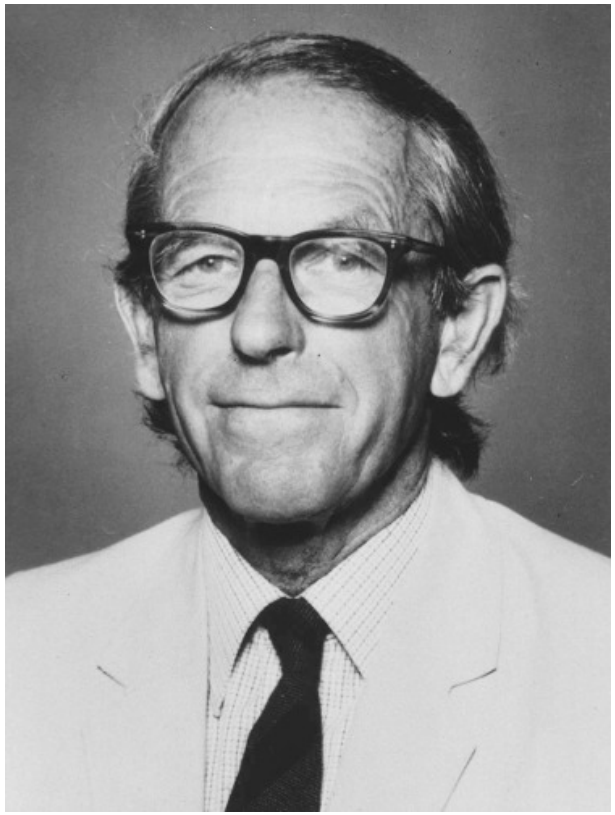
Нуклеотидные банки данных

Ваня Русинов

Экскурс в историю секвенирования

История секвенирования

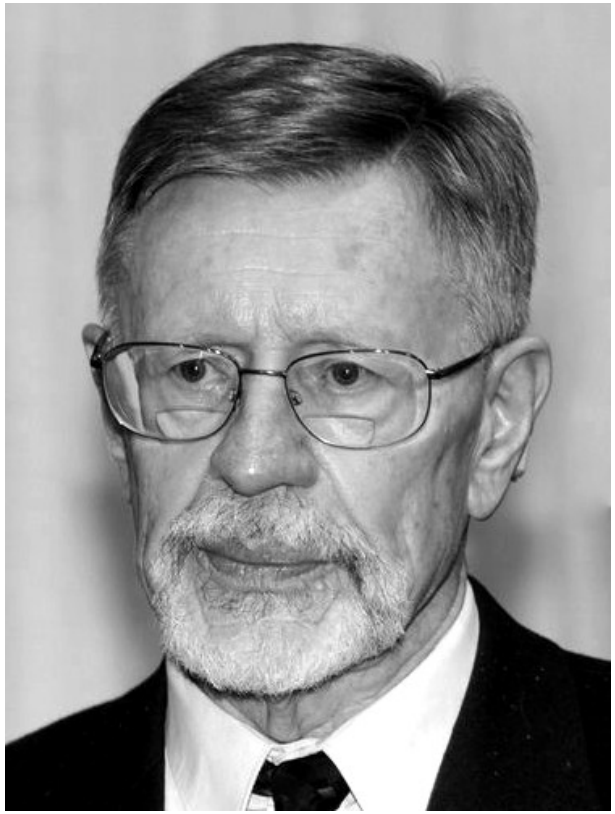
- 1951 — Первая последовательность:
  бычий инсулин, цепь B (белок!)



Frederick Sanger

История секвенирования

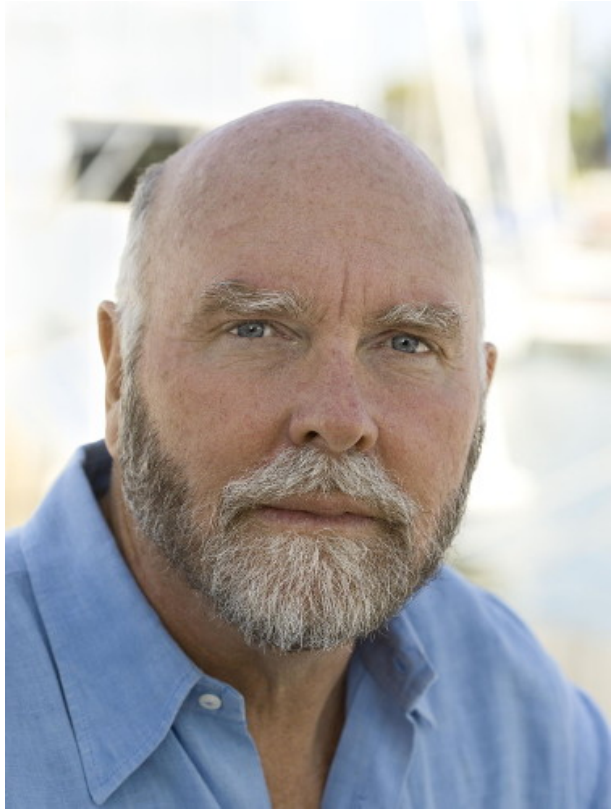
- 1951 — Первая последовательность:
  бычий инсулин, цепь B (белок!)
- 1976 — Первый полный геном:
  бактериофаг MS2 (РНК)



