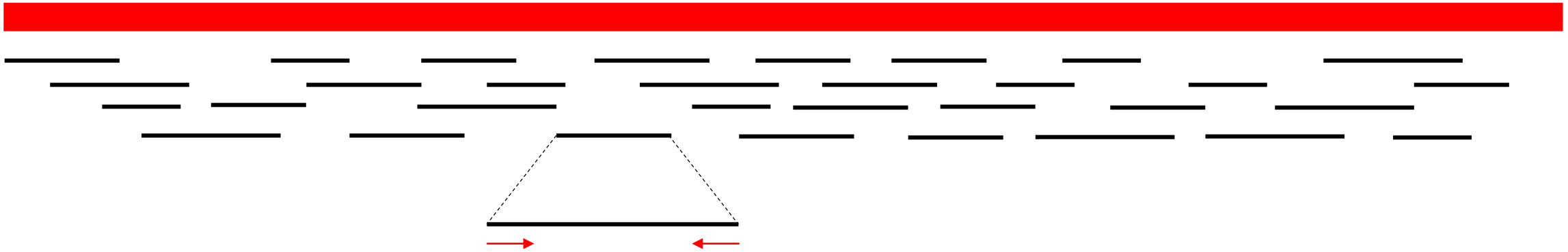
2016年度第一回
バイオインフォマティクス実習

次世代シーケンスデータのマッピング

DNA sequence



length of genome : *G*
#reads : *N*
length of each read : *L*
coverage *C = (N × L) / G*

GCTGATCGT
GATGCTAGCTGCT
ATCGAGCGCGATG
GCATCGATCGAGC
GCATGCCGCAT
AGGTGCATG

…AGGTGCATGCCGCATCGATCGAGCGCGATGCTAGCTGCTGATCGT…

ファイルの取得

- Index用ゲノムreference
  マウス染色体1番
  http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/mm10/chromosomes/chr1.fa.gz

- シーケンスデータ
  GEO データベースaccession number GSE65976
  SRR1508230.sra ,SRR1508234.sra
  SRR1805875.sra, SRR1805876.sra

課題配布フォルダ → bioinfojisyu → chr1.fa
part_SRR1805875.fastq

Cygwin

- cygwin
  windows上で動作するUnix環境の一つ

- www.cygwin.comで配布しているsetup.exeをダウンロード

- 実行してインストール

- Cygwinターミナル（端末）を起動
  スタートメニュー　→　2.ネットワークツール　→　仮想UNIX端末（cygwin64)

Bowtie

- http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml

  Latest releaseから最新版をダウンロード

  bowtie-1.1.1-mingw.x86_64.zip

  展開するだけで使用可能

  課題配布フォルダのbowtie-1.1.1フォルダを各自のデスクトップにコピー

FASTQ format

- 1行目 : ＠配列ID
- 2行目 : 塩基配列
- 3行目 : +配列ID 説明
- 4行目 : クオリティー値（シーケンスエラーの生じる確率）

＠Seq-ID
AGGTGCATCGATGCGCGAATAAT
+
!1’’*))++//?”AAA{{

Bowtie

- マッピングツールの一つ
- Burrows Wheeler transformを利用している
- 高速である
- メモリの消費は少ない
- 並列化に対応している

Burrows Wheeler transform

- The BWT applies a reversible transformation to a block of input text. The transformation does not itself compress the data, but reorders it to make it easy to compress with simple algorithms such as move-to-front coding.

Burrows M, Wheeler DJ (1994) A block-sorting lossless data

compression algorithm. Technical report 124. Palo Alto, CA:

Digital Equipment Corporation.

Burrows Wheeler transform

original
X = abracadabra
末尾に＄を付ける
左に一文字ずつシフトして
ローテーション

a	b	r	a	c	a	d	a	b	r	a	$
b	r	a	c	a	d	a	b	r	a	$	a
r	a	c	a	d	a	b	r	a	$	a	b
a	c	a	d	a	b	r	a	$	a	b	r
c	a	d	a	b	r	a	$	a	b	r	a
a	d	a	b	r	a	$	a	b	r	a	c
d	a	b	r	a	$	a	b	r	a	c	a
a	b	r	a	$	a	b	r	a	c	a	d
b	r	a	$	a	b	r	a	c	a	d	a
r	a	$	a	b	r	a	c	a	d	a	b
a	$	a	b	r	a	c	a	d	a	b	r
$	a	b	r	a	c	a	d	a	b	r	a

Burrows Wheeler transform

アルファベット順にソート
＄はaよりも先

BWT(X) = ard$rcaaaabb

F											L
$	a	b	r	a	c	a	d	a	b	r	a
a	$	a	b	r	a	c	a	d	a	b	r
a	b	r	a	$	a	b	r	a	c	a	d
a	b	r	a	c	a	d	a	b	r	a	$
a	c	a	d	a	b	r	a	$	a	b	r
a	d	a	b	r	a	$	a	b	r	a	c
b	r	a	$	a	b	r	a	c	a	d	a
b	r	a	c	a	d	a	b	r	a	$	a
c	a	d	a	b	r	a	$	a	b	r	a
d	a	b	r	a	$	a	b	r	a	c	a
r	a	$	a	b	r	a	c	a	d	a	b
r	a	c	a	d	a	b	r	a	$	a	b

