Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ
II курс

Сборка чтений

С.А. Спирин
12 декабря 2023

Проблема сборки

Сборка на уже известный геном

(например, чтобы изучать различия между ДНК разных людей)

Сборка *de novo*

(например, хотим изучать геном вида, чей геном пока не секвенирован)

Случайное покрытие

Все платформы «второго поколения» включают подготовку **случайных** фрагментов генома и их амплификацию (размножение).

В результате полученные чтения (они же прочтения, они же риды) также представляют собой набор случайных фрагментов заданной длины.
В идеальном случае вероятность стать началом чтения одинакова для всех позиций в геноме (а на практике это не всегда так).

Сборка на геном

Пусть длина чтения 100, размер генома 1 млн п.н. и мы получили 50 000 чтений. Значит, среднее покрытие = 5. Хватит ли этого, чтобы собрать весь геном?

Сборка на геном

Пусть длина чтения 100, размер генома 1 млн п.н. и мы получили 50 000 чтений. Значит, среднее покрытие = 5. Хватит ли этого, чтобы собрать весь геном?

Количество чтений, покрывающих данный нуклеотид, распределено по Пуассону:

$$P(k) = \exp(-\lambda)\,\lambda^k/k!$$

где k – число чтений, λ – среднее покрытие (в нашем случае $\lambda = 5$).

Значит, вероятность того, что на нуклеотид нее попадёт **ни одного** чтения, равна $P(0) = \exp(-\lambda)$. При $\lambda = 5$ эта вероятность равна $1/\exp(5) \approx 1/148$.

Сборка на геном

Пусть длина чтения 100, размер генома 1 млн п.н. и мы получили 50 000 чтений. Значит, среднее покрытие = 5. Хватит ли этого, чтобы собрать весь геном?

Ответ: вряд ли. Чтения ложатся случайно, примерно каждый 150-ый нуклеотид ими не покроется. То есть почти наверняка более 6 000 нуклеотидов не будет покрыто, и при самой идеальной сборке получится не целый геном, а много кусков, разделённых непокрытыми участками.

При таком размере генома нужно не менее чем 15-кратное среднее покрытие, чтобы можно было рассчитывать собрать геном полностью!

Ещё проблема – повторы. Не всегда чтение однозначно «ложится» на геном.

Третья проблема – время (при большом покрытии большого генома)

Сборка на геном

Главная проблема, решаемая разработчиками алгоритмов – время.
Два основных подхода: хэш-таблицы и суффиксные деревья (преобразование Барроуза – Уилера).

Имеется несколько десятков программ, часть из них платные, часть – свободно распространяемые.

Это вы уже знаете :)

Сборка *de novo*

Есть два основных типа алгоритмов сборки:
- OLC = overlap-layout-consensus
- de Bruijn graph

Алгоритмы OLC работают непосредственно с чтениями.

Алгоритмы, использующие граф де Брёйна, сначала составляют список *k*-меров (слов длины *k*, например *k* = 31), встретившихся в чтениях.

Недостатки:

теряется часть информации

Достоинства:

сильно экономится память (большинство *k*-меров встречается во многих ридах)

