NGS
Анализ экзомов

Анастасия Жарикова
22 ноября 2022

azharikova89@gmail.com

Мы пройдем много форматов файлов для хранения данных

Все они будут на коллоквиуме

https://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQformat.html

Fastq формат

```
@HWI-ST992:147:D22HDACXX:3:1112:14175:15297 2:N:0:GGCTAC
TAATGGCTTTTCCAAAACGCTCCACTCTTAAAGATGTGTATAAGAGACAGCAACAACAATTA
+
8??DDDBEDHHFHJJJIJAFGIIIIIGIGEEGIIIIHBFGGEEGCGIJIFFIDIIJJIIII
```

Последовательность

Качество

```
 !"#$%&'()*+,-./0123456789:;<=>?@ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ[\]^_`abcdefghijklmnopqrstuvwxyz{|}~
 |                         |    |        |                              |                     |
33                        59   64       73                            104                   126
 0........................26...31.......40
                          -5....0........9.............................40
                               0........9.............................40
                                 3.....9.............................40
 0.2......................26...31........41

S - Sanger        Phred+33,  raw reads typically (0, 40)
X - Solexa        Solexa+64, raw reads typically (-5, 40)
I - Illumina 1.3+ Phred+64,  raw reads typically (0, 40)
J - Illumina 1.5+ Phred+64,  raw reads typically (3, 40)
    with 0=unused, 1=unused, 2=Read Segment Quality Control Indicator (bold)
    (Note: See discussion above).
L - Illumina 1.8+ Phred+33,  raw reads typically (0, 41)
```

Fastq формат

```
@NB551509:7:HHJTJBGXC:1:11101:2231:1116 1:N:0:TGACCA
CATTACGGAATGTATCATCTTCTGAATGTGAACCACATCAGATGCAATACAGAGAAACACACACTCTCCAGGCAC
+
AAAAAEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE
@NB551509:7:HHJTJBGXC:1:11101:7127:1116 1:N:0:TGACCA
TTTTTTTCCCCCTCATTACTTTGCTTTTAGCTCACTCCTTGCAGGAATCTTTCCAGCTGCCTACCTAGCCCTTCC
+
AAAAAEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEAEEEEEEEEEEEE/EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEA
@NB551509:7:HHJTJBGXC:1:11101:2059:1116 1:N:0:TGACAA
CAAATATATTAGACCTTGTCCTGATTTGGAGTATGGCAAAAAATGTGCCATATCATATTCTTACCAAAACATTTG
+
AAAAAEEEEEEEAEEEAE/EEAEEEEEEEEEEAEEEEEAEEEEEEA/6A/AE/EEAEEE6EEEE/EEEEEE6E/EEE
@NB551509:7:HHJTJBGXC:1:11101:3510:1116 1:N:0:TGACCA
AATGGTTAGAGGTTCTAAATCTTGGGACACGCAGCAAGGAGAAGCAGATGCTTCTGGATTTATGGTATTATATA
+
AAAAAEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEAEEEE
@NB551509:7:HHJTJBGXC:1:11101:8048:1117 1:N:0:TGACCA
CCCCCTTCTACAGCTTATAGAGTGTTGGATCCAGGACTGTCAGTCTCTGGAGATCCCAATCGATCCTTCCTTC
+
AAAAAEEEEEE/EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE
@NB551509:7:HHJTJBGXC:1:11101:5801:1117 1:N:0:TGACCA
CAAAACCTATAACATATTGTATACATATATATAATATATAAACACACATACACAATATAGACTTATCTTGCTCTT
+
AAAAAEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE
```

Что делать?

Нужно удалить «плохие» фрагменты чтений:

- Адаптеры
- Нуклеотиды с неудовлетворительным качеством (< 20)

Trimmomatic

http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic

В результате получаем только те чтения, качество которых нас устраивает
С ними можно смело работать дальше!

Что делать дальше?

Дано:
- «очищенные» чтения хорошего качества (fastq)
- Последовательность референсного генома (fasta)

Задача:
Каждому чтению найти свое место на геноме - картирование

Картирование

Программы:
- bowtie
- bwa
- hisat2

Есть много других!

Шаг 0. Подготовка референса: индексирование
Для каждой программы свой индекс!

