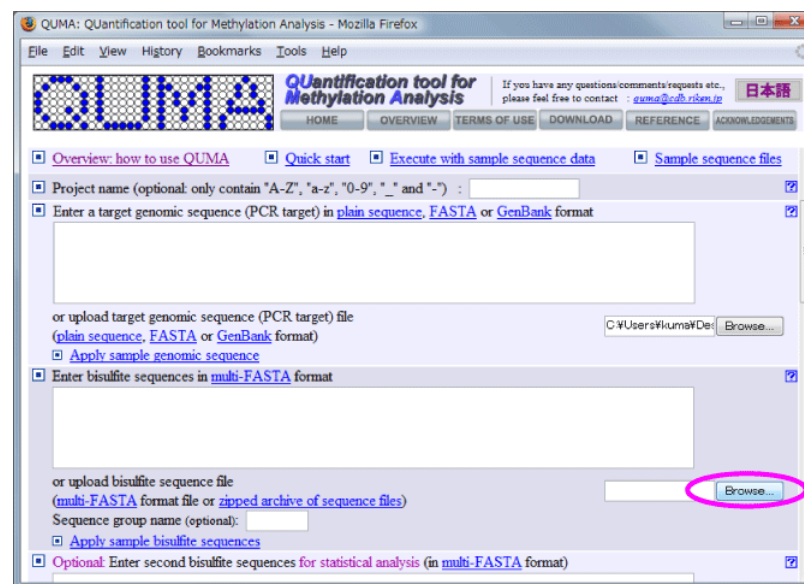
次に、1つ目のグループのバイサルファイト配列を入力します。バイサルファイト配列の入力方法も、①直接入力する方法、②ファイルをアップロードする方法、の2種類の方法があります。

①直接入力する場合は、バイサルファイト配列をコピー & ペーストなどにより入力します。入力できるバイサルファイト配列の形式は、[8.4. Multi-FASTA形式](#)のみです。詳細は「[7.2. バイサルファイト配列について](#)」をご覧ください。



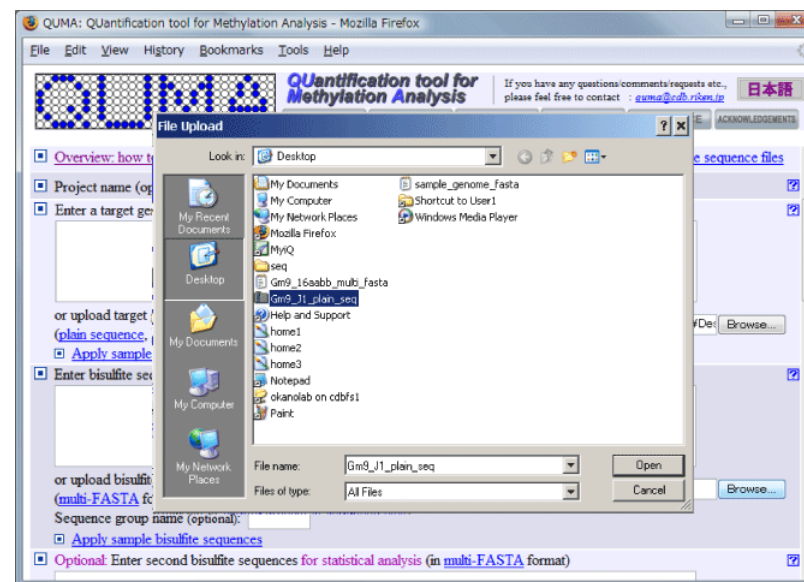
6.2.7. バイサルファイト配列ファイル1の選択1

②ファイルをアップロードして1つ目のグループのバイサルファイト配列を入力する場合は、アップロードするファイルを選択するために二つ目のボタンをクリックします。



6.2.8. バイサルファイト配列ファイル1の選択2

ファイル選択のためのダイアログが表示されますので、アップロードするバイサルファイト配列ファイルを選択します。使用可能なファイル形式は [8.4. Multi-FASTA 形式](#) または [8.5. 配列ファイルが入った zip 形式のアーカイブ \(圧縮フォルダ\)](#) です。使用できるバイサルファイト配列の形式についての詳細は、「[7.2. バイサルファイト配列について](#)」、「[8.6. zip 形式のアーカイブの作成方法 \(マック\)](#)」、「[8.7. zip 形式の圧縮フォルダの作成方法 \(ウィンドウズ\)](#)」をご覧ください。



6.2.9. バイサルファイト配列2の入力

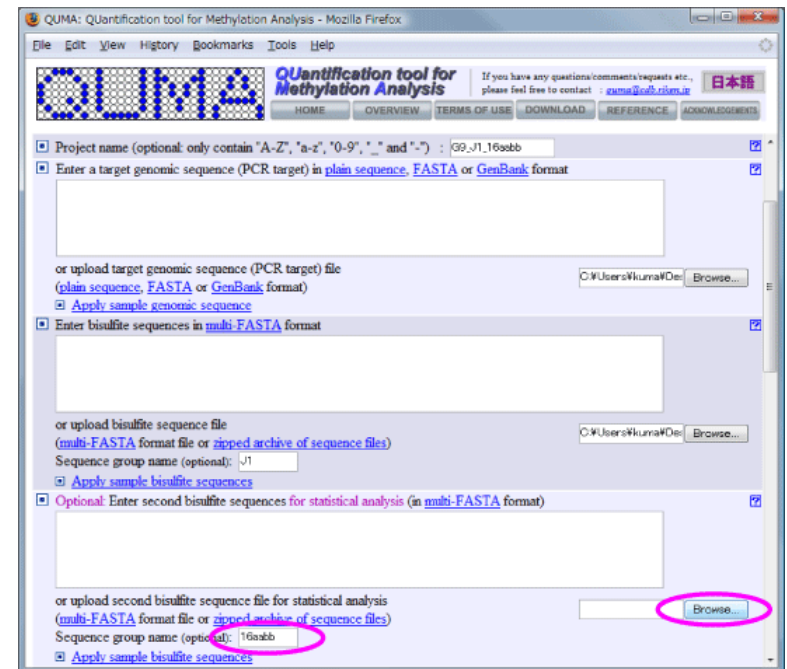
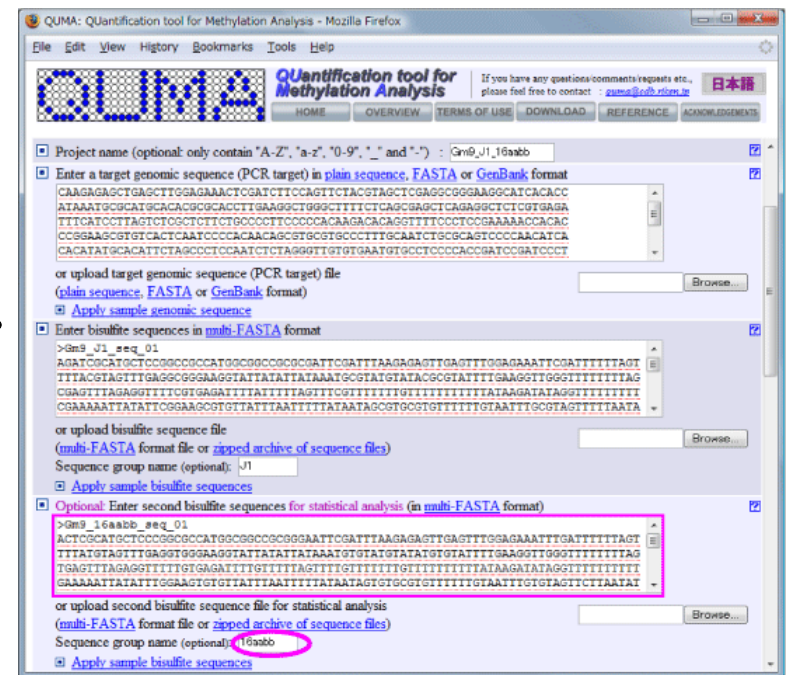
2つ目のグループのバイサルファイト配列のグループ名を入力します(オプション)。次に、2つ目のグループのバイサルファイト配列を入力します。

①直接入力する場合

バイサルファイト配列をコピー & ペーストなどにより入力します。入力できるバイサルファイト配列の形式は、1つ目のバイサルファイト配列と同じです。

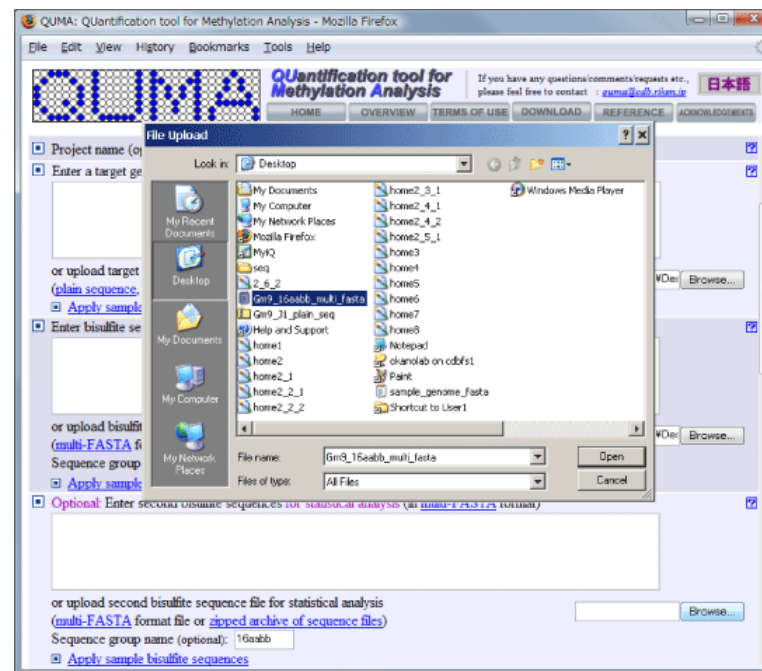
6.2.10. バイサルファイト配列ファイル2の選択1

②ファイルをアップロードして2つ目のグループのバイサルファイト配列を入力する場合は、アップロードするファイルを選択するために三つ目のボタンをクリックします。



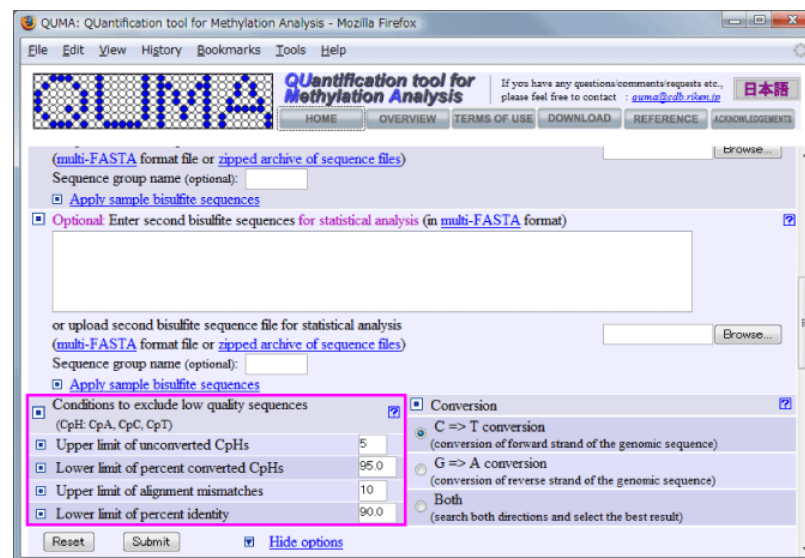
6.2.11. バイサルファイト配列ファイル2の選択2

ファイル選択するためのダイアログが表示されますので、アップロードするバイサルファイト配列ファイルを選択します。使用可能なファイル形式は1つ目のバイサルファイト配列と同様です。