упрощается работа с повторяющимися участками

есть возможность отсеивать ошибки уже на начальной стадии

Алгоритмы сборки OLC

Программы: Phrap, Cap3, Tigr, …

Read1 - TTTGGTGCTCTTCGAAAAGGGATCTTCGAGAGAGATCTCGCGATAAGGTTG

Read2 - GAGAGAGATCTCGCGATAAGGTTGAAGTAGAAAAATGTGTGTGGTGAA

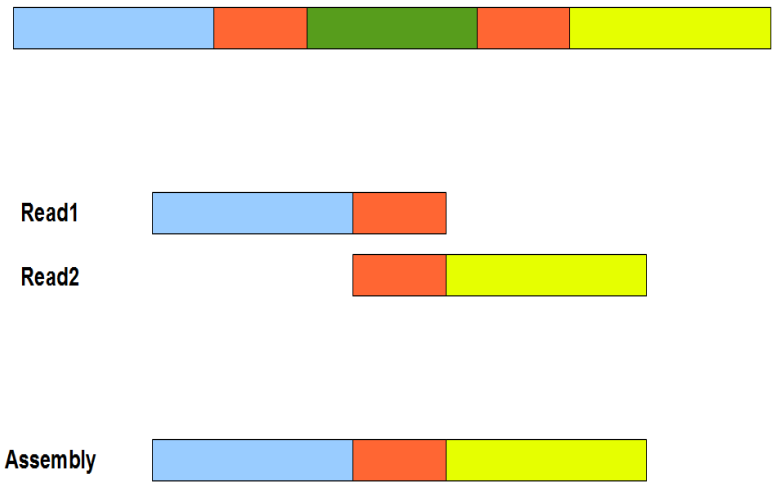
overlap

TTTGGTGCTCTTCGAAAAGGGATCTTCGAGAGAGATCTCGCGATAAGGTTG

GAGAGAGATCTCGCGATAAGGTTGAAGTAGAAAAATGTGTGTGGTGAA

http://www.homolog.us/Tutorials/Tut-Img/Set1/fig2.png

Проблема повторов



