对 NGS 数据的 ChIP-Seq 分析

生信 2001 张子栋

2023 年 6 月 15 日

摘要

目录

1 项目材料及目的

1.1 PubMed 数据库中搜索数据文献

1.1.1 选定研究物种

选定研究物种为线虫（*nematode*, *Caenorhabditis Elegans*）。

1.1.2 在 PubMed 中检索文献

在 PubMed (nih.gov) 中搜索关键字 Caenorhabditis Elegans ChIP-seq. 并选定文献为 The hypoxia response pathway promotes PEP carboxykinase and gluconeogenesis in C. elegans (Nat Commun. 2022 Oct 18;13(1):6168. DOI: 10.1038/s41467-022-33849-x).

这篇文章研究的内容是在线虫中，缺氧应答通路如何通过激活 HIF-1 转录因子来调节 PEP 羧激酶和糖异生的基因表达和代谢流动，从而提高对氧化应激和缺氧应激的抵抗力。PEP 羧激酶是糖异生过程中的限速酶，可以将草酰乙酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸。

作者利用基因组编辑、转录组分析、代谢组分析和行为实验等方法来揭示 HIF-1 直接或间接调控的上百个基因的功能。这篇文章使用 ChIP-Seq 的目的是为了发现 HIF-1 直接调控的基因，并分析它们在缺氧应答通路中的功能。

2 数据与方法

2.1 NGS 数据获取

文章中的 ChIP-seq 数据上传至 NIH/NCBI 数据库，登录号为 GSE173333。SRA 数据库对应登录号为 SRP316378 ，并最终选择 SRR14325856 和 SRR14325854 作为研究数据。

使用以下命令下载数据：

```
1 wget https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra-reads-be/fastq?acc=
    SRR14325856
```

2.2 线虫参考基因组

2.2.1 WormBase

WormBase 是一个专门收录线虫的基因组信息的数据库，它支持使用线虫作为模式生物的研究者，提供了线虫的基因组序列、注释、变异、表达、互作等数据。WormBase 还包括一个子项目 WormBase ParaSite，它收录了其他线虫和扁形动物寄生虫的基因组信息。参考基因组是一个完整的线虫基因序列，基因组注释文件是对参考基因组中的基因、转录本、外显子等特征的描述。

通过 WormBase : Nematode Information Resource 网站获取线虫参考基因组。

2.3 R 包及其他软件

2.3.1 FastQC

FastQC 是一个质量控制分析工具，用于检测高通量测序数据中的潜在问题。它提供了一系列的分析模块，可以帮助快速了解数据是否有任何需要注意的问题，以便进行进一步的分析。FastQC 可以处理 fastq 或 bam 格式的原始序列文件，并生成一个报告，总结分析结果。

FastQC 的报告是一个 HTML 文件，包含了各种分析模块的结果和图表。FastQC 的报告中，每个分析模块都有一个结果图和一个状态图标。状态图标表示该模块的结果是否正常（绿色）、需要注意（黄色）或有问题（红色）。

FastQC 有以下几个分析模块：

- 基本统计：显示输入文件的名称、编码类型、总读数、读长和 GC 含量等信息。
- 每碱基质量分布：显示每个位置的平均质量得分，以及上下四分位数的范围。
- 每序列质量分布：显示每个序列的平均质量得分的频率分布，以及对应的合格率。
- 每碱基序列内容：显示每个位置的 A、T、G 和 C 的比例，以及与理论值的偏差。
- 每序列 GC 含量：显示每个序列的 GC 含量的频率分布，以及与整体 GC 含量的比较。
- 每碱基 N 含量：显示每个位置包含 N（未知）碱基的比例。
- 序列长度分布：显示不同长度序列出现的频率，以及平均长度和最大长度。
- 序列重复度：显示不同重复次数序列出现的频率，以及总重复度和最大重复度。
- 过表示 kmer 内容：显示在所有序列中过表达（出现次数超过预期）或者欠表达（出现次数低于预期）的 kmer（一般为 7 或 8 bp），以及它们在序列中出现的位置和比例。
- adapter 检测：检测输入文件中是否包含常见 adapter 序列，并显示它们在不同位置出现的比例。

FastQC 命令格式

```
fastqc [-o output dir] [--(no)extract] [-t thread num] [-f fastq|bam|sam] [-c contaminant file] seqfile1.. seqfileN
```