Burrows Wheeler 逆変換

（複数個ある
文字には番号を
付けてある）

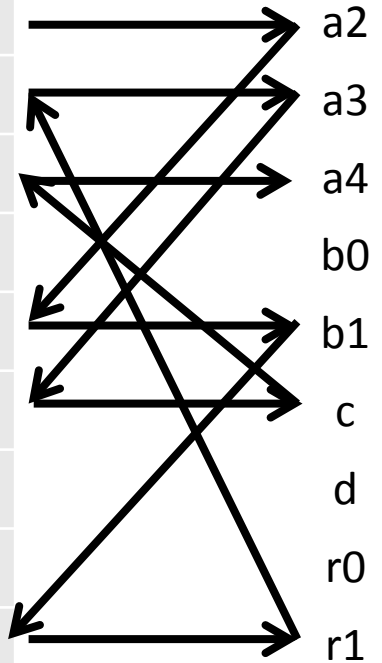
L
a0
r0
d
$
r1
c
a1
a2
a3
a4
b0
b1

辞書式に
並べ替え

F
$
a0
a1
a2
a3
a4
b0
b1
c
d
r0
r1

L
a0
r0
d
$
r1
c
a1
a2
a3
a4
b0
b1

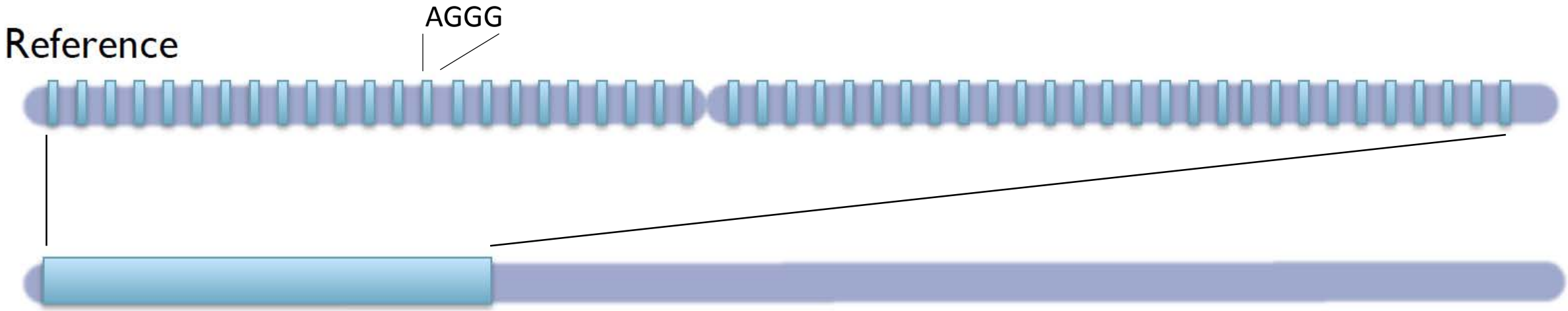
F
$
a0
a1
a2
a3
a4
b0
b1
c
d
r0
r1



LはFの一文字前
＄から出発して
L→F→L→L…と
たどっていくと
オリジナルの文字列を
復元できる

a2b1r1a3ca4…

BWTの利点



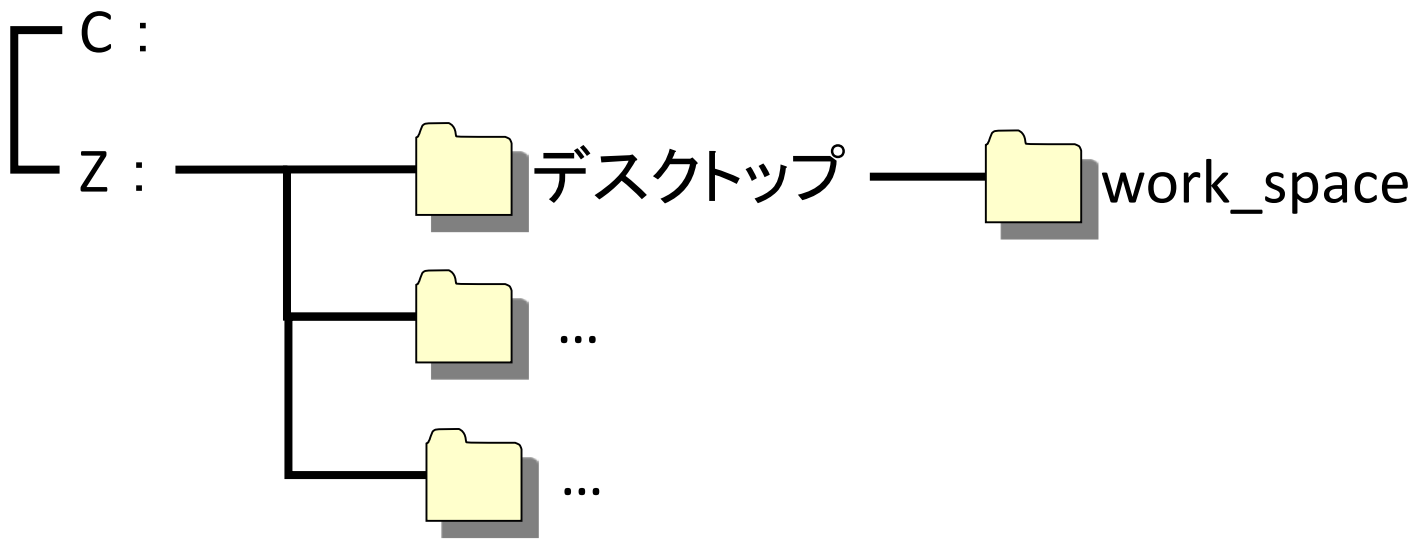
同じ文字が固まる傾向がある
検索しやすい
簡単に復元できる

F L
GGGA ~ A
GGGC ~ A
GGGT ~ A
…

作業ディレクトリ作成

Cygwin

```
$ cd /cygdrive/z/デスクトップ ↵
$ mkdir work_space ↵
$ cd work_space ↵
```



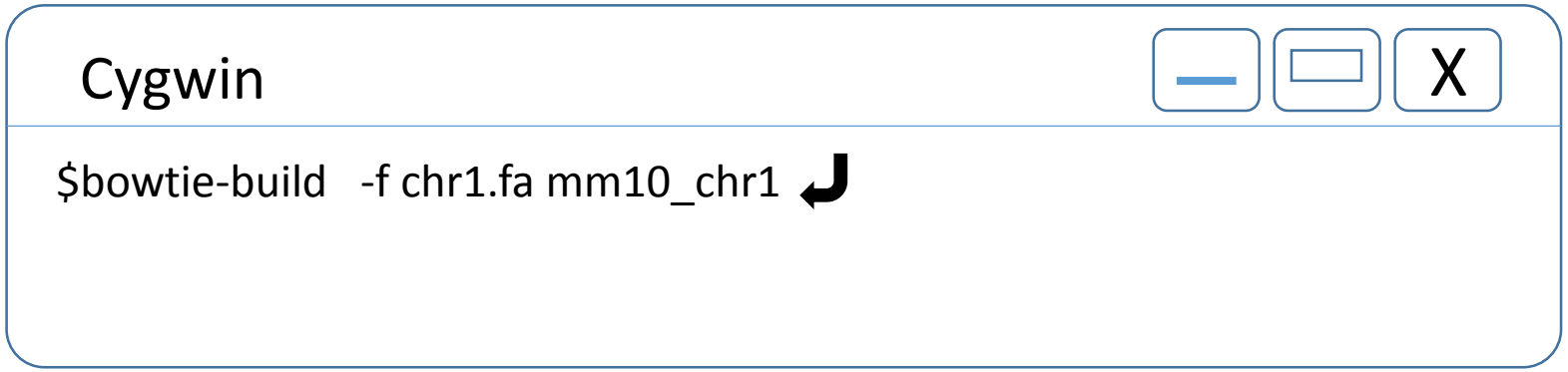
フォルダ（ディレクトリ）の権限

- ドライブC　ローカルPCのハードディスク
  読み込みのみ

- ドライブZ　各アカウントに割り当てられたハードドライブ
  ネットワーク上のハードディスク　八景キャンパスのサーバ
  読み書き実行

- ドライブY　課題配布フォルダ