http://www.homolog.us/Tutorials/Tut-Img/Set1/fig3.png

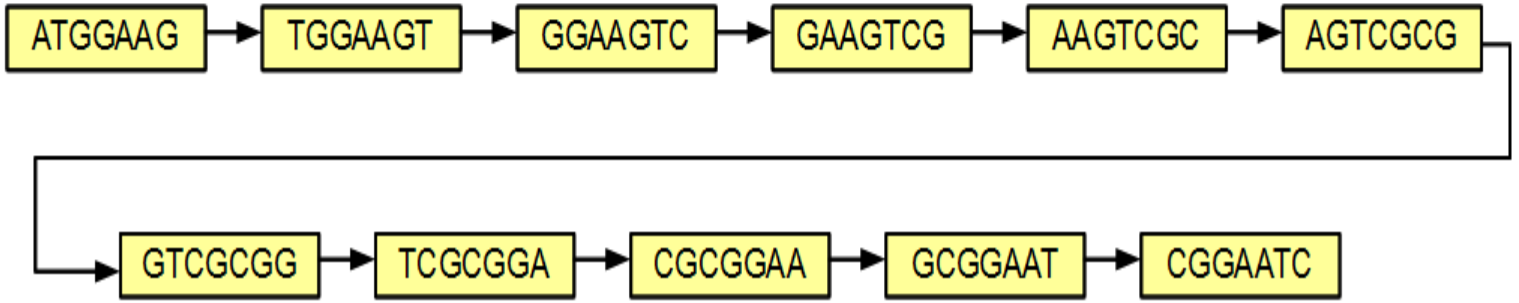
Графы де Брёйна

sequence ATGGAAGTCGCGGAATC

7mers

ATGGAAG
TGGAAGT
GGAAGTC
GAAGTCG
AAGTCGC
AGTCGCG
GTCGCGG
TCGCGGA
CGCGGAA
GCGGAAT
CGGAATC

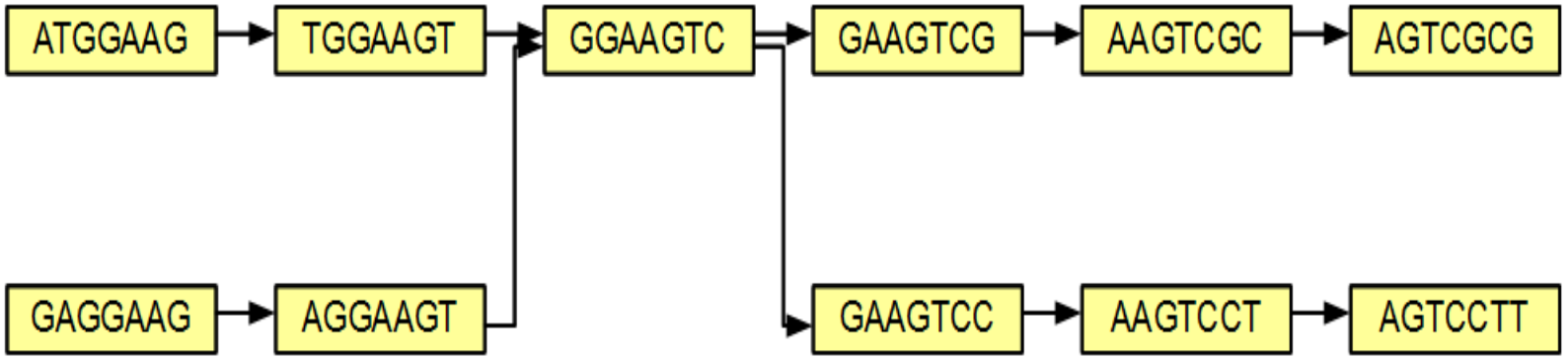
de Bruijn graph



http://www.homolog.us/Tutorials/index.php?p=1.4&s=1

Графы де Брёйна

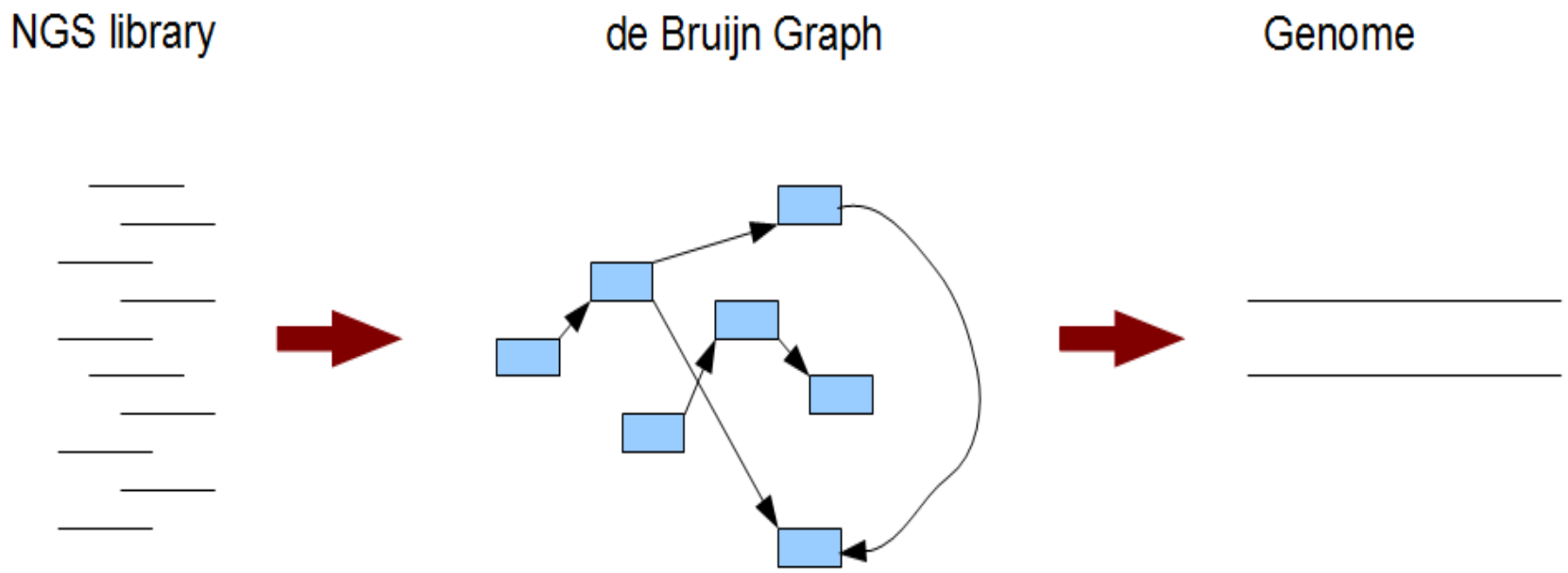
ATGGAAGTCGCG
GAGGAAGTCCTT



http://www.homolog.us/Tutorials/index.php?p=1.4&s=1

Графы де Брёйна