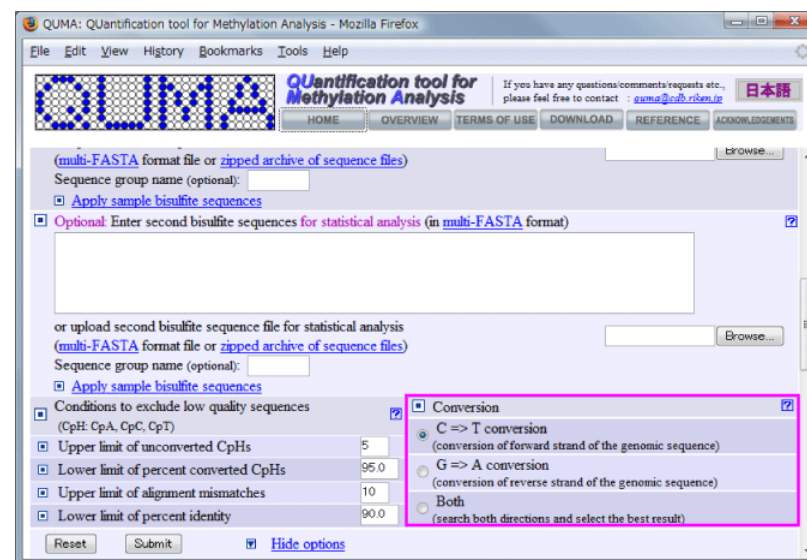
6.2.12. バイサルファイト配列除外条件

- 質の低いバイサルファイト配列の除去のための以下のパラメータを必要に応じて変更して下さい。
 - バイサルファイト変換されなかった塩基の数の上限
 - ✓ 変換されなかった CpH (CpA, CpC, CpT)の数の上限です
- バイサルファイト変換効率の下限 (%)
 - ✓ “変換された CpH の数/すべての CpH の数”の下限値です
- ミスマッチの数の上限
 - ✓ ゲノム配列とのアライメントでのミスマッチ塩基数(ギャップを含む)の上限です
- 相同性の下限 (%)
 - ✓ ゲノム配列とのアライメントでの相同性の下限値です



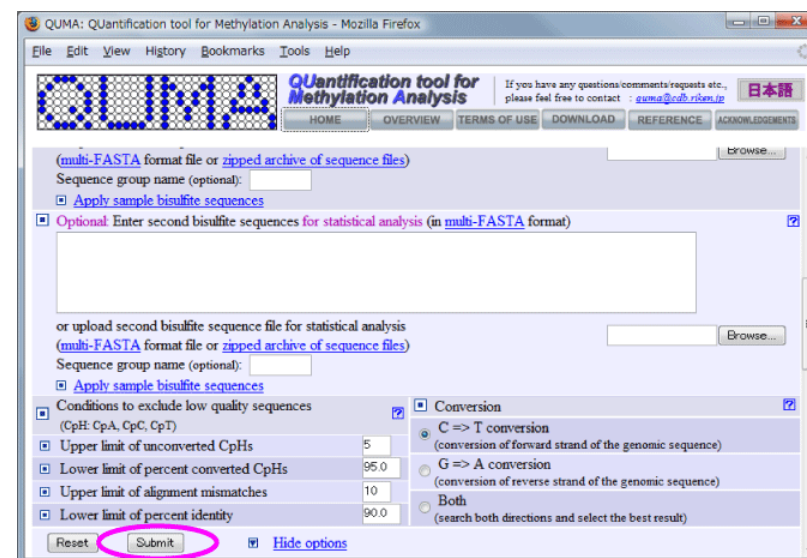
6.2.13. バイサルファイト変換方向

バイサルファイト変換が C=>T, G=>A のどちらの向きか、つまり入力したゲノム配列の forward/reverse 鎖のどちらの鎖がバイサルファイト変換されているとするか(どちらの側の鎖をバイサルファイト PCR で増幅しているか)を指定します。入力したゲノム配列に対してバイサルファイト PCR のプライマーが設計されている場合は“C=>T 変換”になります。ゲノム配列の逆鎖に対して PCR プライマーが設計されている場合は“G=>A 変換”を選択して下さい。“両方”を選択した場合は、両側鎖について解析が行われ、より確からしい結果が自動的に選択されます。



6.2.14. 解析の実行

“実行”ボタンをクリックして解析を開始します。多くの場合、数秒で結果が出ます。



6.3.2. 統計解析結果ページ概要2

A) 概要

ゲノム配列長、CpG サイトの数、入力されたバイサルファイト配列の数、除外されたバイサルファイト配列の数等の情報が示されます。

B) 統計的な情報

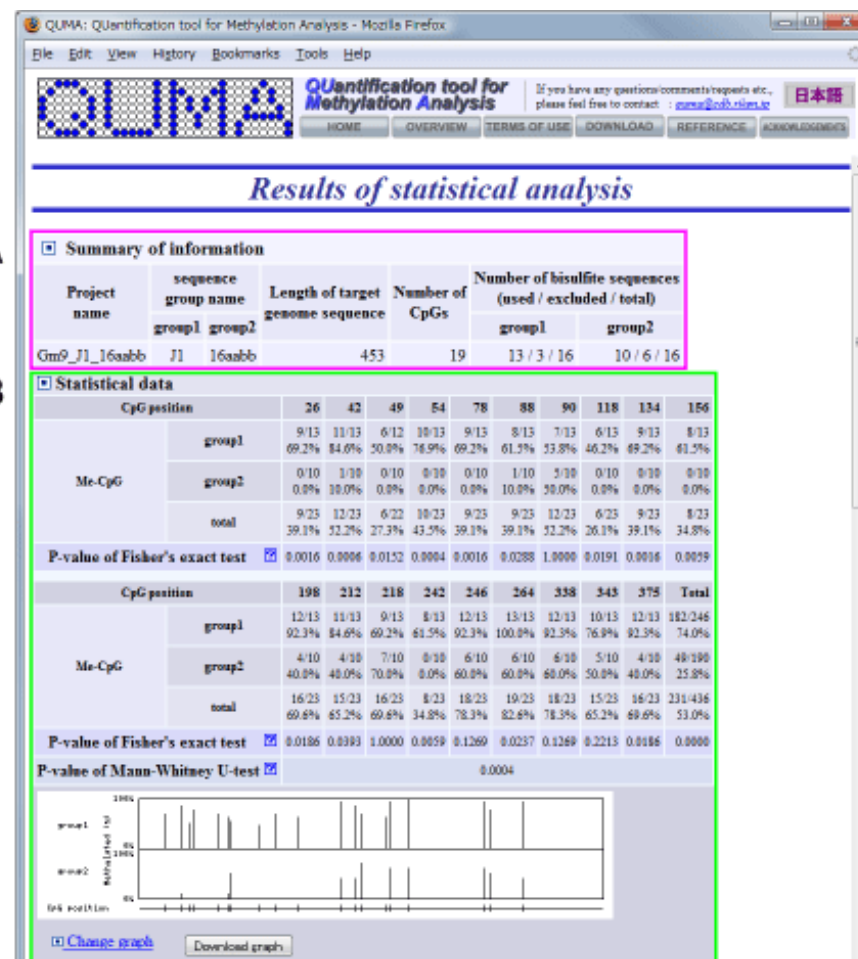
各 CpG サイトについてのメチル化されていた CpG の割合とともに、2つのグループ間でのメチル化の状態の違いの統計的な有意性 (p-value) が示されます。

フィッシャーの正確確率検定: 各 CpG サイトについてのメチル化割合が2つのバイサルファイト配列のグループ間で異なっているかどうかの統計的有意性を、フィッシャーの正確確率検定で求めています。フィッシャーの正確確率検定は2つのカテゴリーのデータが関連しているかどうかを検定するためのノンパラメトリックな統計手法です。(メチル化の偏りが偶然で生じ得る確率が求められます。) 詳細は“[9.1. フィッシャーの正確確率検定](#)”をご覧ください。

マン・ホイットニーの U 検定: 領域全体の CpG のメチル化の割合について、2つのバイサルファイト配列のグループ間で異なっているかどうかの統計的有意性を、マン・ホイットニーの U 検定で求めています。マン・ホイットニーの U 検定は、分布した2群のデータ間の独立性を検定するためのノンパラメトリックな統計手法です。(2群それぞれのメチル化割合の平均値の違いが偶然で生じ得る確率が求められます。) 詳細は“[9.2. マン・ホイットニーの U 検定](#)”をご覧ください。

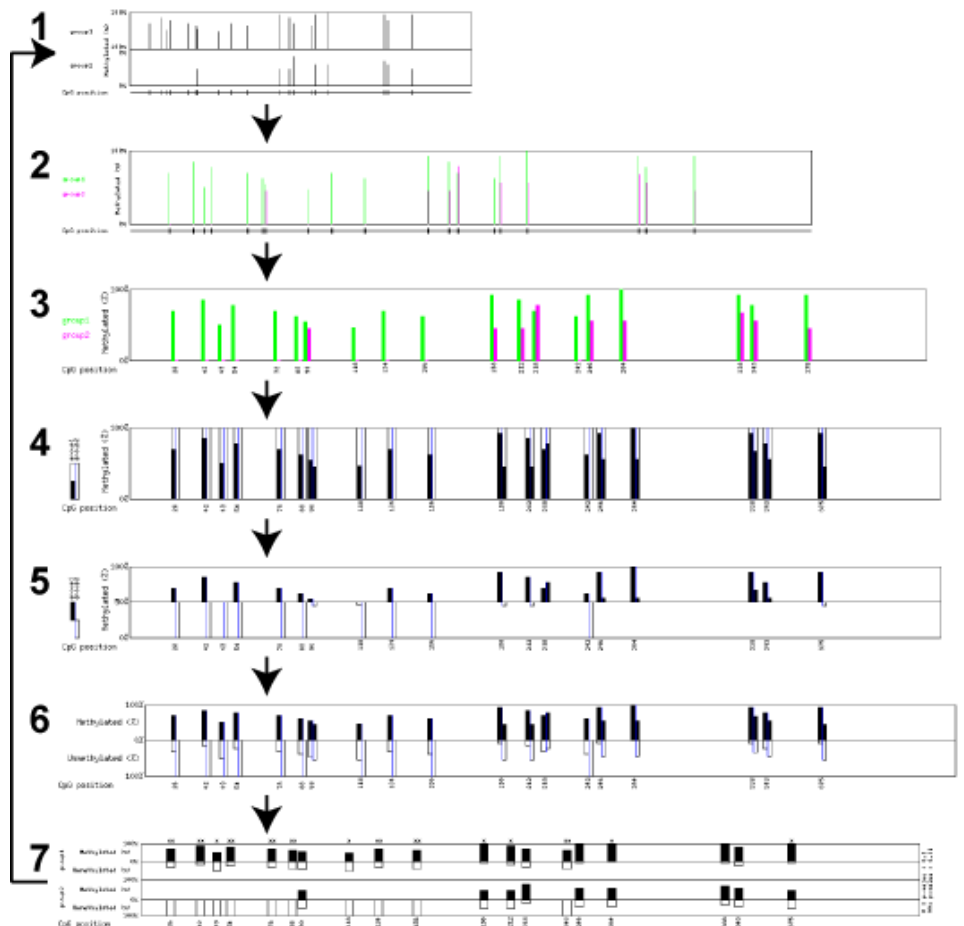
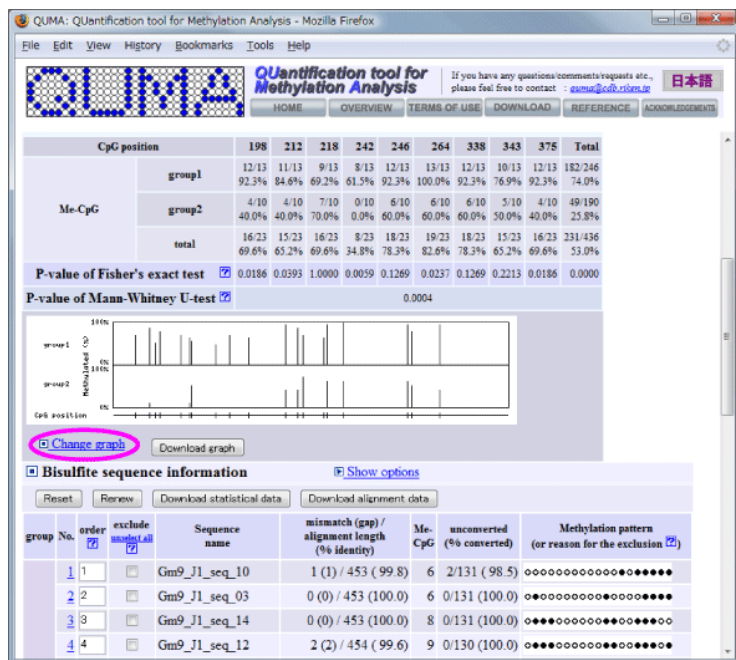
どちらの統計手法でも、メチル化のパターンの違いは考慮されません。また、インプリンティングのようなアレル特異的な DNA メチル化の違いは検出できません。(具体的には、(1)ランダムな 50%のメチル化、(2)0%メチル化と 100%メチル化が半分ずつ、の2群を区別できません。)