Шаг следующий – картирование чтений на референс
Получаем .sam или .bam

sam

Содержит заголовок и информацию о картировании чтений
http://samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf

```
SRR2776256.15395984     0       chr12   9822304 60      100M    *       0
0       AGATCACTCATAGAAACTGGAGGCAAAATGCATGACAGTAACAATGTGGAGAAAGACATTACACCATCTGAA
TTGCCTGCAAAGCCAGGTAAGAAGCTGG     ?@@DFFFDHHHHHJIJIHEGFAGHEG;FCFDFHI<GIJCFFDH?<<00
?98929/0.=B:8B78CC=CCEAAH=)=ECCB;7B;>@362@;@@C@CD359    AS:i:-4 XN:i:0  XM:i:1
XO:i:0  XG:i:0  NM:i:1  MD:Z:83C16       YT:Z:UU NH:i:1
SRR2776256.23192736     16      chr12   9822307 60      100M    *       0
0       TCACTCATAGAAACTGGAGGCAAAATGCATGACAGTAACAATGTGGAGAAAGACATTACACCATCTGAATTG
CCTGCAAACCCAGGTAAGAAGCTGGGCT     CCCC>;CEECEEEC@=DBC>ACHEHCD@=;G@GGGEHF=C<>IHFFGB
HGCDDGHGDFD?HGHEGGHFFGFA>GFH@HFADCHEHHBFHHHFFDDDD@@@    AS:i:0  XN:i:0  XM:i:0
XO:i:0  XG:i:0  NM:i:0  MD:Z:100         YT:Z:UU NH:i:1
```

SRR2776256.15395984 – ID чтения
chr12 9822304 - хромосома и координата, куда «легло» чтение
100M – CIGAR: сжато кодирует информацию о выравнивании чтения
NM:i – расстояние до генома
NH:I – количество картирований для данного чтения

samtools

http://www.htslib.org/doc/samtools.html

Этот пакет поможет отсортировать и индексировать .bam, узнать покрытие фрагмента генома и многое другое

Читайте мануал и подсказки к заданию!

Помните, что bam файлы должны быть отсортированы по координате и индексированы

Дублированные чтения

Бывают ПЦР-дубли и оптические
Дубли можно удалять, можно маркировать

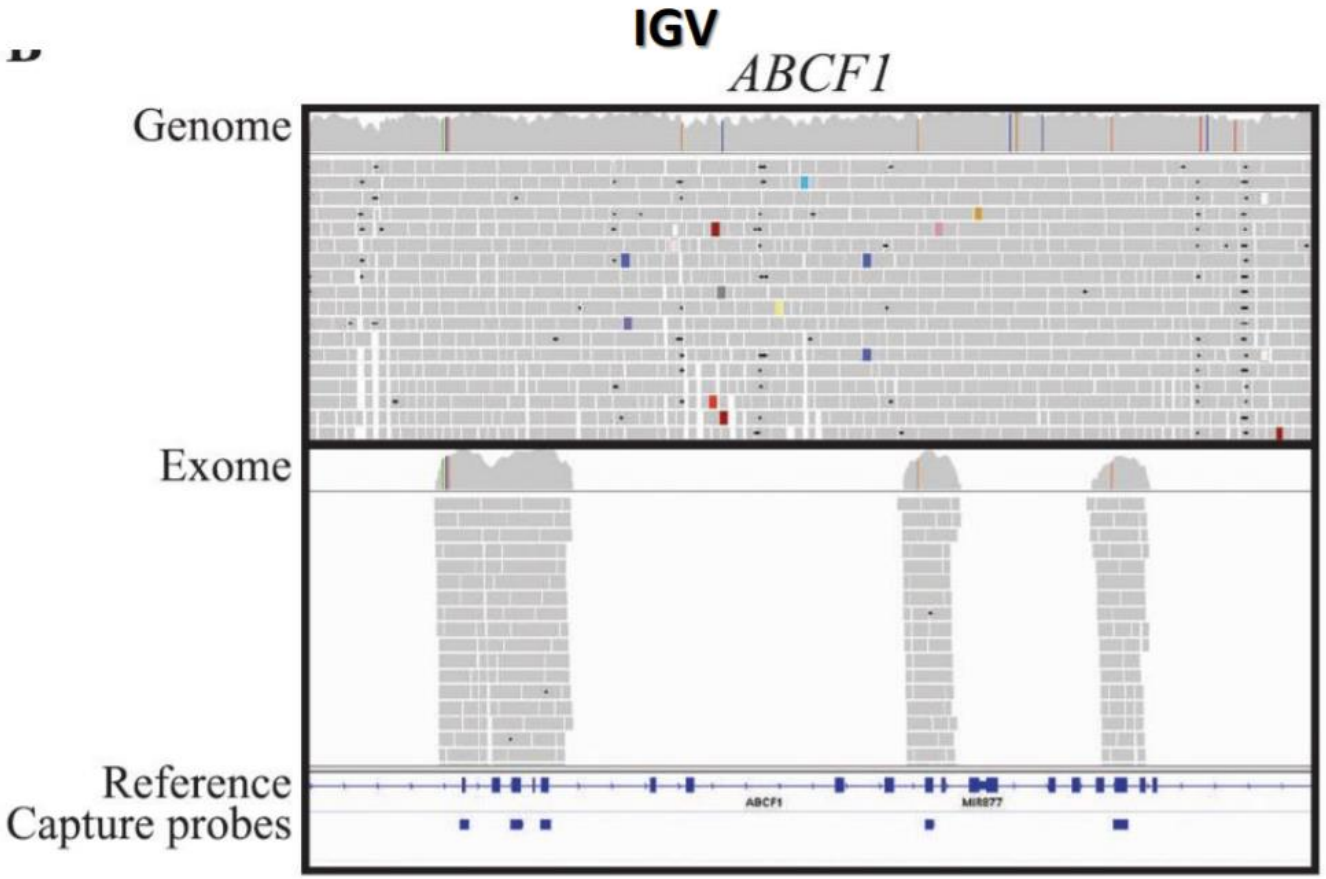
```
$ samtools view foo.bam
SRR7012201.2594959      0       chr1    3000061 30      50M     *       0       0
SRR7012201.2594959      0       chr1    3000061 30      50M     *       0       0
(base)

$ samtools markdup foo.bam - | samtools view
SRR7012201.2594959      0       chr1    3000061 30      50M     *       0       0
SRR7012201.2594959      1024    chr1    3000061 30      50M     *       0       0
```