Десятки программ: SPAdes, Velvet, ABySS, Trinity, Oases, SOAPdenovo, …



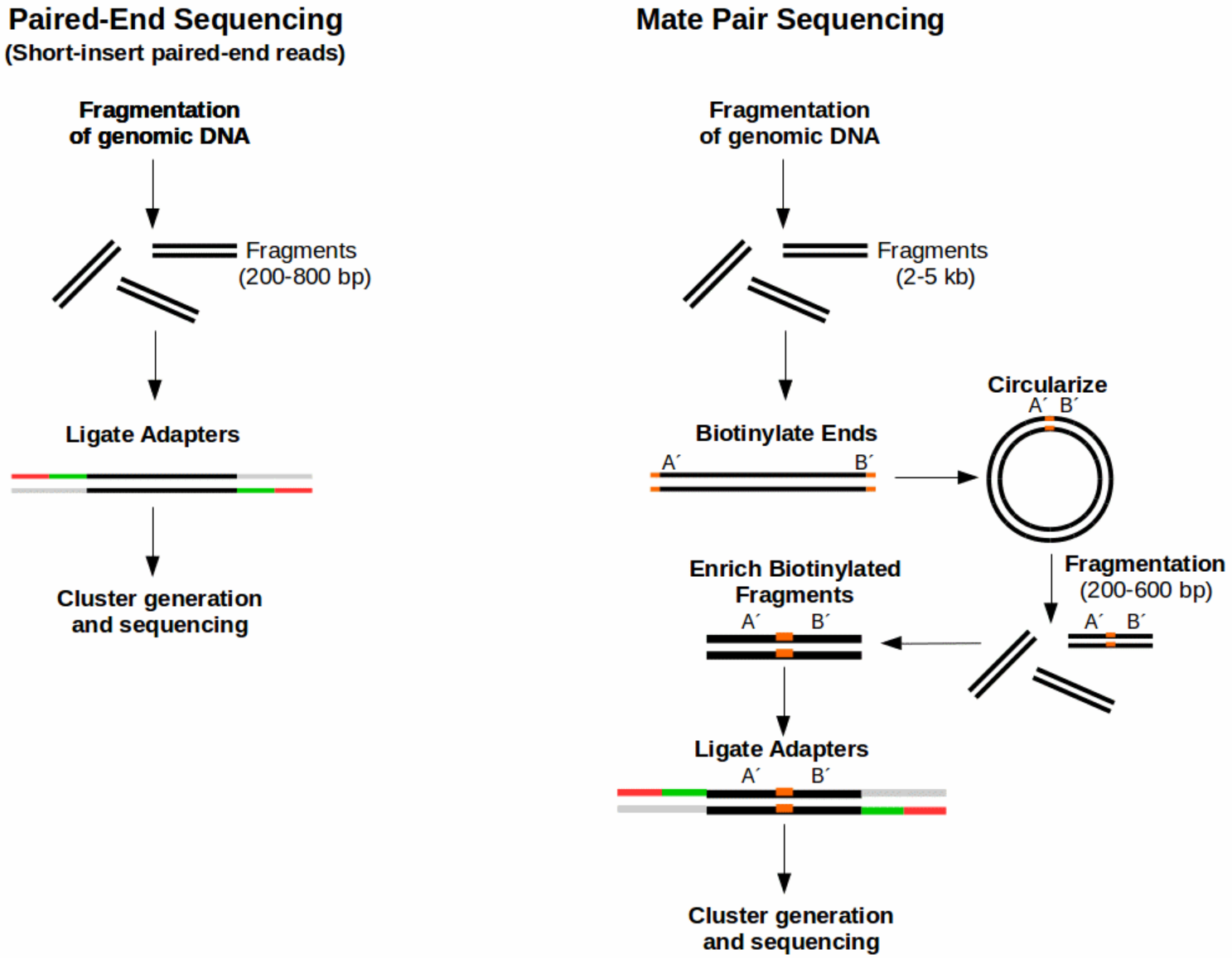
http://www.homolog.us/Tutorials/index.php?p=1.4&s=1

Pair-end reads и mate pair reads

Технология Illumina предполагает чтение заданного числа (например, 100) нуклеотидов с двух концов случайного фрагмента генома небольшой (200–600 п.н.) длины.
В выходном файле последовательности концов одного и того же фрагмента некоторым способом ссылаются друг на друга. Это и есть парноконцевые чтения (pair-end reads).