また、各 CpG サイトのメチル化の状態を比較した概要図も表示されます。



6.3.3. メチル化状態比較の概要図の切り替え1

メチル化状態比較の概要図は“Change graph”のリンクをクリックすることで切り替えることが可能です。(左下図)



6.3.4. メチル化状態比較の概要図の切り替え2

“Change graph”のリンクをクリックするごとに図が切り替わります。1と2の図は CpG の位置関係をほぼ正確に反映させた図ですが、3-7の図は正確な位置関係を反映させた図ではありません。(右図)

6.3.5. メチル化状態比較の概要図のダウンロード

“Download graph”ボタンをクリックすることでメチル化状態比較の概要図をダウンロードすることができます(その時点で表示されている図がダウンロードされます)。

The screenshot shows the QUMA web interface in a Mozilla Firefox browser. The main content area displays a comparison of methylation states between two groups. The data is presented in a table, a bar chart, and a table of bisulfite sequences.

Me-CpG	group1	group2	total	group1	group2	total	group1	group2	total	
	92.3%	84.6%	69.2%	61.5%	92.3%	100.0%	92.3%	76.9%	92.3%	74.0%
	4/10	4/10	7/10	0/10	6/10	6/10	6/10	5/10	4/10	46/190
	40.0%	40.0%	70.0%	0.0%	60.0%	60.0%	60.0%	50.0%	40.0%	25.8%
	16/23	15/23	16/23	8/23	18/23	19/23	18/23	15/23	16/23	231/406
	69.6%	65.2%	69.6%	34.8%	78.3%	82.6%	78.3%	65.2%	69.6%	53.0%

P-value of Fisher's exact test: 0.0186 0.0393 1.0000 0.0059 0.1269 0.0237 0.1269 0.2213 0.0186 0.0000

P-value of Mann-Whitney U-test: 0.0004

Information of bisulfite sequences:

group	No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG	unconverted CpG (% converted)	Methylation pattern
1	1		<input type="checkbox"/>	Chr9_J1_seq_10.seq	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131 (98.5)	○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
2	2		<input type="checkbox"/>	Chr9_J1_seq_03.seq	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131 (100.0)	●●●●●●●●●●●●●●●●
3	3		<input type="checkbox"/>	Chr9_J1_seq_14.seq	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131 (100.0)	●●●●●●●●○○○○○○○○
4	4		<input type="checkbox"/>	Chr9_J1_seq_17.seq	2 (2) / 454 (99.6)	0	0/130 (100.0)	●●●●●●●●○○○○○○○○

6.3.6. 統計解析結果ページ概要3

C) 各バイサルファイト配列についての情報

バイサルファイト配列はグループごとに分けて表示されます。

1. ゲノム配列とのアライメントでのミスマッチの数、相同性など
2. メチル化されている CpG の数
3. バィサルファイト変換されなかった CpA, CpC, CpT の数
4. CpG のメチル化のパターン(黒丸がメチル化された CpG, 白丸がメチル化されていない CpG)

質が低いと判定されたバイサルファイト配列については、メチル化のパターン(4.)は表示されず、また、条件に引っかかった値が赤紫色で示されます(1.及び3.)。

C **Information of bisulfite sequences** [Show options](#)

Reset Renew Download statistical data **1.** **2.** **3.** **4.**

group	No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap)/ alignment length (% identity)	Me-CpG	unconverted	Methylation pattern
1	1	1	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_10.seq	1 (1) / 453 (99.8)	6	2/131	oooooooooooooooooooo
	2	2	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_03.seq	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131	oooooooooooooooooooo
	3	3	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_14.seq	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131	oooooooooooooooooooo
	4	4	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_12.seq	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130	oooooooooooooooooooo
	5	5	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_04.seq	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131	●ooooooooooooooooooo
	6	6	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_16.seq	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131	●ooooooooooooooooooo
	7	7	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_08.seq	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131	oooooooooooooooooooo
	8	8	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_01.seq	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130	oooooooooooooooooooo
	9	9	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_07.seq	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130	●ooooooooooooooooooo
	10	10	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_11.seq	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131	●ooooooooooooooooooo
	11	11	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_05.seq	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131	●xoooooooooooooooooo
	12	12	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_13.seq	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131	oooooooooooooooooooo
	13	13	<input type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_02.seq	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131	oooooooooooooooooooo
	14	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_06.seq	314 (248) / 633 (30.4)	1	22/112	
	15	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_09.seq	241 (176) / 536 (33.0)	13	46/93	
	16	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_J1_seq_15.seq	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130	
2	17	1	<input type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_02	1 (0) / 453 (99.8)	2	1/131	oooooooooooooooooooo
	18	2	<input type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_09	3 (1) / 453 (99.3)	2	0/130	oooooooooooooooooooo
	19	3	<input type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_01	5 (1) / 453 (98.9)	3	1/130	oooooooooooooooooooo
	20	4	<input type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_12	0 (0) / 453 (100.0)	3	0/131	oooooooooooooooooooo
	21	5	<input type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_06	1 (0) / 453 (99.8)	5	0/131	oooooooooooooooooooo
	22	6	<input type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_11	2 (2) / 453 (99.6)	7	0/130	oooooooooooooooooooo
	23	7	<input type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_04	2 (1) / 454 (99.6)	7	0/131	oooooooooooooooooooo
	24	8	<input type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_16	2 (1) / 454 (99.6)	7	1/131	oooooooooooooooooooo
	25	9	<input type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_10	1 (0) / 453 (99.8)	8	0/131	oooooooooooooooooooo
	26	10	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_07	18 (0) / 453 (96.0)	4	1/128	
	27	11	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_14	415 (346) / 744 (44.2)	4	60/113	
	28	12	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_05	10 (7) / 457 (97.8)	5	2/127	
	29	13	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_15	463 (398) / 811 (42.7)	7	68/119	
	30	14	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_08	414 (341) / 724 (42.8)	10	70/108	
	31	15	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_03	408 (398) / 810 (42.2)	11	36/108	
	32	16	<input checked="" type="checkbox"/>	Gm9_16aabb_seq_13	469 (400) / 810 (42.1)	11	36/107	

Reset Renew Download statistical data Download alignment data

6.3.7. アライメントの表示

数字のリンクをクリックするとアライメントページが開き、ゲノム配列とバイサルファイト配列のアライメント情報が表示されます。アライメントページについては、「[6.5. アライメントページ](#)」で解説されています。

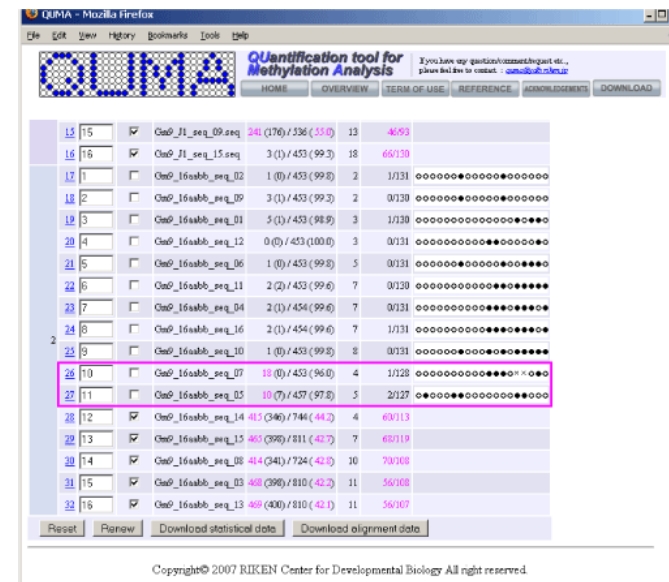
group	No.	order	exclude	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG	unconvrtd	Methylation pattern
	1		<input type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_10.seq	1 (0) / 453 (99.8)	6	2/131	○○○○○○○○○○○○○○○○○○
	2		<input type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_03.seq	0 (0) / 453 (100.0)	6	0/131	●○○○○○○○○○○○○○○○○
	3		<input type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_14.seq	0 (0) / 453 (100.0)	8	0/131	○○○○○○○○○○○○○○○○○○
	4		<input type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_12.seq	2 (2) / 454 (99.6)	9	0/130	●●○○○○○○○○○○○○○○
	5		<input type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_04.seq	0 (0) / 453 (100.0)	12	0/131	●●○○○○○○○○○○○○○○
	6		<input type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_16.seq	2 (0) / 453 (99.6)	15	1/131	●●○○○○○○○○○○○○○○
	7		<input type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_08.seq	0 (0) / 453 (100.0)	16	0/131	●●●●○○○○○○○○○○○○
	8		<input type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_01.seq	1 (0) / 453 (99.8)	18	0/130	●●●●○○○○○○○○○○○○
	9		<input type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_07.seq	1 (1) / 453 (99.8)	18	0/130	●●●●○○○○○○○○○○○○
	10		<input type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_11.seq	1 (0) / 453 (99.8)	18	1/131	●●●●○○○○○○○○○○○○
	11		<input type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_05.seq	3 (0) / 453 (99.3)	18	2/131	●●●●○○○○○○○○○○○○
	12		<input type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_13.seq	1 (1) / 454 (99.8)	19	1/131	●●●●○○○○○○○○○○○○
	13		<input type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_02.seq	1 (0) / 453 (99.8)	19	1/131	●●●●○○○○○○○○○○○○
	14		<input checked="" type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_06.seq	314 (248) / 633 (30.4)	1	22/112	
	15		<input checked="" type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_09.seq	241 (176) / 536 (53.0)	13	46/93	
	16		<input checked="" type="checkbox"/>	Cm0_J1_seq_15.seq	3 (1) / 453 (99.3)	18	66/130	

6.3.8. バイサルファイト配列の除外／非除外1

解析から除外したいバイサルファイト配列がある場合は、“exclude”チェックボックスをチェックします。また、既に除外されているバイサルファイト配列を解析に加える場合は、“exclude”チェックボックスのチェックを外します。そして、“Renew”ボタンをクリックします(二つある“Renew”ボタンのどちらでも構いません)。

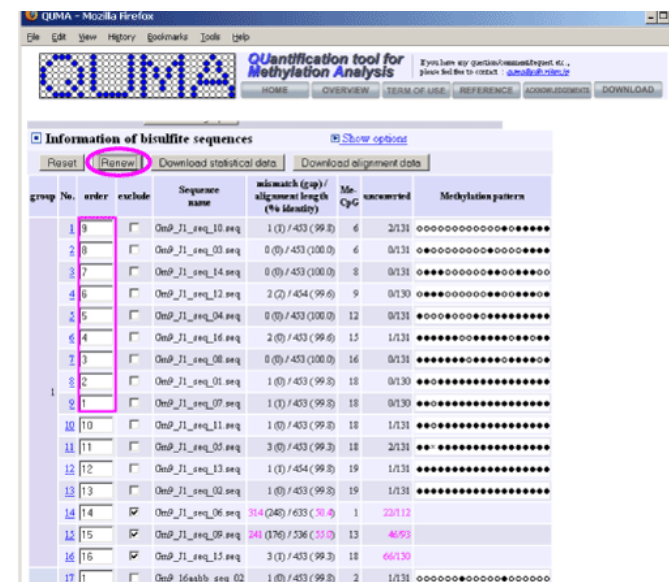
The screenshot shows the QUMA web interface in a Mozilla Firefox browser. The main content is a table of CpG sites with columns for group, No., order, exclude, Sequence name, mismatch (gap) / alignment length (% identity), Me-CpG, unconvrtd, and Methylation pattern. The 'exclude' column has checkboxes, and the 'Me-CpG' column has numerical values. At the bottom, there are buttons for 'Reset', 'Renew', 'Download statistical data', and 'Download alignment data'. The 'Renew' button is circled in red. The copyright notice at the bottom reads: 'Copyright© 2007 RIKEN Center for Developmental Biology All right reserved.'