Walter Fiers

История секвенирования

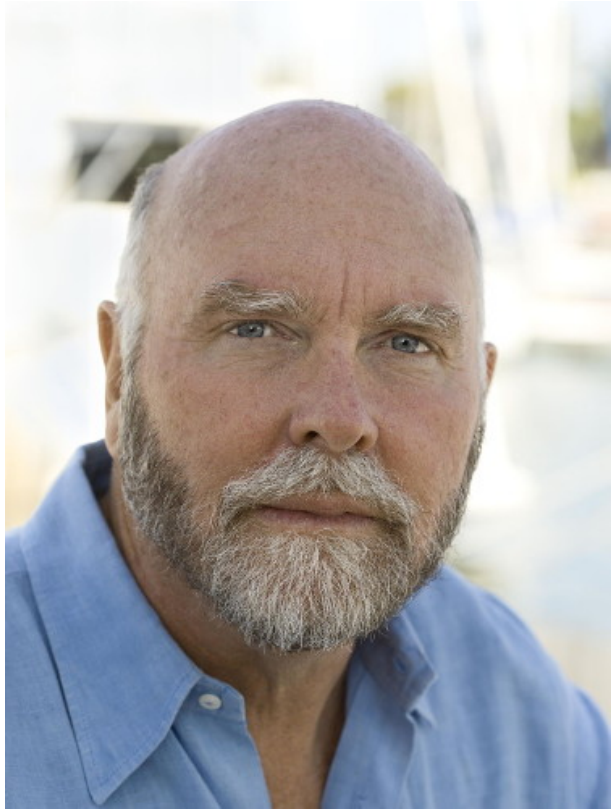
- 1951 — Первая последовательность:
  бычий инсулин, цепь B (белок!)
- 1976 — Первый полный геном:
  бактериофаг MS2 (РНК)
- 1995 — Первый геном бактерии:
  Haemophilus influenza



Craig Venter

История секвенирования

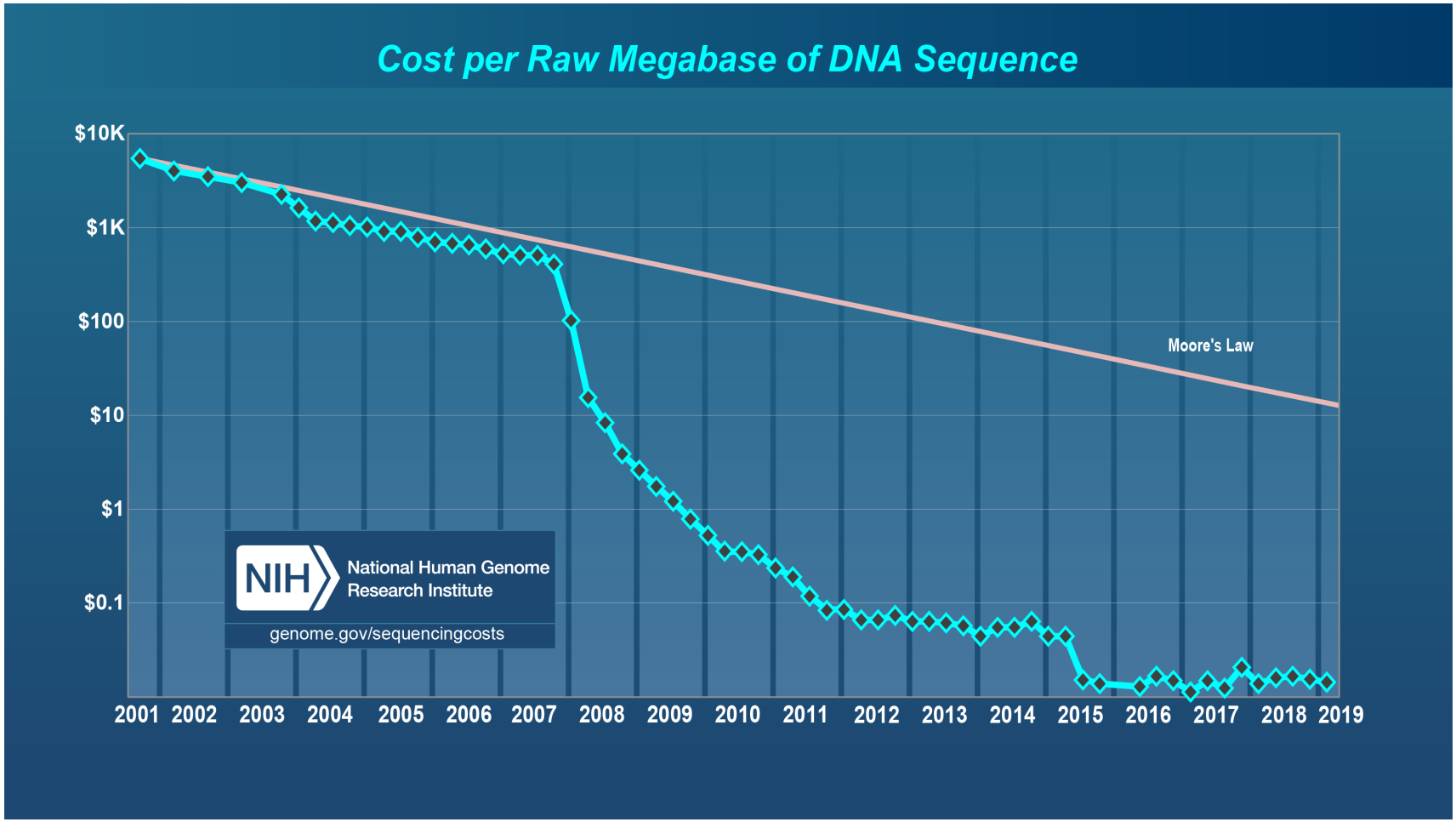
- 1951 — Первая последовательность: бычий инсулин, цепь B (белок!)
- 1976 — Первый полный геном: бактериофаг MS2 (РНК)
- 1995 — Первый геном бактерии: *Haemophilus influenza*
- 2001 — Первый геном человека: международный консорциум vs. Celera Genomics