IGV

https://software.broadinstitute.org/software/igv/download

Программа для визуализации bam файлов с выравниваниями чтений на референсный геном.
Нужно установить себе на компьютер.
Принимает на вход bam (сортированный) + .bam.bai

https://www.youtube.com/watch?v=E_G8z_2gTYM&t=76s

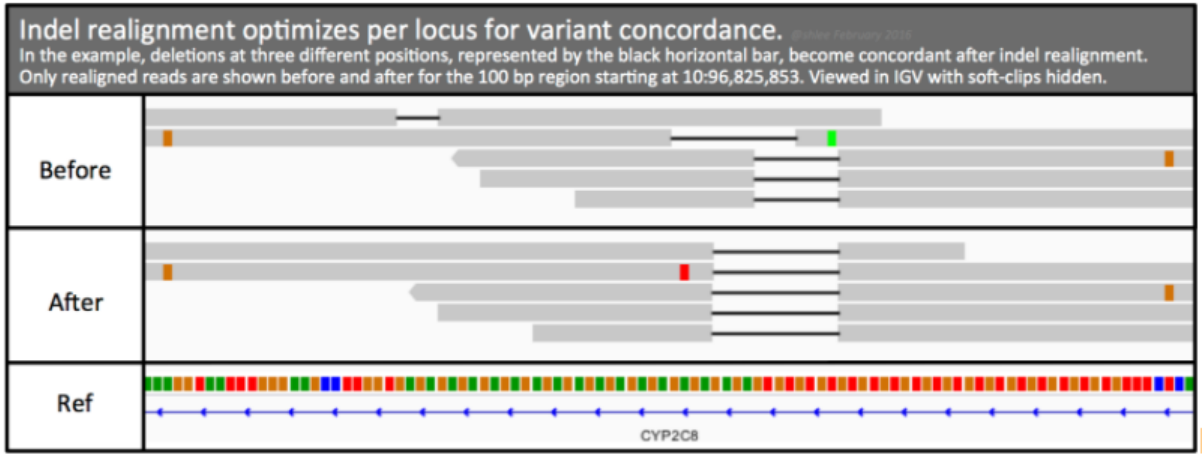


Emily M. Coonrod, Jacob D. Durtschi, Rebecca L. Margraf, and Karl V. Voelkerding (*2013*) Developing Genome and Exome Sequencing for Candidate Gene Identification in Inherited Disorders: An Integrated Technical and Bioinformatics Approach. Archives of Pathology & Laboratory Medicine: March 2013, Vol. 137, No. 3, pp. 415-433. 28

GATK3

https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/sections/360007226651-Best-Practices-Workflows