  ネットワーク上のハードディスク　八景キャンパスのサーバ
  読み込みのみ

Bowtieのコマンド1
Index作成



bowtie-build -f リファレンスファイル名 インデックス名
referenceのゲノム配列をBurrows-Wheeler変換を使ってインデックス化する
mm10_chr1.1.ebwt
mm10_chr1.2.ebwt
mm10_chr1.3.ebwt
mm10_chr1.4.ebwt
mm10_chr1.rev.1.ebwt
mm10_chr1.rev.2.ebwt
6個のファイルが作成される

マッピング

Cygwin

```
$bowtie   -m 1 -v 2 -a --strata --best -S mm10_chr1 part_SRR1805875.fastq
  mm10_chr1 SRR1805875.sam
```

bowtie (option) 参照インデックス名 fastqファイル名 出力ファイル名

-m 1　　: 1リードを1か所にマッピングする
-v 2　　: ミスマッチを2個まで許容する
-a　　:候補の配列を全て列挙する
--best　:ベストマッチの場所にマッピング
--strata :
-S　　: 結果をsamファイル形式で出力

SAM format

- 11列
- 3列目 : 染色体番号
- 4列目 : 位置
- 10列目 : 配列

第2回 予定
Integrative Genomics Viewer(IGV)による可視化

- samtoolsでファイル変換
  １）sam→bam変換
  ２）bamファイルを染色体順に並べ替え
  ３）indexファイルの作成

- IGVへアップロード、表示