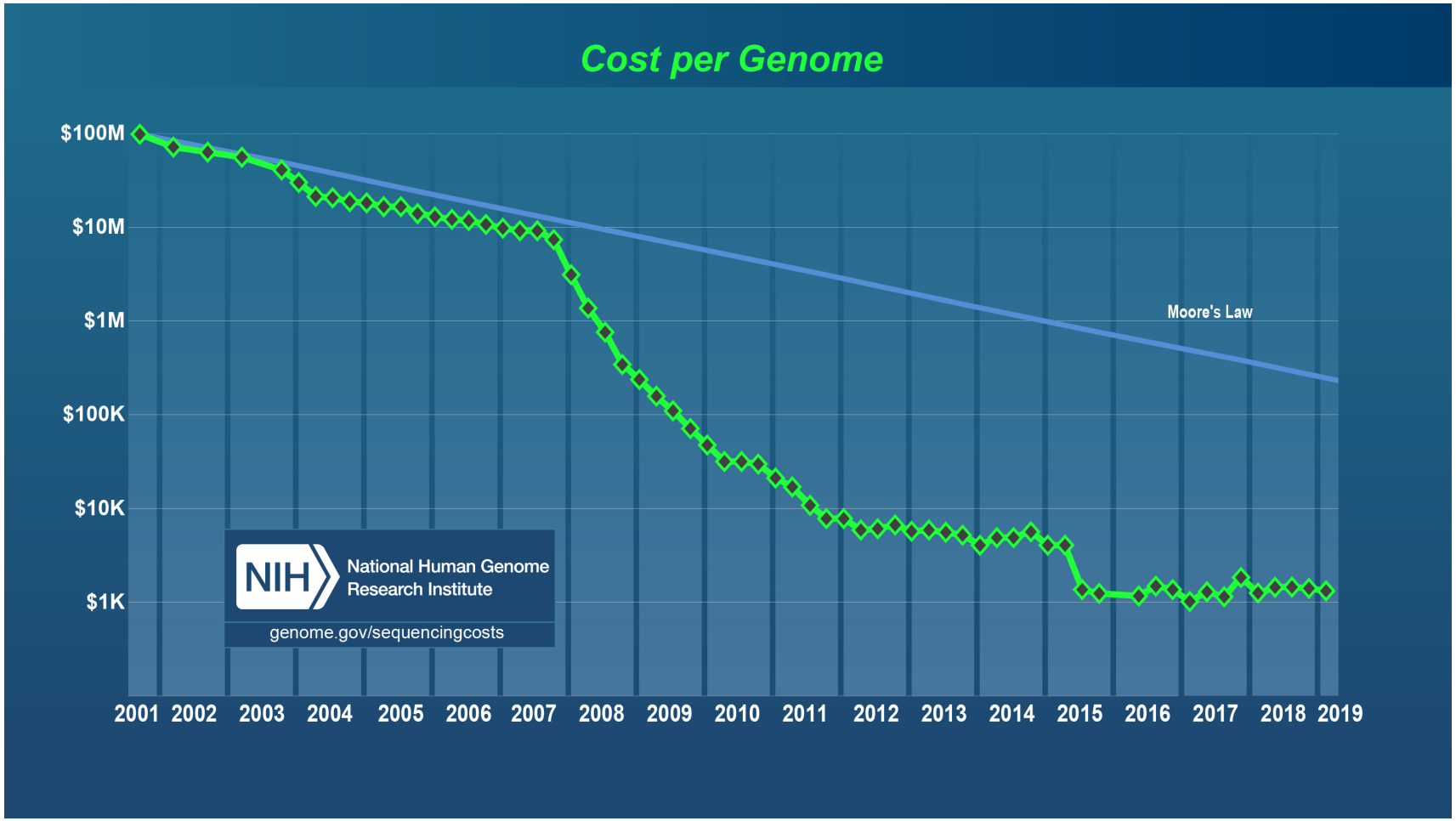
Craig Venter

Next Generation Sequencing

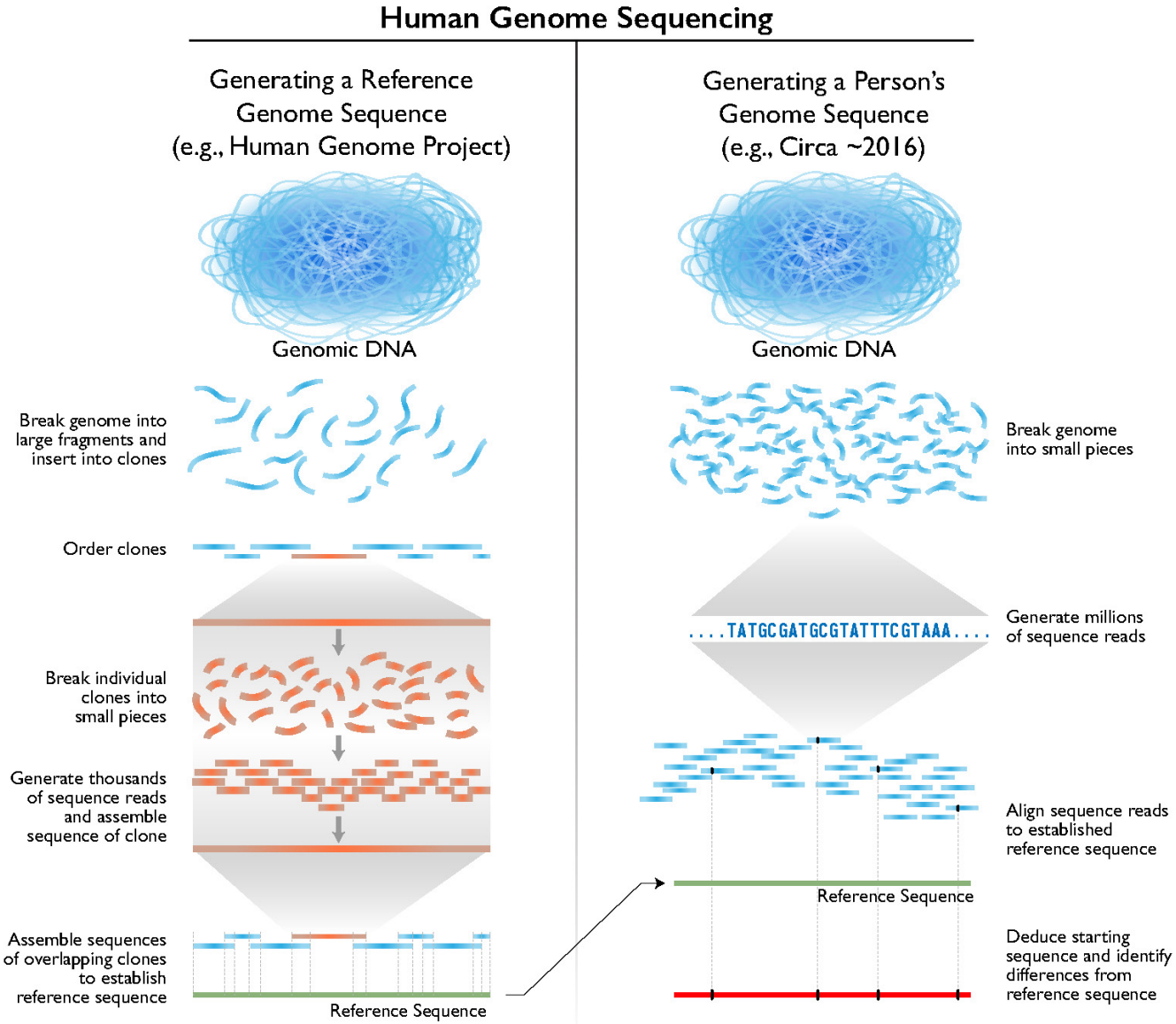
Стоимость секвенирования



Стоимость секвенирования



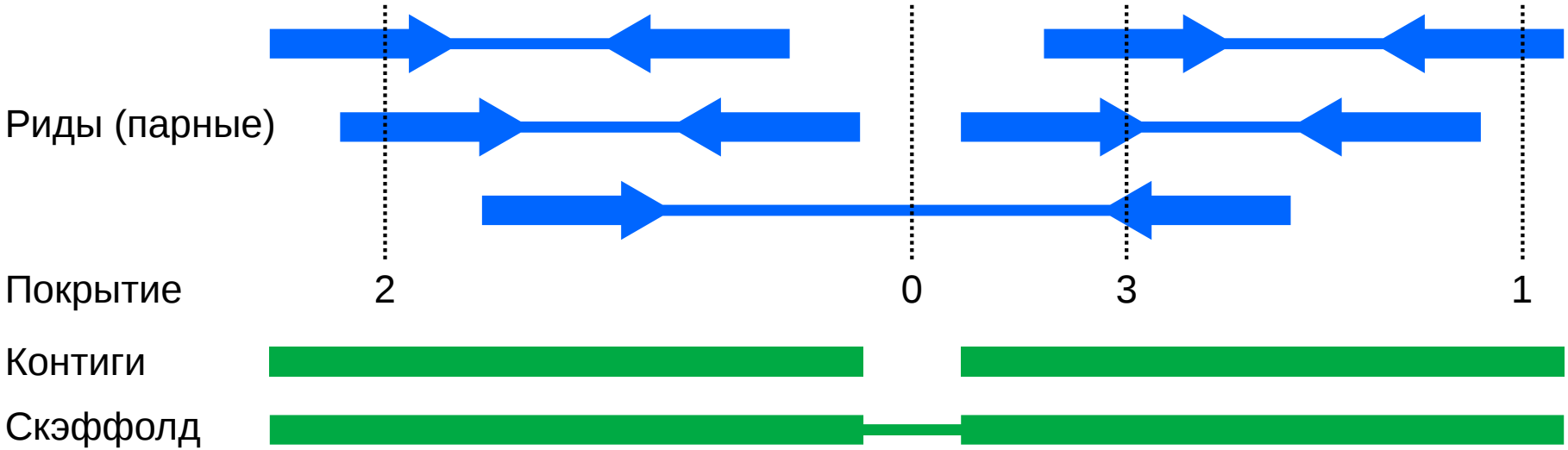
Sanger vs. NGS



Термины NGS

Прочтение (рид)	последовательность, полученная из секвенатора
Качество прочтения	величина $Q = -10 \log_{10} p$, где p – вероятность ошибочного прочтения нуклеотида; Q вычисляется для каждого нуклеотида рида
Контиг	секвенированный без пропусков фрагмент ДНК, собирается в компьютере из прочтений
Скэффолд	набор контигов, про которые известно взаимное расположение и примерное расстояние; разрывы заполняют соответствующим количеством букв N

Сборка NGS



Показатели качества сборки

(Среднее) покрытие	среднее число ридов, в которые попал каждый нуклеотид
N50	длина самого длинного контига, такого, что этот и все более длинные контиги покрывают более половины генома
L50	номер контига (при упорядочивании по убыванию длины), длина которого равна N50

Технологии NGS

Table 1 | **Main characteristics of current NGS technologies**

Technology	Run type			Maximum read length	Quality scores	Error rates
	Single end	Paired end	Mate pair			
Illumina	Yes	Yes	Yes	300 bp	>30	0.0034–1%
SOLiD	Yes	Yes	Yes	75 bp	>30	0.01–1%
IonTorrent	Yes	Yes	No	400 bp	~20	1.78%
454	Yes	Yes	No	~700 bp (up to 1 kb)	>20	1.07–1.7%
Nanopore	Yes	No	No	5.4–10 kb	NA	10–40%
PacBio	Yes	No	No	~15 kb (up to 40 kb)	<10	5–10%

Escalona, Rocha, Posada. *Nat Rev Genet.* 2016; 17(8): 459–469. PMID: 27320129; PMCID: PMC5224698.