6.3.9. バイサルファイト配列の除外／非除外2 変更結果が反映されます。



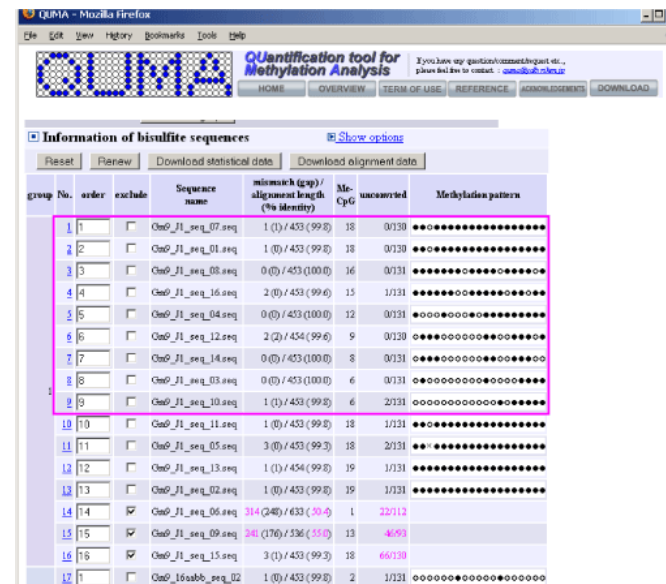
6.3.10. バイサルファイト配列の並べ替え1

並べ替えたい配列の“order”欄の数値を変更します(数値の昇順に並べ替えられます)。そして、“Renew”ボタンをクリックします(二つある“Renew”ボタンのどちらでも構いません)。



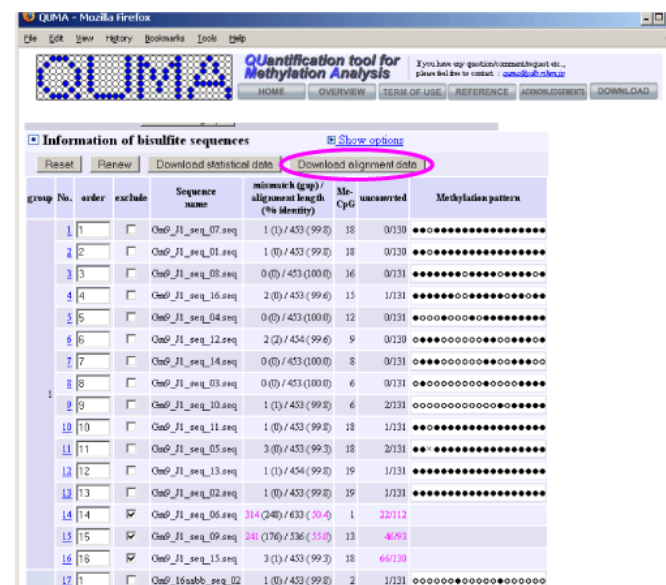
6.3.11. バイサルファイト配列の並べ替え2

並べ替え結果が反映されます。それぞれのバイサルファイト配列のグループは独立して並べ替えられます。



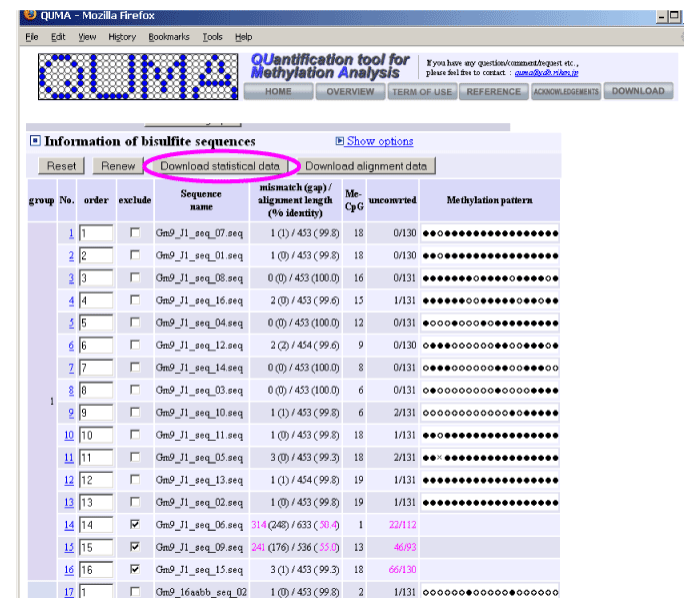
6.3.12. アライメントデータダウンロード

“Download alignment data”ボタンをクリックすると、全バイサルファイト配列についてのアライメントデータがダウンロードされます。



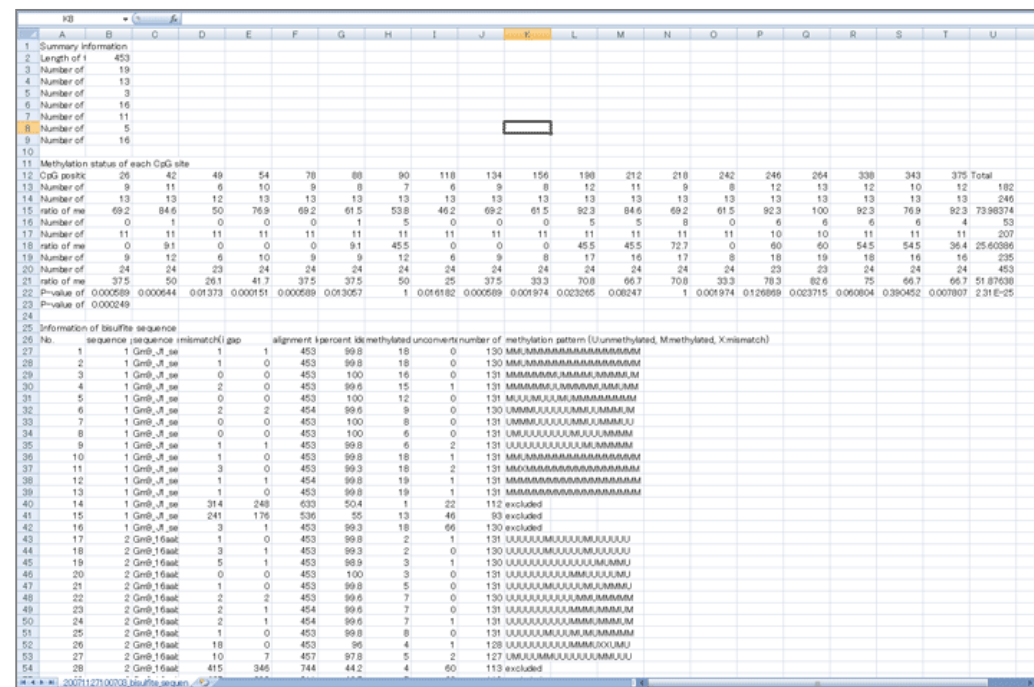
6.3.14. 統計解析結果データダウンロード

“Download statistical data”ボタンをクリックすると、統計解析結果データがダウンロードされます。



6.3.15. 統計解析結果データ

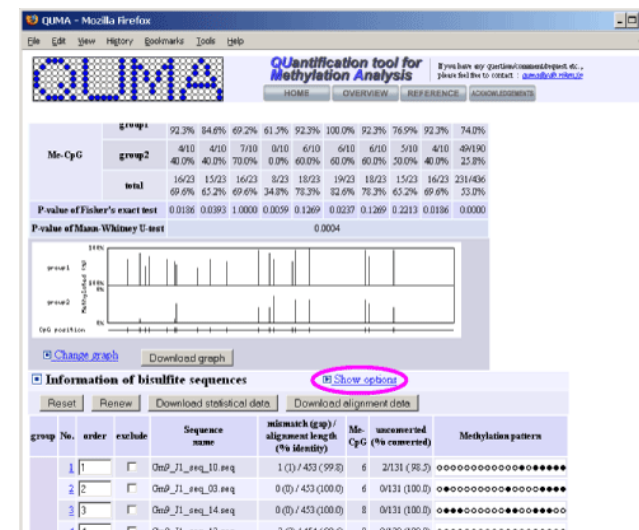
ダウンロードした統計解析結果データのファイルはマイクロソフトエクセルなどで開くことができます (CSVファイル)。



6.4. 統計解析結果ページオプション

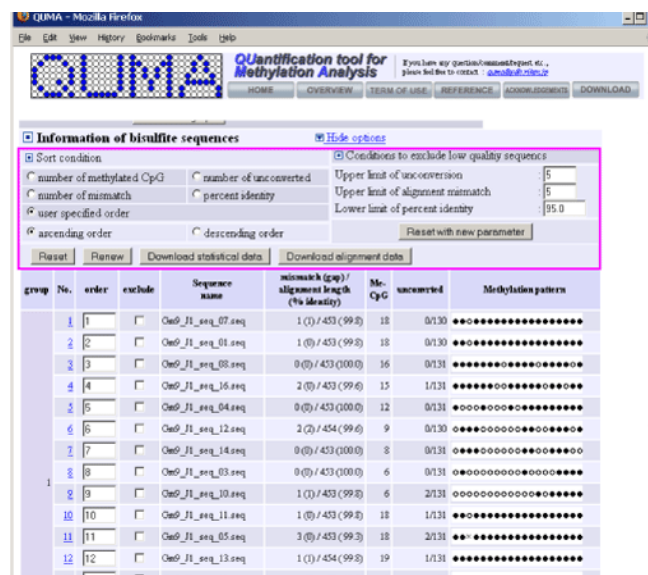
6.4.1. オプションの表示1

オプションを表示するには“Show options”のリンクをクリックします。(右上図)



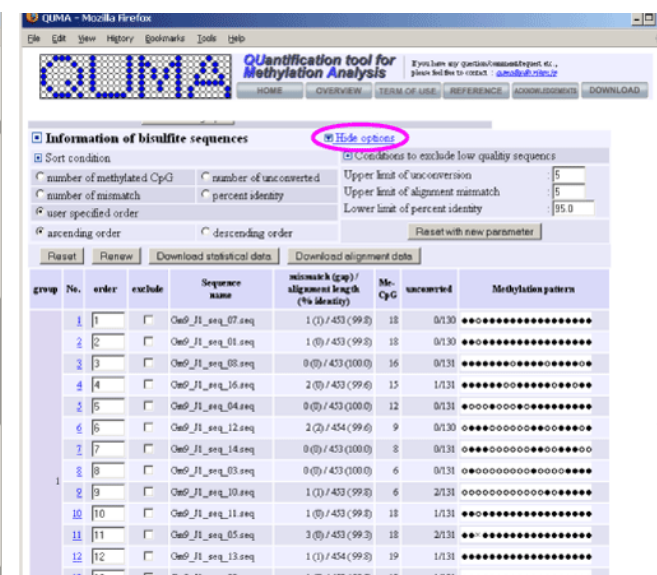
6.4.2. オプションの表示2

オプション項目が表示されます。(左下図)



6.4.3. オプションの非表示

オプション項目を非表示にするには、“Hide options”のリンクをクリックします。(右下図)