- 其中：
  - `-o` 用来指定输出文件的所在目录。
  - `--(no)extract` 用来控制是否解压缩输出的 `.zip` 文件。
  - `-t` 用来选择程序运行的线程数，即同时处理的文件数目。这样可以提高 fastqc 的运行速度，但也会占用更多的内存资源。
  - `-f` 用来强制指定输入文件格式，默认会自动检测。
  - `-c` 用来指定污染物文件，用于检测序列中是否含有不期望的序列。
  - `seqfile1.. seqfileN` 表示可以输入多个序列文件，支持 `fastq`，`bam` 和 `sam` 格式。

2.3.2 Trommomatic

Trimmomatic 是一个快速的多线程命令行工具，于 2014 年首次发表在 Bioinformatics 期刊上，它可以用来整理和裁剪 Illumina (FASTQ) 数据以及删除 adapter。

Trimmomatic 有两种过滤模式，分别对应单末端（SE）和双末端（PE）测序数据，同时支持 `gzip` 和 `bzip` 压缩文件。它还支持 `phred-33` 和 `phred-64` 格式互相转化，目前多数 Illumina 测序数据为 `phred-33` 格式。

- Trimmomatic 的主要功能包括：
  - 去除 adapter 序列以及测序中其他特殊序列。
  - 采用滑动窗口的方法，切除或者删除低质量碱基。
  - 去除头（尾）部低质量以及 N 碱基过多的 reads.
  - 截取固定长度的 reads.
  - 丢掉小于一定长度的 reads.
  - phred 质量值转换。

Trimmomatic 命令格式 Trimmomatic 的命令格式根据使用的是双端模式（PE）还是单端模式（SE）而不同。一般来说，命令格式为：

```
java -jar <trimmomatic.jar> PE|SE [-threads <threads>] [-phred33|-
    phred64] [-trimlog <logFile>] <input 1> [<input 2>] <output 1> [<
    output 2>] <step 1> ⋯
```

- 其中：
  - `-jar <trimmomatic.jar>` 是运行 Trimmomatic 的 Java 命令，需要指定 `trimmomatic.jar` 文件的路径。
  - `PE|SE` 如果是双端模式，需要提供两个输入文件和两个输出文件；如果是单端模式，只需要提供一个输入文件和一个输出文件。
  - `[-threads <threads>]` 是可选参数，用于设置线程数，默认为 1。
  - `[-phred33`-phred64]| 是可选参数，用于设置碱基质量值的编码系统，默认为 phred64。自 v0.32 版本之后，Trimmomatic 可以自动识别是 phred33 还是 phred64。
  - `[-trimlog <logFile>]` 是可选参数，用于设置日志文件的路径和名称。日志文件记录了每个 reads 的修剪情况。
  - `<input 1> [<input 2>]` 是输入文件的路径和名称，可以是压缩或非压缩的 FASTQ 文件。如果是双端模式，需要提供两个输入文件；如果是单端模式，只需要提供一个输入文件。
  - `<step 1>` ⋯ 是指定要执行的修剪步骤和参数。每个步骤之间用空格隔开。目前支持以下几种步骤：

    * ILLUMINACLIP: 去除接头序列
    * SLIDINGWINDOW: 滑动窗口裁剪低质量碱基
    * MAXINFO: 基于信息熵裁剪低质量碱基
    * LEADING: 去除开头低质量碱基
    * TRAILING: 去除结尾低质量碱基
    * CROP: 裁剪 reads 到指定长度
    * HEADCROP: 去除 reads 开头指定长度
    * MINLEN: 过滤掉小于指定长度的 reads

2.3.3 Bowtie2

Bowtie 是一个超快的，存储高效的短序列片段比对程序。它能够将短的 DNA 序列片段（reads）比对到人类基因组或其他较大的参考基因组上。它有两个版本：Bowtie 和 Bowtie2。Bowtie2 是 Bowtie 的升级版，能够比对更长的 reads，支持局部比对和剪接性比对。

Bowtie 的使用也需要先对参考基因组建立索引，然后再进行比对。比对的结果是一个 SAM 或 BAM 格式的文件，可以用 Samtools 进行后续的处理。

2.3.4 Samtools

Samtools 是一个用于处理 SAM 或 BAM 格式的比对结果的软件包，它可以实现以下功能：

- 转换 SAM 和 BAM 格式，例如：

```
samtools view -bS in.sam > out.bam
```

- 排序和合并 BAM 文件，例如：

```
samtools sort in.bam -o out.sorted.bam
```

- 统计比对结果，例如：

```
samtools flagstat in.bam
```

2.3.5 Bedtools

Bedtools 是一个用于处理基因组数据的软件，它可以对 BED、BAM、GFF 等格式的文件进行各种操作，如求交集、并集、覆盖度、分组统计等。Bedtools 的主要功能有：