Масштабы бедствия

По данным NCBI Genome, на данный момент секвенированы (или в процессе секвенирования) геномы:

- 214 370 прокариот
- 33 456 вирусов
- 18 921 плазмид
- 14 952 органелл
- 9 363 эукариот

NCBI Genome содержит далеко не все секвенированные геномы.

Массовые геномные проекты

...

2012 100000 геномов людей

2012 1000 геномов грибов

2011 5000 геномов насекомых

2010 10000 геномов позвоночных

2009 1000 геномов растений

2008 3000 геномов риса

2008 1000 геномов людей

2008 1001 геном Арабидопсиса

...

Что секвенируют?

- Геномы
- Экзомы
- Транскриптомы
- Метиломы
- Метагеномы
- Сайты связывания ДНК белком (ChIP-seq)
- Сближенные участки хромосом (HiC)
- И многое другое

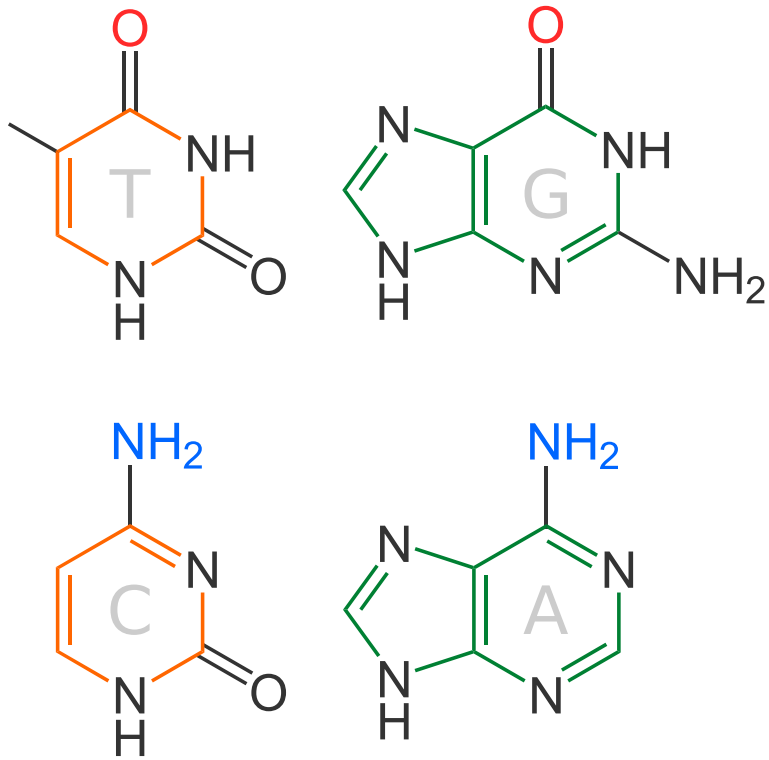
Нуклеотидные банки данных

Соглашения о хранении последовательностей

- Последовательность однобуквенных обозначений нуклеотидов,
- записанную от 5’–конца к 3’–концу
- только для одной цепи ДНК.
- В случае РНК урацилы тоже обозначают буквой T.
- Нуклеотиды нумеруют, начиная с 1 (а не 0).

Нуклеотидные коды IUPAC

Код	Значение	Мнемоническое правило
A	A	**A**denine
C	C	**C**ytosine
G	G	**G**uanine
T	T	**T**hymine
K	G или T	**K**eto
M	A или C	a**M**ino
R	A или G	pu**R**ine
Y	C или T	p**Y**rimidine
S	C или G	**S**trong interaction
W	A или T	**W**eak interaction
B	не A	после A по алфавиту
D	не C	после C по алфавиту
H	не G	после G по алфавиту
V	не T	после T и U по алфавиту
N	любой	a**N**y

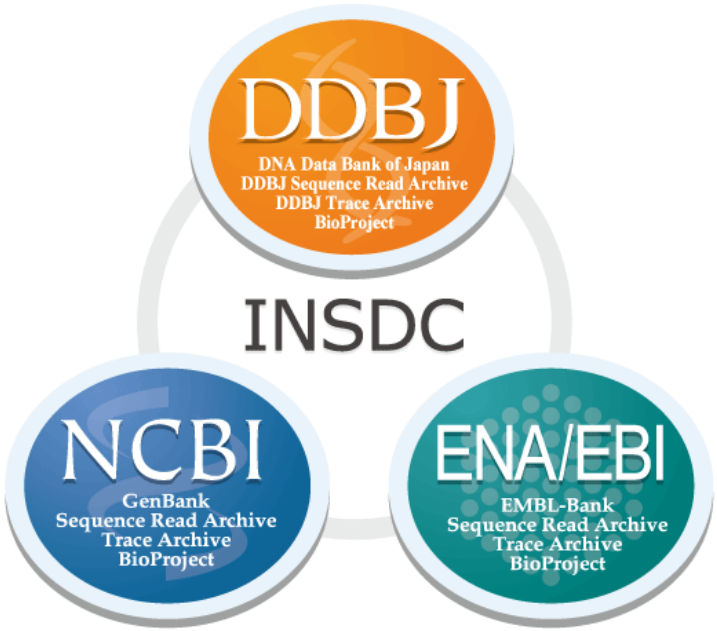


Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. *PNAS*. 1986;83:4–8. PMID: 2417239; PMCID: PMC322779.