Indel realignment



Поиск вариантов

.bam

.gvcf

```
#CHROM  POS ID  REF ALT QUAL    FILTER  INFO    FORMAT  NA12878
20  10001567    .   A   <NON_REF>   .   .   END=10001616    GT:DP:GQ:MIN_DP:PL  0/0:38:99:34:0,101,11
20  10001617    .   C   A,<NON_REF> 493.77  .   BaseQRankSum=1.632;ClippingRankSum=0.000;DP=38;Excess
20  10001618    .   T   <NON_REF>   .   .   END=10001627    GT:DP:GQ:MIN_DP:PL  0/0:39:99:37:0,105,15
20  10001628    .   G   A,<NON_REF> 1223.77 .   DP=37;ExcessHet=3.0103;MLEAC=2,0;MLEAF=1.00,0.00;RAW_
20  10001629    .   G   <NON_REF>   .   .   END=10001660    GT:DP:GQ:MIN_DP:PL  0/0:43:99:38:0,102,12
```

.vcf

```
chr1  28563 . A G 139.90  PASS  AC=2;AF=1.00;AN=2;DP=5;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC=2;MLEAF=1.00;MQ
chr1  49298 . T C 515.77  PASS  AC=2;AF=1.00;AN=2;DP=17;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC=2;MLEAF=1.00;M
chr1  52238 . T G 716.77  PASS  AC=2;AF=1.00;AN=2;DP=22;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC=2;MLEAF=1.00;M
chr1  55926 . T C 120.90  PASS  AC=2;AF=1.00;AN=2;DP=5;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC=2;MLEAF=1.00;MQ
chr1  61442 . A G 314.77  PASS  AC=2;AF=1.00;AN=2;DP=10;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC=2;MLEAF=1.00;M
chr1  61947 . C T 397.77  PASS  AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=3.01;ClippingRankSum=0.00;DP=33;Excess
chr1  61987 . A G 703.77  PASS  AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=0.426;ClippingRankSum=0.00;DP=42;Exces
chr1  61989 . G C 703.77  PASS  AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=0.125;ClippingRankSum=0.00;DP=41;Exces
chr1  69511 . A G 358.77  PASS  AC=2;AF=1.00;AN=2;DP=13;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC=2;MLEAF=1.00;M
chr1  83084 . T A 204.80  PASS  AC=2;AF=1.00;AN=2;DP=7;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC=2;MLEAF=1.00;MQ
```

.filt.vcf

```
##FORMAT=<ID=HQ,Number=2,Type=Integer,Description="Haplotype Quality">
#CHROM POS     ID        REF    ALT     QUAL FILTER INFO                              FORMAT      NA00001        NA00002        NA000
20    14370   rs6054257 G      A       29   PASS   NS=3;DP=14;AF=0.5;DB;H2           GT:GQ:DP:HQ 0|0:48:1:51,51 1|0:48:8:51,51 1/1:4
20    17330   .         T      A       3    q10    NS=3;DP=11;AF=0.017               GT:GQ:DP:HQ 0|0:49:3:58,50 0|1:3:5:65,3   0/0:4
20    1110696 rs6040355 A      G,T     67   PASS   NS=2;DP=10;AF=0.333,0.667;AA=T;DB GT:GQ:DP:HQ 1|2:21:6:23,27 2|1:2:0:18,2   2/2:3
20    1230237 .         T      .       47   PASS   NS=3;DP=13;AA=T                   GT:GQ:DP:HQ 0|0:54:7:56,60 0|0:48:4:51,51 0/0:6
20    1234567 microsat1 GTC    G,GTCT  50   PASS   NS=3;DP=9;AA=G                    GT:GQ:DP    0/1:35:4       0/2:17:2       1/1:4
```

Основные шаги

- Проверка качества чтений
- Триммирование
- Проверка качества триммированных чтений
- Картирование чтений на геном (sam)
- Конвертация sam в bam
- Сортировка bam
- Индексирование bam
- Поиск вариантов (vcf)
- Фильтрация вариантов

?Аннотация?

ANNOVAR
https://doc-openbio.readthedocs.io/projects/annovar/en/latest/
refgene
dbsnp
1000 genomes
GWAS
Clinvar

Далее – клиническая интерпретация

Bedtools

http://bedtools.readthedocs.io/en/latest/index.html

https://media.readthedocs.org/pdf/bedtools/latest/bedtools.pdf

Очень хороший инструмент для работы с геномными интервалами

Более 35 опций + параметры