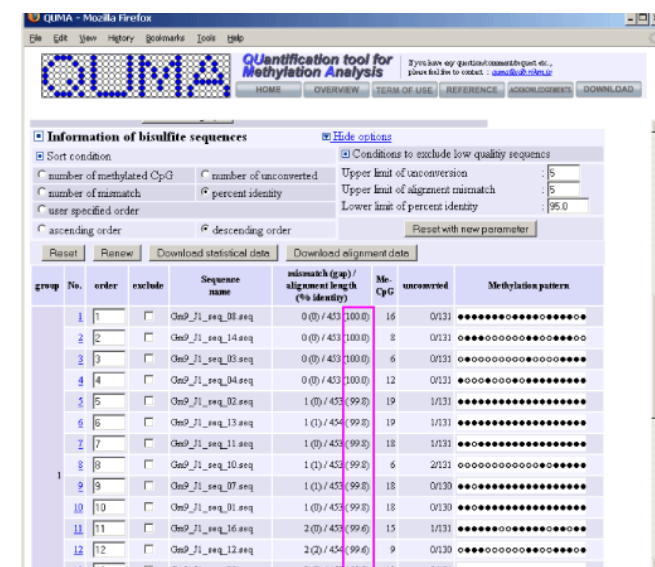
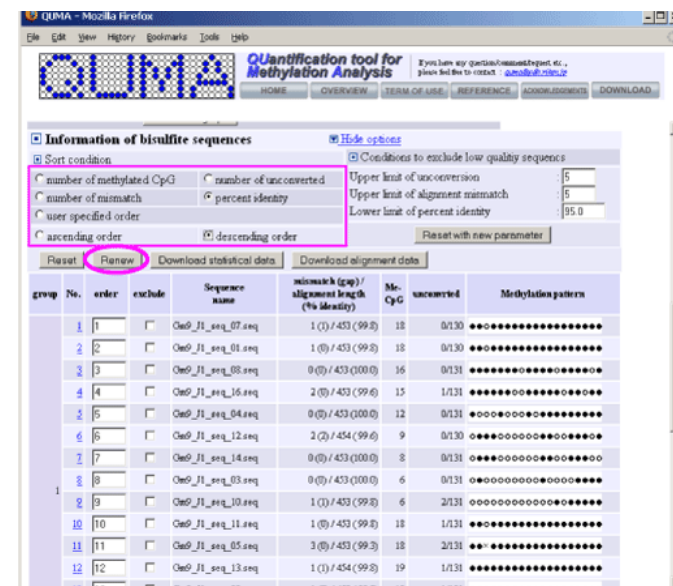
6.4.4. バイサルファイト配列の並べ替え1

色々な値での並べ替えが可能です。並べ替えに用いる項目及び昇順／降順を選びます。画面はアライメントでの相同性の降順で並べ替える例です。次に、“Renew”ボタンをクリックします(二つある“Renew”ボタンのどちらでも構いません)。

- user specified order
 - ✓ “order”欄の数値で並べ替え
- number of methylated CpGs
 - ✓ メチル化されている CpG の数で並べ替え
- number of unconversions
 - ✓ バイサルファイト変換で未変換だった CpH (CpA, CpC, CpT)の数で並べ替え
- percent conversion
 - ✓ バイサルファイト変換効率(“変換された CpH の数/すべての CpH の数”)で並べ替え
- number of mismatches
 - ✓ ゲノム配列とのアライメントでのミスマッチ数で並べ替え
- percent identity
 - ✓ ゲノム配列とのアライメントでの相同性で並べ替え
- ascending order
 - ✓ 値の昇順で並べ替え
- descending order
 - ✓ 値の降順で並べ替え

6.4.5. バイサルファイト配列の並べ替え2

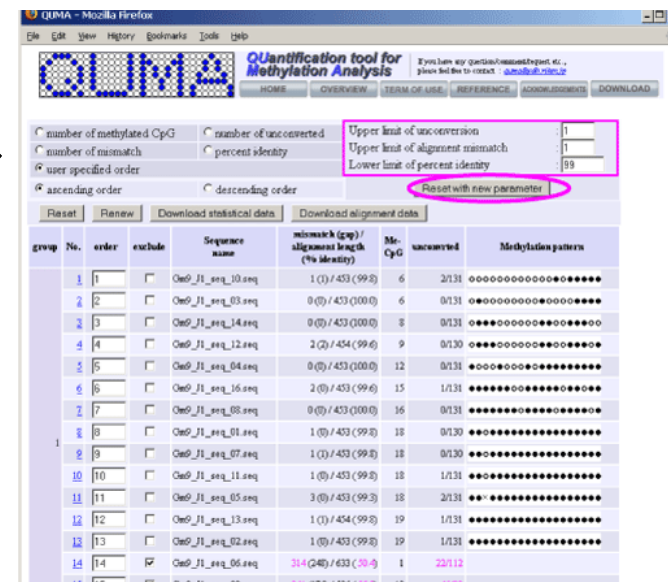
並べ替え結果が反映されます。それぞれのバイサルファイト配列のグループは独立して並べ替えられます。



6.4.6. バイサルファイト配列除外条件1

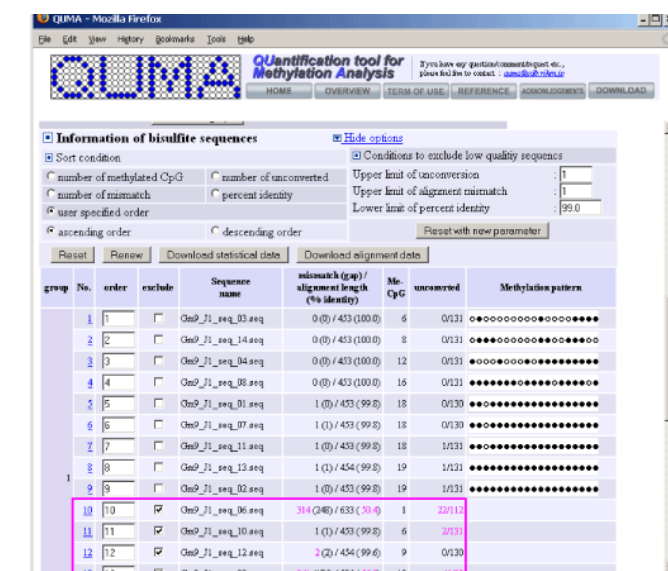
質の低いバイサルファイト配列の除去のためのパラメータが変更できます。値を変更したら、“Reset with new parameters”ボタンをクリックします(並べ替えた順序や、配列の除外/非除外についてもリセットされます)。

- Upper limit of unconversion
 - ✓ バイサルファイト変換で未変換だった CpH(CpA, CpC, CpT)の数の上限です
- Lower limit of percent conversion
 - ✓ バイサルファイト変換効率(“変換された CpH の数/すべての CpH の数”)の下限値です
- Upper limit of alignment mismatch
 - ✓ ゲノム配列とのアライメントでのミスマッチ塩基数(ギャップを含む)の上限です
- Lower limit of percent identity
 - ✓ ゲノム配列とのアライメントでの相同性の下限値です



6.4.7. バイサルファイト配列除外条件2

変更した条件が反映されます。



6.5. アライメントページ

6.5.1. アライメントページ概要

アライメントページには以下の4つの情報が表示されます。

A) 概要

アライメントに関する各種情報が表示されます

B) ゲノム配列

C) バイサルファイト配列

ゲノム配列とアライメントされなかった領域は薄い色で示されます。

D) アライメント

CpG サイトのメチル化されている C、CpG サイトのメチル化されていない C、バイサルファイト変換されなかった C (CpA, CpC, CpT)などは違う色で表示されます。

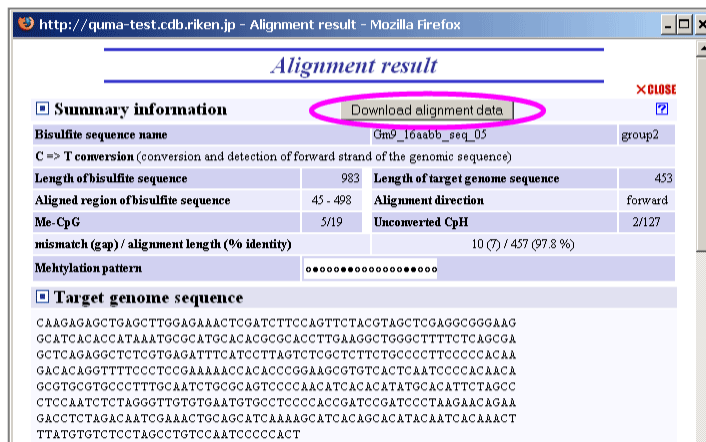
The screenshot displays the 'Alignment result' page with the following sections:

- A) Summary information:** A table showing key metrics:

Reads/sequence name	0x0	0x0
Length of bisulfite sequence	90	411
Aligned region of bisulfite sequence	41 - 90	Aligned direction
File (g)	379	Uncovered (g)
misses (gap) / alignment length (% identity)		0 (0/407 573 N)
- B) Target genome sequence:** A block of DNA sequence text.
- C) Bisulfite sequence:** A block of DNA sequence text where CpG sites are highlighted in light blue.
- D) Alignment:** A detailed view of the alignment between the genome and bisulfite sequences, with mismatches highlighted in red and gaps in blue.

6.5.2. アライメントデータダウンロード

“Download alignment data”ボタンをクリックすると、このバイサルファイト配列についてのアライメントデータがダウンロードされます。



6.5.3. アライメントデータ

ダウンロードしたアライメントデータのファイルはテキストエディット(マック)やメモ帳(ウィンドウズ)などのテキストエディタで開くことができます。



7. 入力配列について

7.1. ゲノム配列について

ファイルを選択してアップロードするか、テキストボックスにゲノム配列をコピー&ペーストで張り付けます ([5.4. 高機能トップページ](#))。ゲノム配列は、バイサルファイトPCRのターゲット領域の配列で、プライマー間のゲノム配列を用いて下さい。また、変換されていない配列でなければなりません(前もって“C”を“T”に変換する必要はありません)。

配列の形式としては、[8.1. plain sequence 形式](#)、[8.2. FASTA 形式](#)または [8.3. GenBank 形式](#)が使用可能です。

アップロードするファイルの形式としては[リッチテキスト形式\(“.rtf”のファイル拡張子\)](#)または[プレーンテキスト形式のテキストファイル](#)のみが使用可能です。例えばマイクロソフトワードのファイルなど[バイナリファイル](#)は使用できません。

リッチテキスト形式のファイルは、マックではテキストエディット、ウィンドウズではワードパッドで作成できます。また、ほとんどのワープロソフトでも保存形式を選択することで作成可能です。プレーンテキスト形式のファイルは、マックではテキストエディット、ウィンドウズではメモ帳で作成可能です。また、一般的なテキストエディタで作成できますし、ほとんどのワープロソフトでも保存形式を選択することで作成可能です。

7.2. バイサルファイト配列について

ファイルを選択してアップロードするか、テキストボックスにゲノム配列をコピー & ペーストで張り付けます ([5.4. 高機能トップページ](#) の場合)。バイサルファイト配列としては、DNA シークエンサーから出力されたファイルをそのまま使用可能で、プラスミドベクターの配列を除去しなくても大丈夫です。

アップロードするファイルとしては、[8.4. Multi-FASTA 形式](#)のバイサルファイト配列のファイルか、[8.5. 配列ファイルが入った zip 形式のアーカイブ\(圧縮フォルダ\)](#)が使用可能です。テキストボックスに張り付けるバイサルファイト配列としては、[8.4. Multi-FASTA 形式](#)の配列が使用可能です。

Multi-FASTA 形式のファイルをアップロードする場合、ファイルの形式としては[リッチテキスト形式\(“.rtf”のファイル拡張子\)](#)または[プレーンテキスト形式のテキストファイル](#)のみが使用可能です。例えばマイクロソフトワードのファイルなど[バイナリファイル](#)は使用できません。

リッチテキスト形式のファイルは、マックではテキストエディット、ウィンドウズではワードパッドで作成できます。また、ほとんどのワープロソフトでも保存形式を選択することで作成可能です。プレーンテキスト形式のファイルは、マックではテキストエディット、ウィンドウズではメモ帳で作成可能です。また、一般的なテキストエディタで作成できますし、ほとんどのワープロソフトでも保存形式を選択することで作成可能です。