INSDC (www.insdc.org)

International Nucleotide Sequence Database Collaboration:

- Объединяет 3 крупнейших нуклеотидных архива: GenBank, ENA, DDBJ
- Ежедневный обмен данными
- Единый формат таблицы локальных особенностей
- Рекомендации по использованию терминов и ключевых слов в аннотациях
- И некоторые прочие унификации (например, таблицы генетического кода)



Структура данных в INSDC

Data type	DDBJ	EMBL-EBI	NCBI
Next generation reads	Sequence Read Archive	European Nucleotide Archive (ENA)	Sequence Read Archive
Capillary reads	Trace Archive		Trace Archive
Annotated sequences	DDBJ		GenBank
Samples	BioSample		BioSample
Studies	BioProject		BioProject

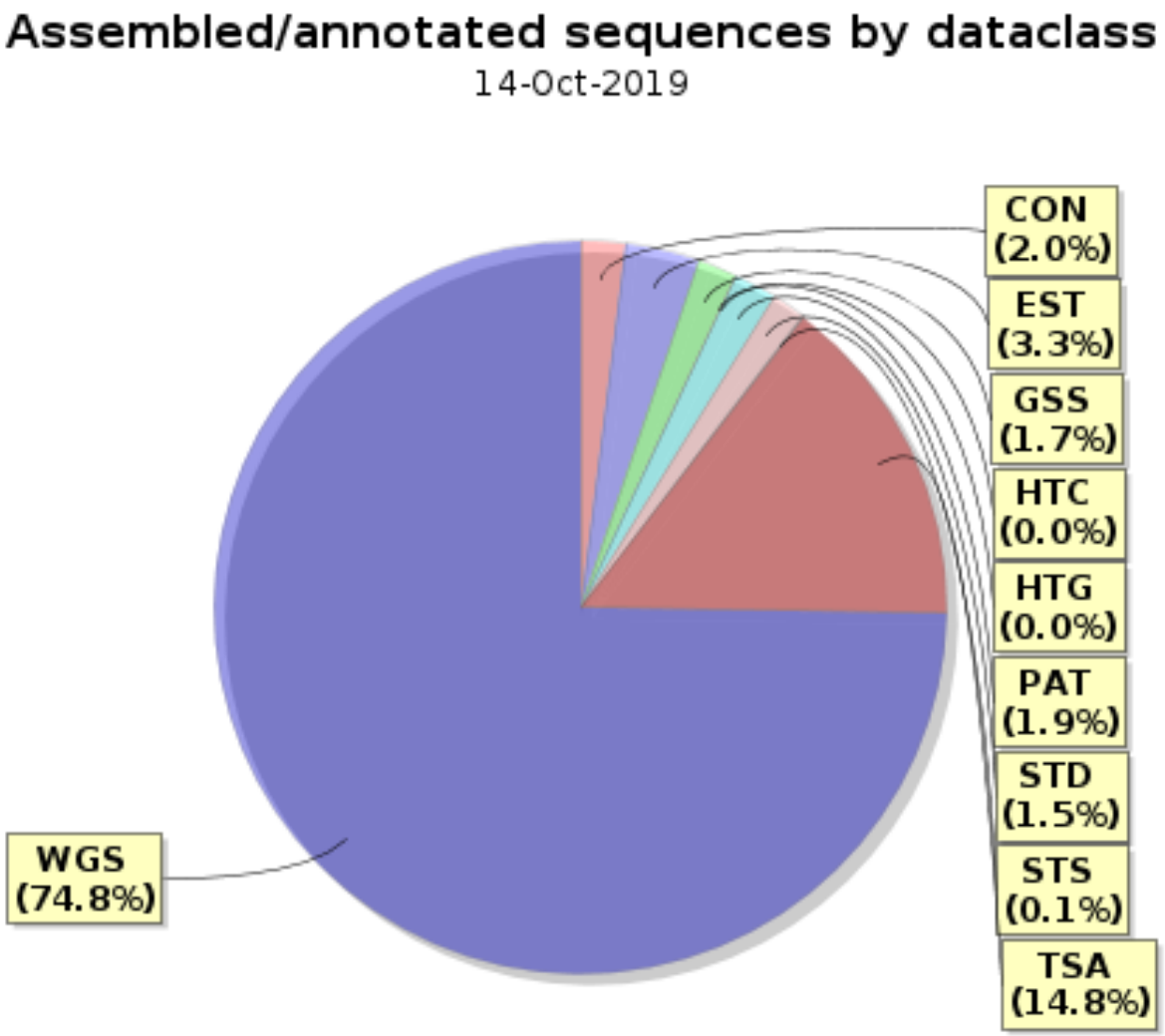
ENA data domains

Assembly	информация о сборке скэффолдов и хромосом из ридов и контигов
Sequence	собранные и аннотированные последовательности
Coding	(виртуальный домен) участки, кодирующие белок
Non-coding	(виртуальный домен) участки, кодирующие РНК
Marker	(виртуальный домен) всякие маркерные участки
Analysis	производные данные о сборке или аннотации
Read	прочтения NGS
Trace	данные капиллярного секвенирования
Taxon	таксономическая информация
Sample	информация об образце – источнике биологического материала
Study	или Project, информация о проекте