- `genomecov`：计算基因组的覆盖度，即某些特征覆盖了基因组的哪些部分。
- `groupby`：对文件或流按照指定的列进行分组，并对另一列进行统计，类似于数据库的“group by”语句。
- `intersect`：计算两个文件或流中的特征的交集，即哪些特征在两个文件或流中都存在。
- `merge`：合并两个文件或流中的特征，即将有重叠的特征合并为一个特征。
- `sort`：对文件或流按照某些列进行排序，以便于其他操作。

2.3.6 MACS2

MACS 是一款用于分析 ChIP-seq 数据的软件，它可以用来寻找转录因子或组蛋白修饰在基因组上的结合位点。MACS 的基本原理是利用 ChIP-seq 数据中的片段长度和富集度来估计结合位点的位置和显著性。

MACS 的使用需要安装 Python 和一些依赖包，具体的安装方法可以参考官方文档。MACS 的主要命令是`macs2 callpeak`，它可以用来从 ChIP-seq 数据中调用结合位点。基本语法是：

命令格式

```
macs2 callpeak -t <ChIP-seq文件> -c <对照文件> -f <文件格式> -g <基因组大小> -n <输出文件名> [其他参数]
```

- 其中:
  - `-t` 和 `-c` 参数分别指定 ChIP-seq 文件和对照文件，它们可以是 BAM, SAM, BED 或 ELAND 格式。
  - `-f` 参数指定文件格式。
  - `-g` 参数指定基因组大小
  - `text` 参数指定输出文件名
  - 其他参数可以根据需要调整，例如 `text` 参数可以设置 p 值阈值，`-B` 参数可以输出 bedGraph 格式的信号强度文件等。

2.3.7 MEME***

MEME 是一款用于分析蛋白质，DNA 和 RNA 中的序列 Motif 的软件，它可以用来寻找转录因子结合位点的共有序列特征。MEME 的基本原理是利用最大期望算法（Expectation Maximization）来从一组序列中识别出重复出现的 Motif。MEME 提供了在线版和本地版。

命令格式：

```
meme <序列文件> -o <输出目录> [其他参数]
```

- 其中：
  - < 序列文件 > 指定输入的序列文件，它可以是 FASTA 格式或 MEME 格式。
  - < 输出目录 > 指定输出结果的目录，它必须不存在或为空。
  - 其他参数可以根据需要调整，例如 `-nmotifs` 参数可以设置要发现的 Motif 个数，`-minw` 参数可以设置 Motif 的最小长度，`-maxw` 参数可以设置 Motif 的最大长度等。

2.3.8 ChIPseeker

ChIPseeker 是一个 R 包，用于 ChIP 峰值的注释、比较和可视化。它实现了检索峰值周围最近的基因、注释峰值的基因组区域、估计 ChIP 峰值数据集之间重叠的显著性的统计方法，并将 GEO 数据库纳入其中，以供比较。

命令格式

```
anno <- annotatePeak(peak, tssRegion=c(-3000, 3000), TxDb=
    txdb)
```

其中：

- `TxDb` 可以使用 `makeTxDbFromGFF()` 命令从基因组注释文件获得。
- `peak` 是 Peak Calling 产生的 `.bed` 文件。

3 分析流程

3.1 使用 FastQC 分析数据

1. 创建目录用于存放输出结果：`mkdir fastqc.test`
2. 使用 FastQC 命令：`fastqc -o fastqc.test/ -t 4 SRR14325856.fastq.gz`
3. 输出文件：

```
fastqc.test/
|-- SRR14325853_fastqc.html
|-- SRR14325853_fastqc.zip
|-- SRR14325854_fastqc.html
|-- SRR14325854_fastqc.zip
|-- SRR14325856_fastqc.html
|-- SRR14325856_fastqc.zip
```

FastQC 结果：

- 每序列 GC 含量略微偏离正态分布。
- 过表达序列为 adapter.