8. 配列形式について

8.1. plain sequence 形式

Plain sequence 形式は配列を表す文字と改行のみで構成されます。一つのファイルには一つの配列しか記述できません。

例)

```
CAGTCCGGCAGCGCCGGGGTTAAGCGGCCCAAGTAAACGTAGCGCAGCGA
TCGGCGCCGGAGATTCGCGAACCCGACACTCCGCGCCGCCCGCCGGCCAG
GACCCGCGGGCGGATCGCGGCGCCGCGCTACAGCCAGCCTCACTGGCGCG
CGGGCGAGCGCACGGGCGCTC
```

8.2. FASTA 形式

FASTA 形式の配列は行頭が(">") で始まるコメントの行があり、その次の行以降に配列が記述されます。

[FASTA 形式についての詳細な説明 \(英語版 Wikipedia\)](#)

例)

```
>Dnmt3a partial sequence
ACTCCCGTGC GCGCCCGGCCGTAGCGTCCTCGTCGCCGCCCTCGTCT
CGCAGCCG CAGCCCGGTGGACGCTCTCGCCTGAGCGCCGCGGACTAGCC
CGGGTGGCCACTGGCGCGGGCGAGCGCACGGGCGCTCCAGTCCGGCA
GCGCCGGGGTTAAGCGGCCAAGTAAACGTAGCGCAGCGATCGGCGCCGG
AGATTCGCGAACCCGACACTCCGCGCCGCCCGCCGGCCAGGACCCGCGGC
GCGATCGCGGCGCCGCGCTACAGCCAGCCTCACGACAGGCCCGCTGAGGC
TTGTGCCAGACCTTGAAAACCTCAGGTATATACCTTTCCAGACGCGGGAT
CTCCCTCCCCATCCATAGTGCCTTGGGACCAAATCCAGGGCCTTCTTT
CAGGAAACAATGAAGGGAGACAGCAGACATCTGAATGAAGAAGAGGGTGC
CAGCGGGTATGAGGAGTGCATTATCGTTAATGGGAACTTCACTGACCAGT
CCTCAGACACGAAGGATGCTCCCTCACCCCACTCTTGGAGGCAATCTGC
ACAGAGCCAGTCTGCACACC
```

8.3. GenBank 形式

GenBank 形式(または GenBank Flat File 形式) は行頭の“LOCUS”から始まるアノテーション部分と、行頭の“ORIGIN”から始まる配列部分で構成されており、アノテーション部分の次に配列部分が続き、その後の“//”のみの行によって、一つの配列のエントリが終わりになります。

[GenBank 形式についての NCBI による詳細な説明 \(英語\)](#)

```

例)
LOCUS           AF068625                200 bp   mRNA   linear   ROD 06-DEC-1999
DEFINITION     Mus musculus DNA cytosine-5 methyltransferase 3A (Dnmt3a) mRNA,
               complete cds.
ACCESSION     AF068625 REGION: 1..200
VERSION       AF068625.2   GI:6449467
KEYWORDS      .
SOURCE        Mus musculus (house mouse)
ORGANISM      Mus musculus
               Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
               Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia;
               Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Mus.
REFERENCE     1 (bases 1 to 200)
AUTHORS       Okano, M., Xie, S. and Li, E.
TITLE         Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA
               (cytosine-5) methyltransferases
JOURNAL       Nat. Genet. 19 (3), 219-220 (1998)
PUBMED        9662389
REFERENCE     2 (bases 1 to 200)
AUTHORS       Xie, S., Okano, M. and Li, E.
TITLE         Direct Submission
JOURNAL       Submitted (28-MAY-1998) CVRC, Mass. Gen. Hospital, 149 13th Street,
               Charlestown, MA 02129, USA
REFERENCE     3 (bases 1 to 200)
AUTHORS       Okano, M., Chijiwa, T., Sasaki, H. and Li, E.
TITLE         Direct Submission
JOURNAL       Submitted (04-NOV-1999) CVRC, Mass. Gen. Hospital, 149 13th Street,
               Charlestown, MA 02129, USA
REMARK        Sequence update by submitter
COMMENT       On Nov 18, 1999 this sequence version replaced gi:3327977.
FEATURES      Location/Qualifiers
               source                1..200
                                   /organism="Mus musculus"
                                   /mol_type="mRNA"
                                   /db_xref="taxon:10090"
                                   /chromosome="12"
                                   /map="4.0 cM"
               gene                1..>200
                                   /gene="Dnmt3a"
ORIGIN
1  gaattccggc ctgctgccgg gccgccgac ccgccggcc acacggcaga gccgcctgaa
61  gccagcgct gaggctgcac ttttccgagg gottgacatc agggctctatg tttaagtctt
121 agctcttgct tacaaagacc acggcaattc cttctctgaa gcctcgcag cccacagcg
181 ccctcgcagc cccagcctgc

//

```

8.4. Multi-FASTA 形式

Multi-FASTA 形式は複数の [8.2. FASTA 形式](#) の配列によって構成されます。

例)

>sequence1

```
ACTCCCCGTGCGCGCCCGGCCCGTAGCGTCCTCGTCGCCGCCCTCGTCTCGCAGCCGCA  
GCCCGCGTGGACGCTCTCGCCTGAGCGCCGCGGACTAGCCCGGGTGGCC
```

>sequence2

```
CAGTCCGGCAGCGCCGGGGTTAAGCGGCCCAAGTAAACGTAGCGCAGCGATCGGCGCCGG  
AGATTCGCGAACCCGACACTCCGCGCCGCCCGCCGGCCAGGACCCGCGGCGCGATCGCGG  
CGCCGCGCTACAGCCAGCCTCACTGGCGCGCGGGCGAGCGCACGGGCGCTC
```

>sequence3

```
CACGACAGGCCCGCTGAGGCTTGTGCCAGACCTTGAAACCTCAGGTATATACCTTTCCA  
GACGCGGGATCTCCCCTCCCC
```

>sequence4

```
CAGCAGACATCTGAATGAAGAAGAGGGTGCCAGCGGGTATGAGGAGTGCATTATCGTTAA  
TGGGAACCTTCAGTGACCAGTCCTCAGACACGAAGGATGCTCCCTCACCCCAGTCTTGGA  
GGCAATCTGCACAGAGCCAGTCTGCACACC
```

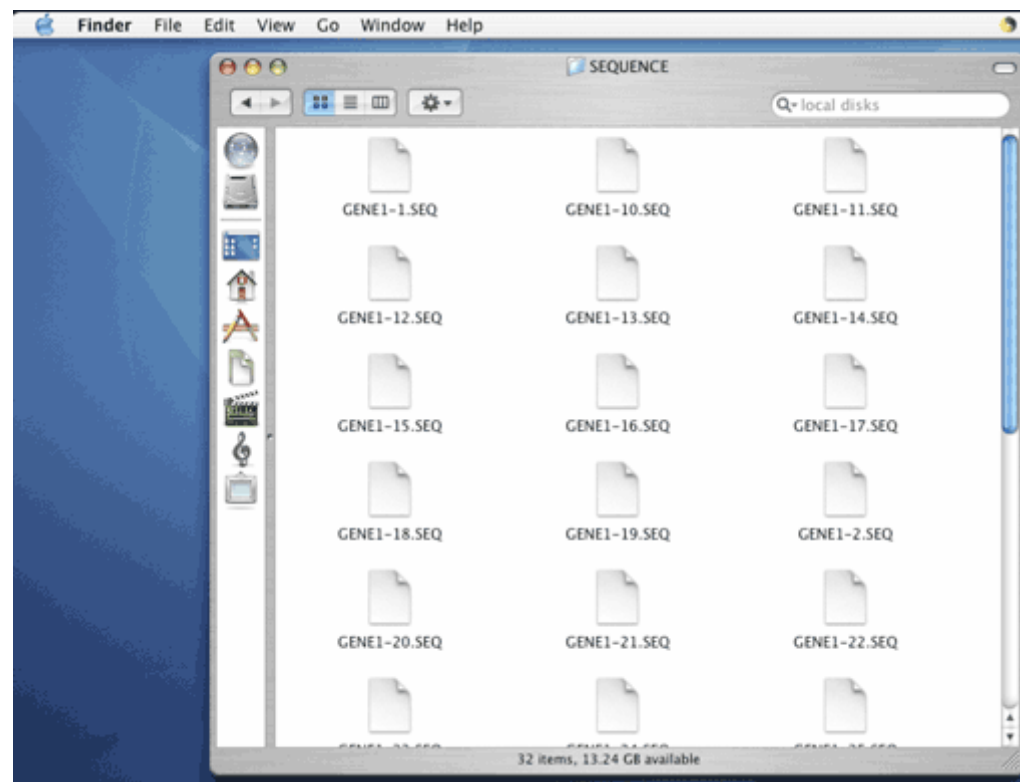
8.5. 配列ファイルが入った zip 形式のアーカイブ(圧縮フォルダ)

zip 形式のアーカイブとしては、[8.2. FASTA 形式](#)または [8.1. plain sequence 形式](#)の配列ファイルが入った一つのフォルダをアーカイブにしたものが使用可能です。配列ファイルの拡張子としては、".seq", ".fa", ".fas", ".fasta"または".txt"が使用可能です。

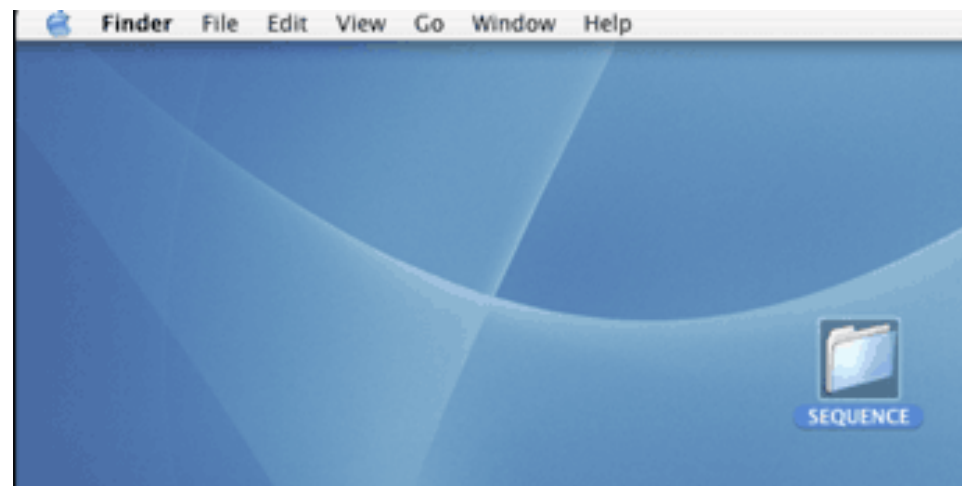
8.6. zip 形式のアーカイブの作成方法(マック)