Имеется особый способ приготовления библиотеки для секвенирования, при котором концы секвенируемых фрагментов в геноме удалены друг от на большее расстояние (2–5 тысяч п.н.).
При таком способе секвенирования парноконцевые чтения называются «встречноконцевыми» (mate pair reads).

Большинство программ сборки могут учитывать «парность» чтений.



https://www.ecseq.com/support/ngs/what-is-mate-pair-sequencing-useful-for

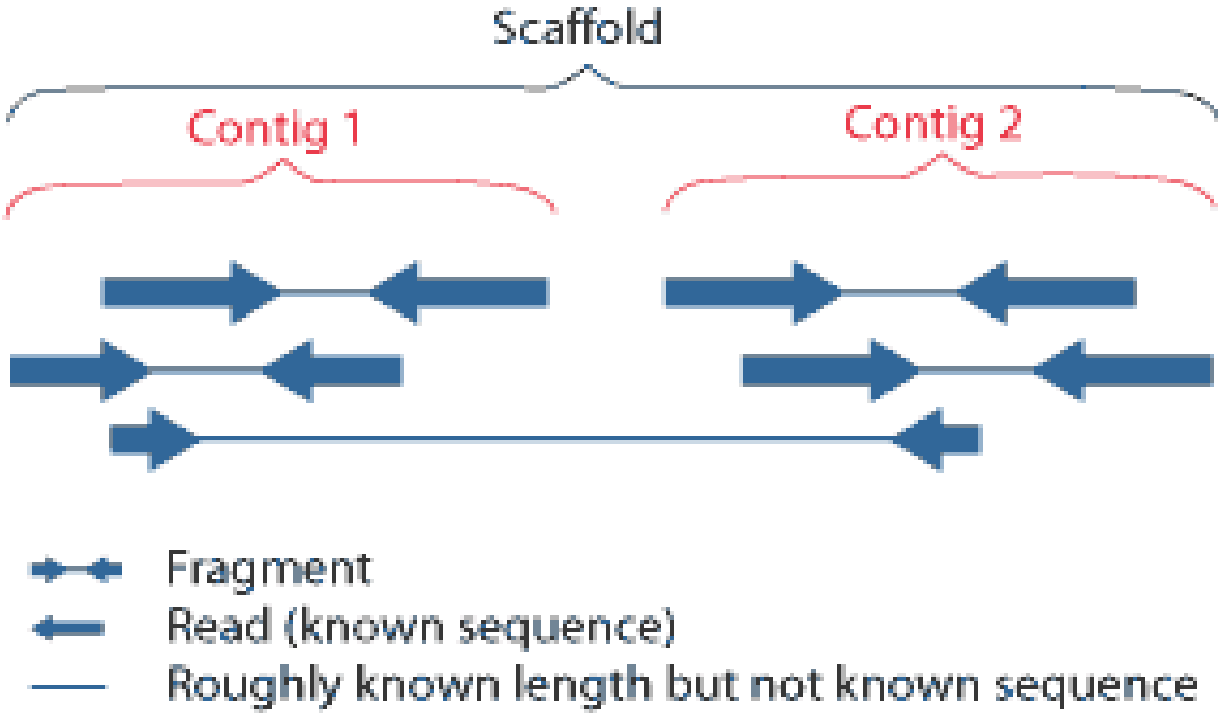
Результат сборки

Результат – так называемые «контиги» (contigs),
то есть непрерывные участки генома, однозначно выводимые из чтений

Для прокариот часто удаётся собрать весь геном (но редко «полностью автоматически» – обычно нужны дополнительные усилия, например секвенирование плохо покрытых участков по Сэнгеру).
Для эукариот, как правило, «геномом» объявляется свалка контигов, тем или иным способом приписанных к известным хромосомам.