3.2 使用 Trimmomatic 去除 adapter 序列

1. 在终端中输入以下命令，文件路径均使用绝对路径：

```
java -jar /home/software/Trimmomatic-0.39/trimmomatic-0.39.jar
    SE -phred33 -trimlog test.log.txt /Bioinfo/ZhZidong/
    SRR14325856.fastq /Bioinfo/ZhZidong/SRR14325856.processed.
    fastq ILLUMINACLIP:/home/software/Trimmomatic-0.39/adapters/
    TruSeq3-SE.fa:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 MINLEN:25
```

2. 生成 `SRR14325856.processed.fastq` 文件。

- 根据 FastQC 结果：

- 每序列 GC 含量略微偏离正态分布。
- 序列长度分布集中于 49 bp，相比原数据，多了 25 bp 长度的序列。
- 多增的 25 bp 序列，可能是因为这个序列是接头或者其他污染物，并且与读段有足够高的匹配分数。

3.3 Bowtie 比对

3.3.1 建立参考基因组索引

使用 Bowtie2 软件进行比对之前，也需要先建立索引，索引的作用和原理与 BWA 软件类似，都是为了加快比对的速度，减少内存的占用。建立索引的方法是将参考基因组分割成多个子序列，然后对每个子序列建立一个 Burrows-Wheeler 变换（BWT）和后缀数组（SA），记录每个 k-mer 的出现位置。比对的时候，Bowtie2 会将 reads 也分割成多个子序列，然后在 BWT 和 SA 中查找匹配的位置，从而找到最佳的比对位置。

具体命令：

```
bowtie2-build bowtie_index/c_elegans.PRJNA275000.WS286.genomic.fa
   bowtie_index/c_elegans.PRJNA275000.WS286.genomic.bowtie
```

得到文件：

```
bowtie_index/
|-- c_elegans.PRJNA275000.WS286.genomic.bowtie.1.bt2
|-- c_elegans.PRJNA275000.WS286.genomic.bowtie.2.bt2
|-- c_elegans.PRJNA275000.WS286.genomic.bowtie.3.bt2
|-- c_elegans.PRJNA275000.WS286.genomic.bowtie.4.bt2
|-- c_elegans.PRJNA275000.WS286.genomic.bowtie.rev.1.bt2
|-- c_elegans.PRJNA275000.WS286.genomic.bowtie.rev.2.bt2
|-- c_elegans.PRJNA275000.WS286.genomic.fa
```

3.3.2 Bowtie 比对

具体命令:

```
bowtie2 -p 10 -x ~/bowtie_index/c_elegans.PRJNA275000.WS286.genomic.
   bowtie -U ~/SRR14325856.fastq -S ~/bowtie_result/c_elegans_ChIP-
   Seq.sam
```

生成文件：`c_elegans_ChIP-Seq.sam`

3.4 Samtools 统计比对结果

3.4.1 Bowtie 比对结果

具体命令：

```
samtools view -S -b ~/bowtie_result/c_elegans_ChIP-Seq.sam |
    samtools flagstat - > ~/bowtie_result/flagstat.txt
```

输出结果：

```
6492282 + 0 in total (QC-passed reads + QC-failed reads)
0 + 0 secondary
0 + 0 supplementary
0 + 0 duplicates
3405738 + 0 mapped (52.46\% : N/A)
0 + 0 paired in sequencing
0 + 0 read1
0 + 0 read2
0 + 0 properly paired (N/A : N/A)
0 + 0 with itself and mate mapped
0 + 0 singletons (N/A : N/A)
0 + 0 with mate mapped to a different chr
0 + 0 with mate mapped to a different chr (mapQ>=5)
```

3.5 Peak Calling

利用计算的方法找到 ChIP-seq 或 ATAC-seq 中 reads 富集的基因组区域。
具体命令：

```
macs2 callpeak -t ~/bwa_result/c_elegans_ChIP-Seq.sam -f SAM -g ce -
    n test
```

生成文件：

```
peak_calling/
|-- motif_analysis
|-- test_model.pdf
|-- test_model.r
|-- test_peaks.narrowPeak
|-- test_peaks.xls
|-- test_summits.bed
```

3.6 Motif 分析

首先需要获得 fasta 格式的 peak 文件，使用 Bedtools：

```
bedtools getfasta -fi ~/bwa_index/c_elegans.PRJNA275000.WS286.
    genomic.fa -bed ~/peak_calling/test_peaks.narrowPeak -fo ./peak.
    fasta
```

由于在线版 MEME 需要排队，以及运行时间长，故使用 TBtools 中内嵌的本地版 MEME.