8.6.1. マック OS X 10.3 以降の場合

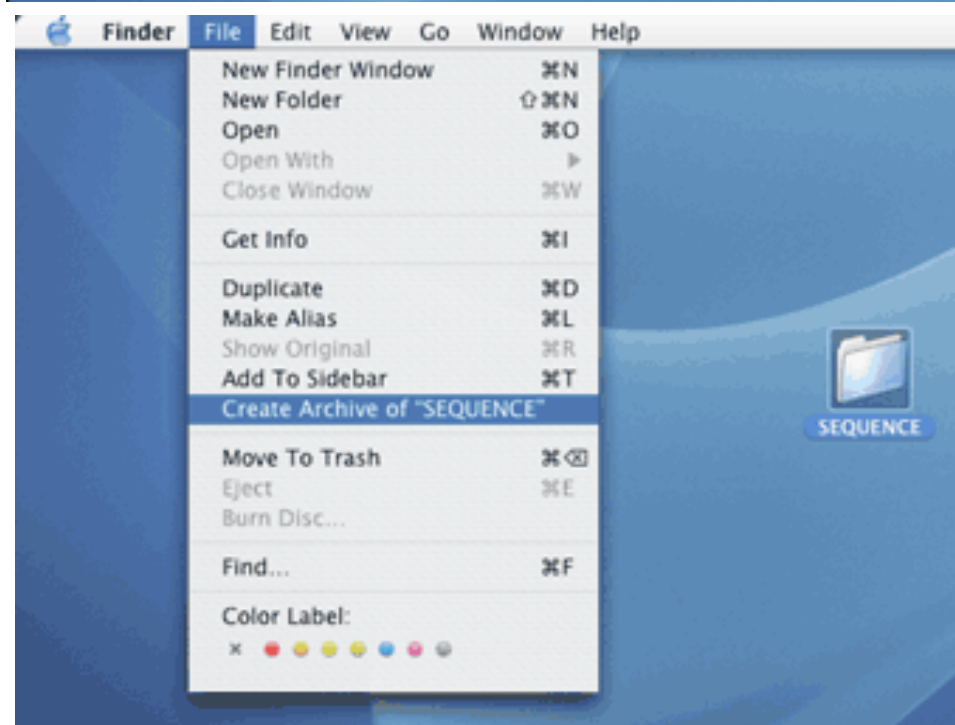
1. [8.2. FASTA 形式](#)または [8.1. plain sequence 形式](#)のバイサルファイト配列のファイルをフォルダに入れます(配列ファイルの拡張子としては".seq", ".fa", ".fas", ".fasta"または".txt"が使用可能)



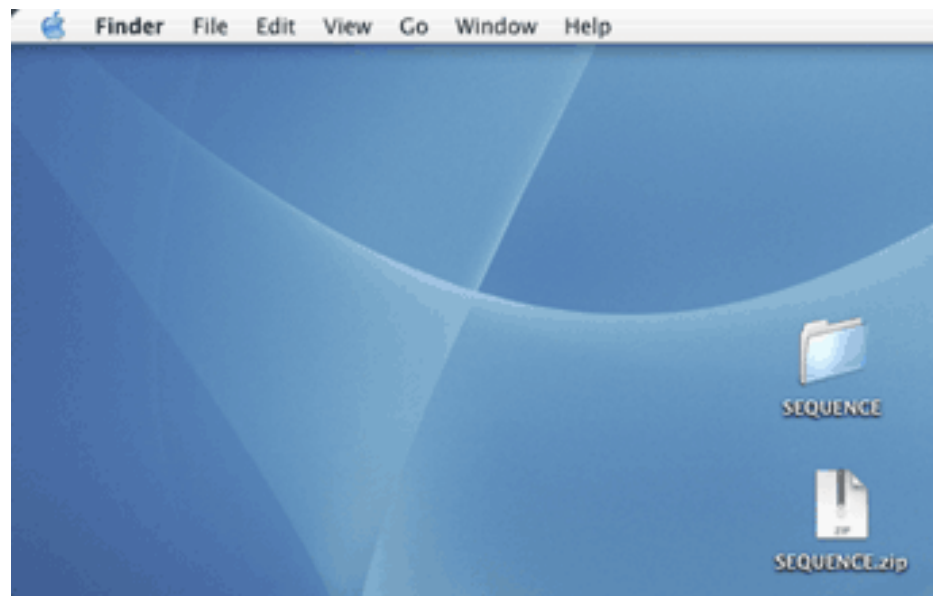
2. フォルダをクリックして選択し



3. Finder ツールバーの“ファイル”メニューから“フォルダ名のアーカイブを作成”を選択します



4. “.zip”の拡張子を持つ zip 形式のアーカイブが、元のフォルダの近くの場所に自動的に現れます



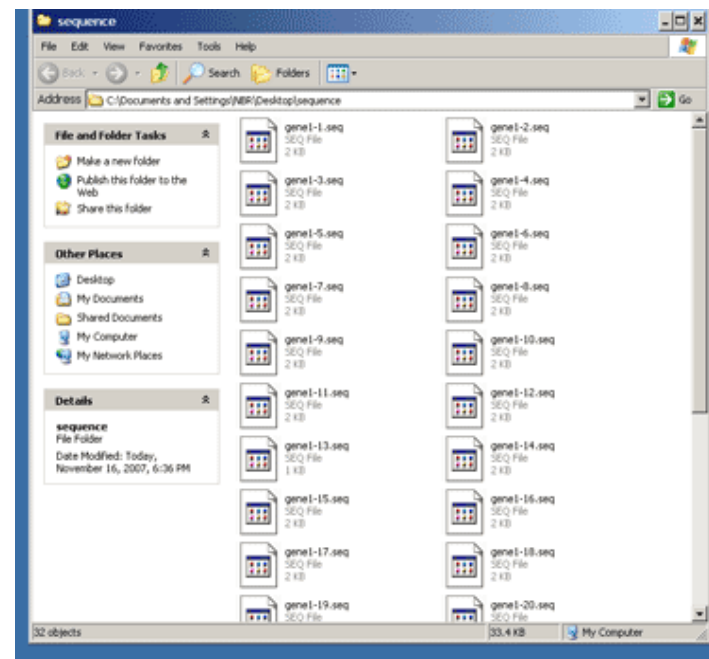
8.6.2. 他のマック OS の場合

[ZipIT!](#)、[CleanArchiver](#)、[MacZip](#)、[STUFFIT](#) 等のプログラムで zip 形式のアーカイブが作成可能です。

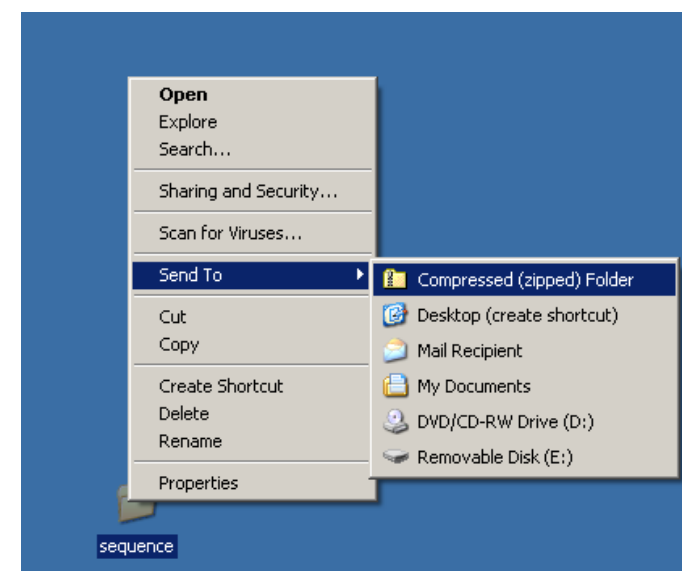
8.7. zip 形式の圧縮フォルダの作成方法(ウィンドウズ)

8.7.1. ウィンドウズ Me/XP/ビスタの場合

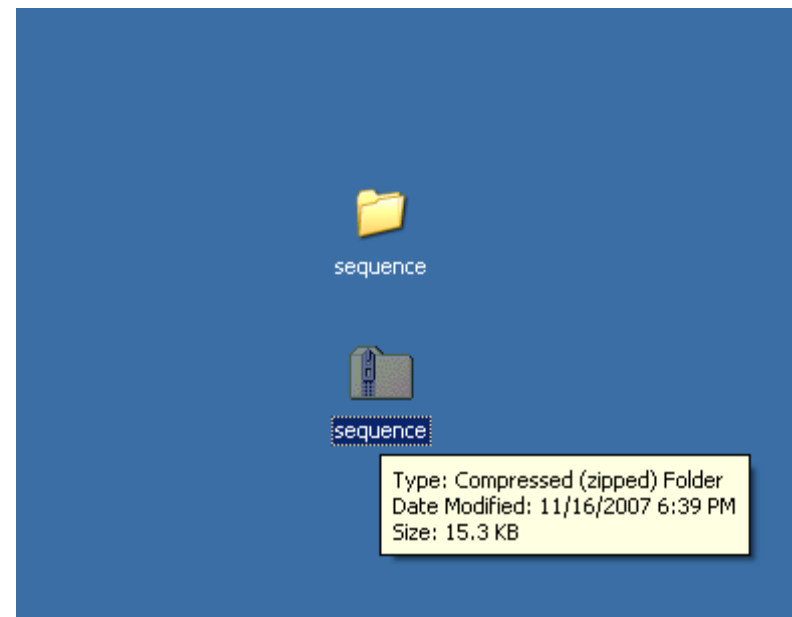
1. [8.2. FASTA 形式](#)または[8.1. plain sequence 形式](#)のバイサルファイト配列のファイルをフォルダに入れます(配列ファイルの拡張子としては".seq", ".fa", ".fas", ".fasta"または".txt"が使用可能)



2. フォルダを右クリックし、マウスを“送る”に移動させ、“圧縮(zip 形式)フォルダ”を選択します



3. zip形式の圧縮フォルダが、元のフォルダの近くの場所に自動的に現れます



8.7.2. 他のウィンドウズの場合

[7-Zip](#)、[WinZip](#) 等のプログラムで zip 形式の圧縮フォルダが作成可能です。

9. 統計処理

9.1. フィッシャーの正確確率検定

各 CpG サイトについて、二つのバイサルファイト配列のグループ間で、メチル化割合に違いがあるかどうかの統計的有意性は、[フィッシャーの正確確率検定](#)を用いて求めています。フィッシャーの正確確率検定は、ノンパラメトリックな統計手法で、2つのカテゴリーのデータ間にランダムではない相関があるかを統計的に検定するための方法です。基本的には、フィッシャーの正確確率検定はカイ二乗検定と同様に独立性の検定に用いることができますが、CpG のメチル化解析のように、少ない数のメチル化または未メチル化のデータに対しては、フィッシャーの正確確率検定の方が正確です。データから 2 x 2 の分割表を作成した場合に、いずれかの昇目の値が 5 以下ぐらいの小さい値の場合は、カイ二乗検定は不適當です。カイ二乗検定では近似を用いていますが、フィッシャーの正確確率検定は近似を用いていないため、フィッシャーの正確確率検定の方が(計算量は大きいですが)正確に検定することが可能です。サンプル数が十分に多い場合には、フィッシャーの正確確率検定とカイ二乗検定の 検定結果は同じになります。フィッシャーの正確確率検定における両側検定での P 値は、下記に示すような 各 CpG サイトのメチル化状態についての 2 x 2 の分割表から計算します。この P 値は 2つのグループ間での CpG のメチル化の状態が独立している(違いがある)かどうかを示すのに用います。

▣ CpG メチル化状態の 2 x 2 の分割表の例

- a: ある CpG サイトにおけるグループ 1 でのメチル化 CpG の数
- b: ある CpG サイトにおけるグループ 1 での未メチル化 CpG の数
- c: ある CpG サイトにおけるグループ 2 でのメチル化 CpG の数
- d: ある CpG サイトにおけるグループ 2 での未メチル化 CpG の数

	メチル化 CpG	未メチル化 CpG
グループ 1	a	b
グループ 2	c	d

実例として、表 1 のようなサンプルデータについて、まず、表 2 のように変換します。

表 1

CpG サイトの位置		375
メチル化 CpG	グループ 1	12/13 (92.3%)
	グループ 2	4/10 (40.0%)
	計	16/23 (69.6%)

表 2

	メチル化 CpG	未メチル化 CpG	計
グループ 1	12	1	13
グループ 2	4	6	10
計	16	7	23

この事象の確率 p は以下のように求められます：

$$p = \frac{{}^{a+b}C_a \cdot {}^{c+d}C_c}{{}^{a+b+c+d}C_{a+c}} = \frac{{}^{13}C_{12} \cdot {}^{10}C_4}{{}^{23}C_{16}} = \frac{(13! \cdot 10! \cdot 16! \cdot 7!)}{(12! \cdot 1! \cdot 4! \cdot 6! \cdot 23!)} = 0.0111357212$$

ここで、記号 ! は階乗を意味します。

a	b	c	d	ad - bc	確率 p
6	7	10	0	70	0.0069995962
7	6	9	1	47	0.0699959618
8	5	8	2	24	0.2362363710
9	4	7	3	1	0.3499798089
10	3	6	4	22	0.2449858662
11	2	5	5	45	0.0801771926
12	1	4	6	68	0.0111357212
13	0	3	7	91	0.0004894823