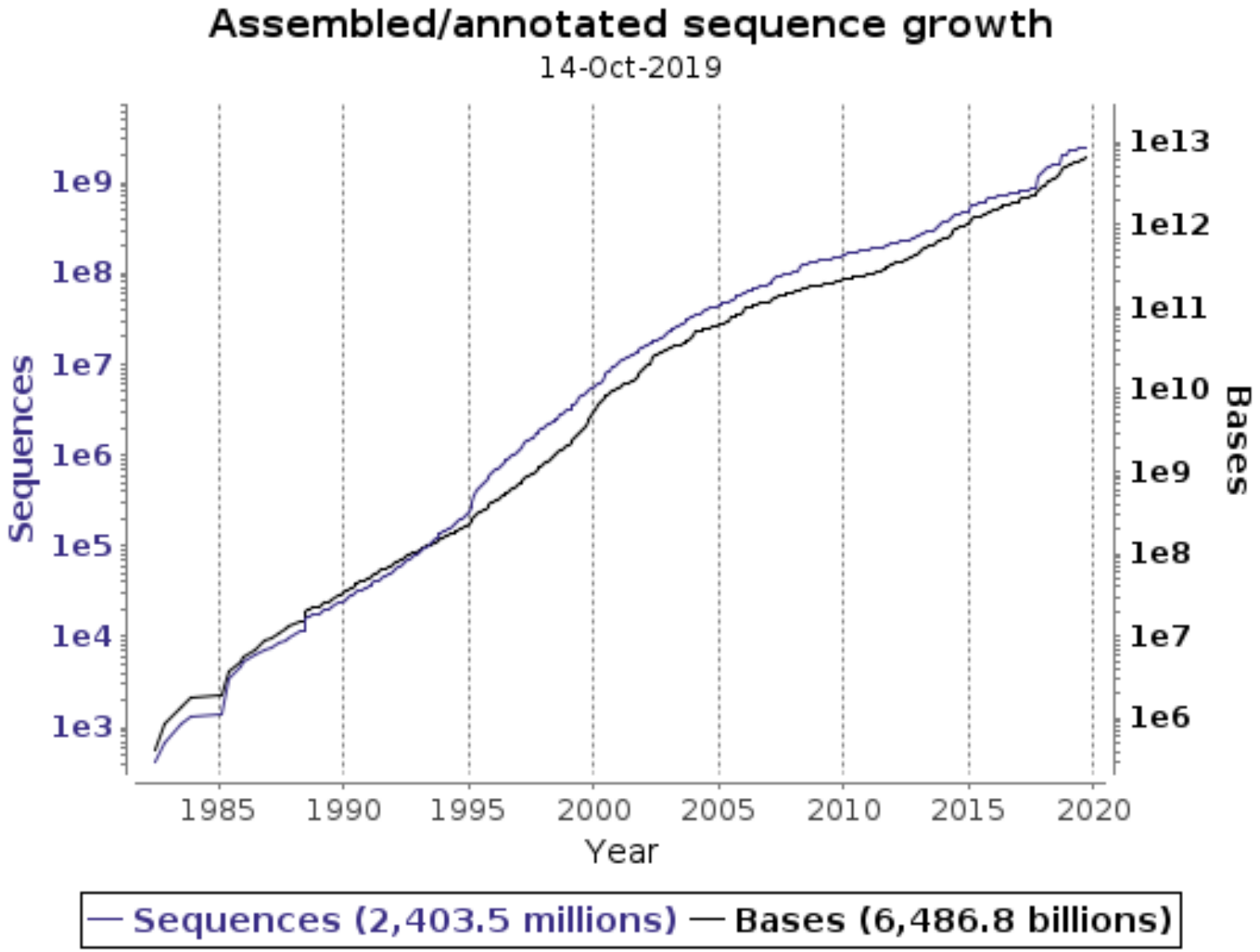
ENA data classes

EST	Expressed Sequence Tags
WGS	геномные контиги
GSS	Genome Survey Sequence
HTC	High Throughput Transcriptomic data
HTG	High Throughput Genomic data
STD	собранные и аннотированные последовательности
CON	скэффолды
STS	Sequence Tagged Site
PAT	последовательности из патентов
TSA	транскриптомные контиги
CDS	участки, кодирующие белок