Кроме контигов, бывают ещё «скаффолды» (scaffolds).
Скаффолд – это последовательность контигов, между которыми остаются неизвестные участки (источник такой информации – парноконцевые чтения).

Контиги и скаффолды



https://en.wikipedia.org/wiki/Scaffolding_(bioinformatics)#/media/File:PET_contig_scaffold.png

```
LOCUS       MU862503               33801 bp    DNA     linear   CON 17-NOV-2023
DEFINITION  UNVERIFIED_CONTAM: Salix arbutifolia isolate SAR-KD-M1 unplaced
            genomic scaffold scaffold2257, whole genome shotgun sequence.
ACCESSION   MU862503 AWYI01000000
VERSION     MU862503.1
DBLINK      BioProject: PRJNA211611
            BioSample: SAMN10688929
KEYWORDS    WGS; UNVERIFIED; UNVERIFIED_CONTAMINANT.
SOURCE      Salix arbutifolia
  ORGANISM  Salix arbutifolia
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliopsida; eudicotyledons; Gunneridae;
            Pentapetalae; rosids; fabids; Malpighiales; Salicaceae; Saliceae;
            Salix.
REFERENCE   1  (bases 1 to 33801)
  AUTHORS   Zhang,J., Wang,Y., Zeng,Y., He,C., Rao,G. and Wang,Z.
  TITLE     The genome of Salix arbutifolia, an important member of the
            Salicaceae family
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 33801)
  AUTHORS   Zhang,J., Wang,Y., Zeng,Y., He,C., Rao,G. and Wang,Z.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (18-SEP-2013) Research Institute of Forestry, Chinese
            Academy of Forestry, No. 2 Dongxianfu, Xiangshan Road, Haidian
            District, Beijing, Beijing 100091, China
COMMENT     GenBank staff has noted that the sequence(s) may be contaminated.

            ##Genome-Assembly-Data-START##
            Assembly Method       :: SOAPdenovo v. 2.01
            Genome Coverage       :: 166x
            Sequencing Technology :: Illumina HiSeq 2000
            ##Genome-Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..33801
                     /organism="Salix arbutifolia"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /submitter_seqid="scaffold2257"
                     /isolate="SAR-KD-M1"
                     /db_xref="taxon:75699"
                     /chromosome="Unknown"
                     /country="China: Kuandian, Dandong, Liaoning Province"
CONTIG      join(AWYI01042789.1:1..1286,gap(6516),AWYI01042790.1:1..4274,
            gap(3069),AWYI01042791.1:1..18656)
//
```

Результат сборки

Например, т.н. «референсная» версия генома человека (GRCh38.p14, февраль 2022) состоит из 470 скаффолдов, генома домовой мыши (GRCm39) – из 101 скаффолда, а генома лошади (EquCab3.0) – из 4700 скаффолдов.

Контигов больше: для человеческого генома их 996, для мышиного 305, для лошадиного 10986.

Показатели качества сборки

Самый популярный – N50.
Это наибольшее число такое, что контигами длины > N50 покрыто 50% генома.

При этом чаще всего за длину генома принимают суммарную длину контигов.

Используется также N90 (аналогично – наименьшая длина контига из минимального набора, покрывающего 90% генома).

Есть ещё показатели L50 и L90 (минимальное **число** контигов, покрывающих, соответственно, 50% и 90% генома).

То есть минимальный набор, покрывающий 50% генома, состоит из L50 контигов, чья длина ≥ N50

Показатели качества сборки

Например, для человеческого, мышиного и лошадиного референсных геномов показатели такие:

Геном	N50 (bp)	L50
Homo sapiens	57 879 411	18
Mus musculus	59 462 871	15
Equus caballus	1 502 753	462