周辺度数 (2 x 2 分割表の外側の、13, 10, 16, 7) を固定したとき、全部で左表の 9 種類の組み合わせが考えられます。

これらの組み合わせのうち、"ad - bc" の絶対値がサンプルの事象での値 (68) 以下となる組み合わせについて、その確率 p を合計したものが両側検定での P 値になります。この例では、a = 6, 12, 13 の場合が該当し、両側検定での P 値は以下のように求められます。

$$P\text{-value} = 0.0069995962 + 0.0111357212 + 0.0004894823 = 0.0186257997$$

9.2. マン・ホイットニーの U 検定

二つのバイサルファイト配列のグループについて、全ての CpG サイトを含んだ形で、統計的な有意差があるかどうかについては [マン・ホイットニーの U 検定](#) を用いて P 値を求めています。マン・ホイットニーの U 検定は、ウィルコクソンの順位和検定とも呼ばれ、2 群の分布したデータ間に統計的な有意差があるかどうか調べるのに用いられるノンパラメトリックな統計手法です。マン・ホイットニーの U 検定はスチューデントの t 検定と同様の状況で用いられますが、特に CpG メチル化の解析での hyper または hypo メチル化の場合のように、分布が明らかに正規分布から外れるような場合には、パラメトリックな方法であるスチューデントの t 検定よりも、ノンパラメトリックな方法であるマン・ホイットニーの U 検定の方が適していると思われます。マン・ホイットニーの U 検定における両側検定の P 値は、各バイサルファイト配列でのメチル化率（配列中の全ての CpG に対するメチル化された CpG の割合）についての順位から求めます（下記参照）。この P 値は、バイサルファイト配列の 2 つのグループ間での、メチル化率の分布が独立しているか（違いがあるか）を示します。

重要な点として、マン・ホイットニーの U 検定は、2 つのグループそれぞれのメチル化率の平均値に違いがあるかどうかを検定する方法であるため、インプリンティング領域の CpG のメチル化のようなアレル特異的なメチル化については検定できません。具体的には、(1)ランダムな 50% のメチル化、(2)0%メチル化のアレルと 100%メチル化のアレルが半分ずつ、の 2 群を区別できません。また、メチル化率から求めていますので、メチル化のパターンの違いは考慮されません。

例

右のサンプルデータセット（QUMA のサンプル配列の解析結果）について、メチル化率の平均値、0.7409 と 0.2579 の違いが有意かどうかを調べます。

	各配列についての メチル化 CpG/全 CpG (メチル化 CpG の数 / CpG の数)	メチル化率の 平均値	配列数
グループ 1	6/19, 6/19, 8/19, 9/19 12/19, 15/19, 16/19, 18/19, 18/19, 18/19, 18/18, 19/19, 19/19	0.7409	13 (= n ₁)
グループ 2	2/19, 2/19, 3/19, 3/19 5/19, 5/19, 7/19, 7/19, 7/19, 8/19	0.2579	10 (= n ₂)

最初に、値(この場合メチル化率)の順位を決めます。もし同順位が複数ある場合は、順位の平均値を用います。たとえば、このサンプルデータでは二つの配列でメチル化率が 3/19 で順位が 3 位と 4 位ですが、この場合は、平均値の 3.5 を両方の配列の順位として用います。

次に、それぞれのグループの順位和、 R_1 と R_2 を求めます。

位置 i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
メチル化 CpG/全 CpG	2/19	3/19	5/19	6/19	7/19	8/19	9/19	12/19	15/19	16/19	18/19	1	順位和
順位	1,2	3,4	5,6	7,8	9-11	12,13	14	15	16	17	18-20	21-23	
順位(平均)	1.5	3.5	5.5	7.5	10	12.5	14	15	16	17	19	22	
配列数	グループ 1	0	0	0	2	0	1	1	1	1	3	3	212.5 (=R ₁)
	グループ 2	2	2	2	0	3	1	0	0	0	0	0	63.5 (=R ₂)
	計	2	2	2	2	3	2	1	1	1	1	3	3

そして、それぞれのグループごとの U 値である U_1 と U_2 を下記の式から求めます。

$$U_1 = n_1 * n_2 + n_1 * (n_1 + 1) / 2 - R_1 = 8.5$$

$$U_2 = n_1 * n_2 + n_2 * (n_2 + 1) / 2 - R_2 = 121.5$$

U_1 と U_2 のうち、より小さい値を U として採用します。このデータでは $U = 8.5$ となります。

最後に、両側検定の P 値を U 値から求めます。配列数が多い場合(20 配列以上)は、正規分布による近似を用いて P 値を求めています。配列数が少ない場合(20 配列以下)は、直接計算により正確な確率を求めています(マン・ホイットニーの正確確率 U 検定)。

正規分布による近似は以下のように行っています。

$$z = |U - E(U)| / \sqrt{V(U)}$$

ここで、z は標準正規分布に従うとしています。E(U)は U 値の平均値、V(U)は U 値の分散で、以下のように求めます。

$$E(U) = n_1 n_2 / 2$$

$$V(U) = \frac{n_1 n_2}{12(n^2 - n)} \left\{ n^3 - n - \sum_{i=1}^m (t_i^3 - t_i) \right\}$$

ここで、t_i は位置 i における配列数(同順位の配列の数)です。

このサンプルデータでは E(U) = 65, V(U) = 257.812, z = 3.51879 となります。そして標準正規分布の統計表から、両側検定の P 値は 0.0004 となります (両側検定では統計表から求めた上側確率の 2 倍)。

別のサンプルデータ(配列数 11)について、マン・ホイットニーの正確確率 U 検定で P 値を求めます。

表 1

	各配列についての メチル化 CpG/全 CpG (メチル化 CpG の数 / CpG の数)	メチル化率の平均値	配列数
グループ 1	6/19, 6/19, 9/19 12/19, 15/19, 18/19	0.5789	6 (= n ₁)
グループ 2	3/19, 5/19, 5/19, 7/19, 7/19	0.2842	5 (= n ₂)

表 2

位置 i	1	2	3	4	5	6	7	8	配列数	順位和	
メチル化 CpG/全 CpG	3/19	5/19	6/19	7/19	9/19	12/19	15/19	18/19			
順位	1	2,3	4,5	6,7	8	9	10	11			
順位(平均)	1	2.5	4.5	6.5	8	9	10	11			
配列数	グループ 1	0	0	2	0	1	1	1	1	6	47 (=R ₁)
	グループ 2	1	2	0	2	0	0	0	0	5	19 (=R ₂)
	計	1	2	2	2	1	1	1	1	11	

$$U1 = n_1 * n_2 + n_1 * (n_1 + 1) / 2 - R_1 = 4$$

$$U2 = n_1 * n_2 + n_2 * (n_2 + 1) / 2 - R_2 = 26$$

$$U = \min (U1, U2) = 4$$

周辺度数(各グループの配列数 6 と 5、及び、各メチル率についての配列数 1, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 1)を固定した場合、176 の組み合わせがあり、そのうち、U 値がサンプルデータでの U 値である 4 以下の 11 通りの組み合わせは以下ようになります。

位置 i	1	2	3	4	5	6	7	8	順位和	U 値	確率
メチル化 CpG/全 CpG	3/19	5/19	6/19	7/19	9/19	12/19	15/19	18/19			
順位	1	2,3	4,5	6,7	8	9	10	11			
順位(平均)	1	2.5	4.5	6.5	8	9	10	11			
グループ 1/グループ 2	1/0	2/0	2/0	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	21.5/44.5	0.5	0.00433
グループ 1/グループ 2	1/0	2/0	2/0	0/2	1/0	0/1	0/1	0/1	23/43	2	0.00216
グループ 1/グループ 2	1/0	2/0	2/0	0/2	0/1	1/0	0/1	0/1	24/42	3	0.00216
グループ 1/グループ 2	1/0	2/0	2/0	0/2	0/1	0/1	1/0	0/1	25/41	4	0.00216
グループ 1/グループ 2	1/0	2/0	1/1	2/0	0/1	0/1	0/1	0/1	23.5/42.5	2.5	0.00433
グループ 1/グループ 2	1/0	2/0	1/1	1/1	1/0	0/1	0/1	0/1	25/41	4	0.00866
グループ 1/グループ 2	0/1	1/1	0/2	1/1	1/0	1/0	1/0	1/0	47/19	4	0.00866
グループ 1/グループ 2	0/1	0/2	2/0	0/2	1/0	1/0	1/0	1/0	47/19	4	0.00216
グループ 1/グループ 2	0/1	0/2	1/1	2/0	0/1	1/0	1/0	1/0	47.5/18.5	3.5	0.00433
グループ 1/グループ 2	0/1	0/2	1/1	1/1	1/0	1/0	1/0	1/0	49/17	2	0.00866
グループ 1/グループ 2	0/1	0/2	0/2	2/0	1/0	1/0	1/0	1/0	51/15	0	0.00216

両側検定の P 値を求めるには、これらの 11 の組み合わせそれぞれの確率の合計値を求めます。このサンプルでは、両側検定の P 値は 0.0498 となります。

10. その他

10.1. CSV形式のファイルの開き方

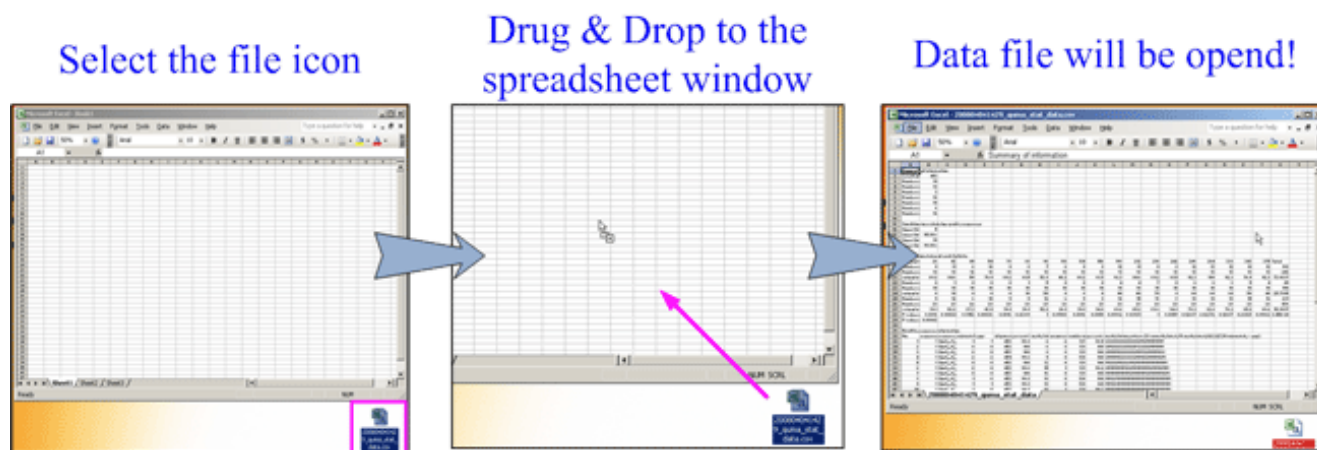
多くの場合、CSV形式の解析データファイルのアイコンをダブルクリックすることで、マイクロソフトエクセルが起動してファイルが開かれます。もしダブルクリックで開けない場合は”ドラッグ&ドロップ”により開きます(下記参照)。

10.1.1. Mac OS

CSV形式のデータファイルのアイコンをマイクロソフトエクセルや[オープンオフィス](#)のアイコンにドラッグ&ドロップします。

10.1.2. Windows

マイクロソフトエクセルや[オープンオフィス/スターシート](#)で新規ウィンドウを開きます。そして、CSVデータファイルのアイコンを新規ウィンドウにドラッグ&ドロップします。



もしくは”ファイル”メニューの”開く”から開きます。ファイル選択ダイアログではファイルの種類を”全てのファイル”または”テキストファイル”に変更します。