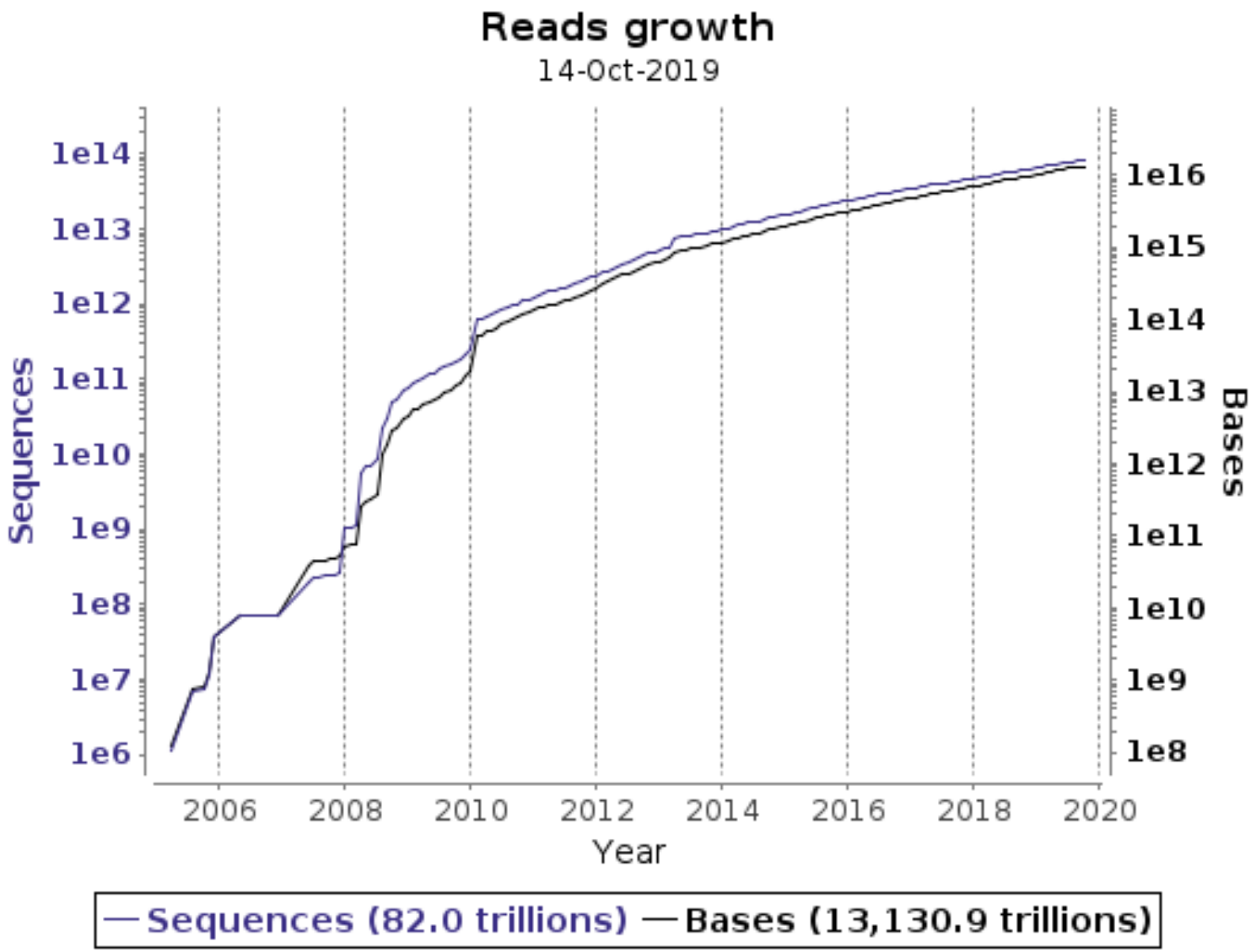
ENA: распределение записей по классам



ENA: рост числа записей



ENA: увеличение объема SRA



Формат записи в ENA

```
ID   LR694071; SV 1; linear; genomic DNA; STD; VRT; 335 BP.
XX
AC   LR694071;
XX
PR   Project:PRJEB20083;
XX
DT   01-AUG-2019 (Rel. 141, Created)
DT   12-SEP-2019 (Rel. 142, Last updated, Version 2)
XX
DE   Carcharodon carcharias isolate C_car_delaware_2007 genome assembly,
DE   chromosome: 1
XX
KW   .
XX
OS   Carcharodon carcharias (great white shark)
OC   Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Chondrichthyes;
OC   Elasmobranchii; Galeomorphii; Galeoidea; Lamniformes; Alopiidae;
OC   Carcharodon.
XX
RN   [1]
RA   Canner M., Saneer T.;
RT   ;
RL   Submitted (31-JUL-2019) to the INSDC.
RL   Saneer-Weeksbooth Bashhouse
XX
DR   MD5; a7e1a34e45308b36003800689dc43934.
DR   BioSample; SAMN04526268.
XX
FH   Key             Location/Qualifiers
FH
FT   source          1..335
FT                   /organism="Carcharodon carcharias"
FT                   /chromosome="1"
FT                   /isolate="C_car_delaware_2007"
FT                   /mol_type="genomic DNA"
FT                   /db_xref="taxon:13397"
XX
SQ   Sequence 335 BP; 323 A; 12 C; 0 G; 0 T; 0 other;
     caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaac        60
     ...
     caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaac                                  335
//
```

Формат записи в GenBank

```
LOCUS       LR694071                 335 bp    DNA     linear   VRT 12-SEP-2019
DEFINITION  Carcharodon carcharias isolate C_car_delaware_2007 genome assembly,
            chromosome: 1.
ACCESSION   LR694071
VERSION     LR694071.1
DBLINK      BioProject: PRJEB20083
            BioSample: SAMN04526268
KEYWORDS    .
SOURCE      Carcharodon carcharias (great white shark)
  ORGANISM  Carcharodon carcharias
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Chondrichthyes;
            Elasmobranchii; Galeomorphii; Galeoidea; Lamniformes; Alopiidae;
            Carcharodon.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Canner,M. and Saneer,T.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (31-JUL-2019) Saneer-Weeksbooth Bashhouse
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..335
                     /organism="Carcharodon carcharias"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="C_car_delaware_2007"
                     /db_xref="taxon:13397"
                     /chromosome="1"
ORIGIN
        1 caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaac
          ...
      301 caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaac
//
```

Базы метаданных NCBI

Taxonomy	Таксономическая база данных
BioProject	Содержит информацию о проектах секвенирования
BioSample	Содержит информацию об образце, из которого получена НК
Assembly	Информация о сборке, ссылки на последовательности контигов, скэффолдов, и репликонов
Genome	Информация о геномах организмов на основании имеющихся геномных сборок

RefSeq

- Автоматическая (по большей части) база данных
- Свой формат AC (содержат _)
- Значительно меньше вырожденность, чем в GenBank (меньше повторяющихся последовательностей)
- Аннотации валидируются и обновляются
- Аннотации более унифицированные, чем в GenBank
- Некоторые записи даже курируются
- Формат записей практически идентичен GenBank

Nucleotide

Для упрощения поиска нуклеотидных последовательностей через web-интерфейс и Entrez (nuccore).

- Содежит нуклеотидные записи из: INSDC (GenBank/ENA/DDBJ), RefSeq, PDB, TPA (Third Party Annotation)
- Одна и та же последовательность может встречаться много раз (например, идентичные записи INSDC и RefSeq)
- Содержит все нуклеотидные последовательности в NCBI (после слияния с GSS и EST в июле 2019).

Nucleotide collection (nr/nt)

- Содержит только последовательности и их идентификаторы в INSDC, RefSeq, PDB.
- Идентичные последовательности кластеризуются.
- Служит для поиска с помощью BLAST.

Поиск по аннотациям и загрузка данных

NCBI

1. Глобальный поиск по базам NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search)
2. E-Utilities — Web API к системе Entrez (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK25501/?term=e-utilities)
3. Batch Entrez — по файлу со списком идентификаторов (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/batchentrez)
4. FTP (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/)

ENA

1. Search & Browse (https://www.ebi.ac.uk/ena/browse)
2. Advanced search (https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/advanced-search)
3. REST URLs (https://www.ebi.ac.uk/ena/browse/data-retrieval-rest)

DDBJ

1. Search & Analysis (https://www.ddbj.nig.ac.jp/services-e.html)
2. ARSA (http://ddbj.nig.ac.jp/arsa)
3. GetEntry (http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html)
4. FTP (ftp://ftp.ddbj.nig.ac.jp/)