3.7 Peak 注释

使用 R 包 ChIPseeker 进行 peak 注释。
具体命令：

```
library(ChIPseeker)
library(GenomicFeatures)
txdb <- makeTxDbFromGFF(file = file.choose(), format = "gff3")
peak <- readPeakFile(file.choose())
peakAnno <- annotatePeak(peak,
                         TxDb=txdb,
                         tssRegion=c(-1000, 1000))
```

导出 Gene List 用于进一步的 Gene Ontology 分析。

```
df <- as.data.frame(peakAnno)
gene <- df[,14]
write.table (gene, file ="D:\\gene_list.txt", sep ="", row.names =
   FALSE, col.names =FALSE, quote =FALSE)
```

4 结果与图表

4.1 FastQC Result

4.1.1 Original Data

4.1.2 Processed Data

4.2 Peak calling

4.3 Motif Analysis

4.4 Peak Annotation

4.5 Gene Ontology

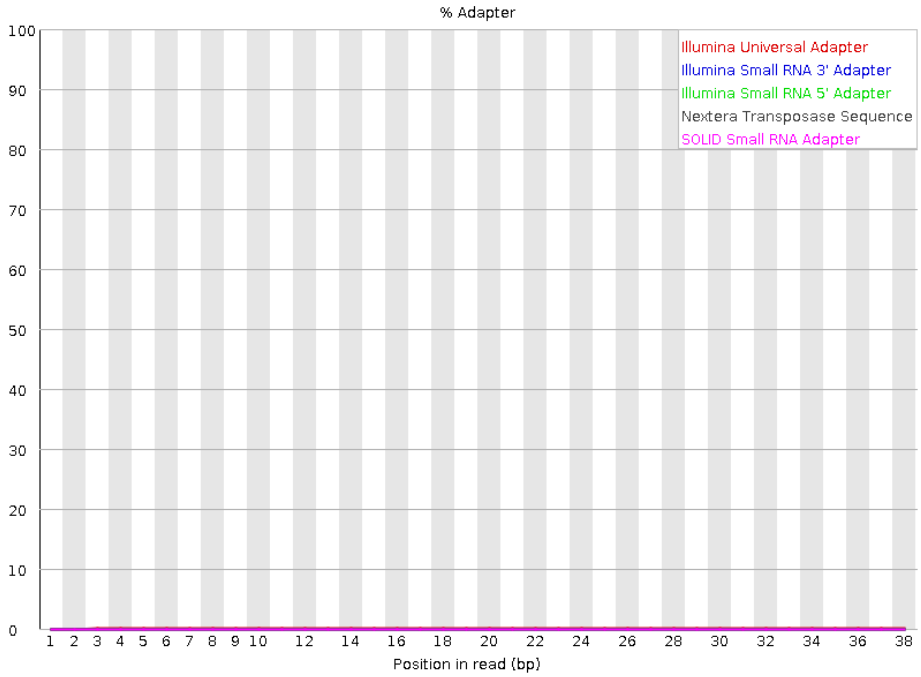


图 1: Adapter content

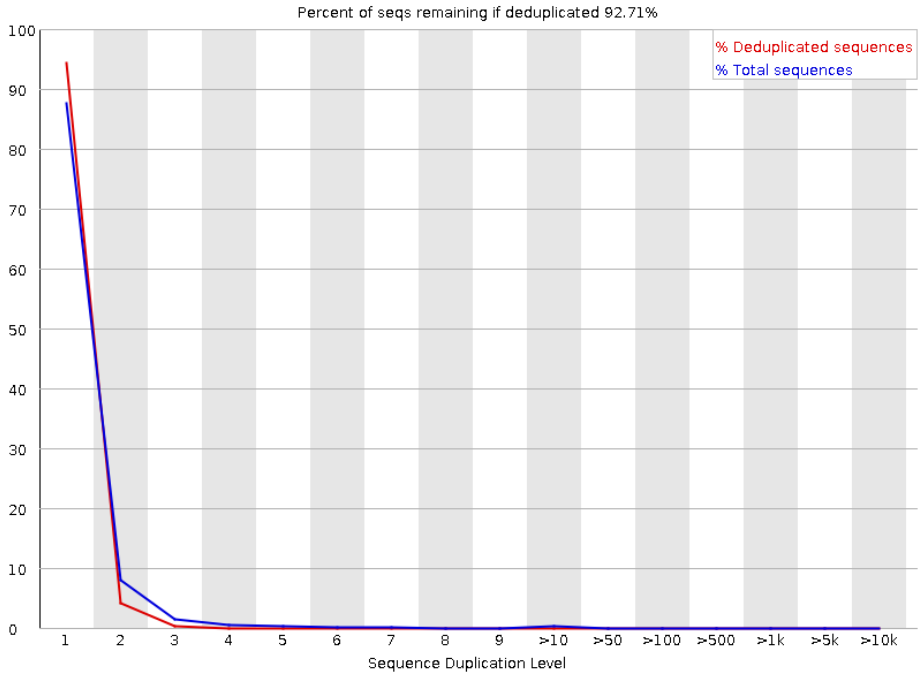


图 2: Duplication levels

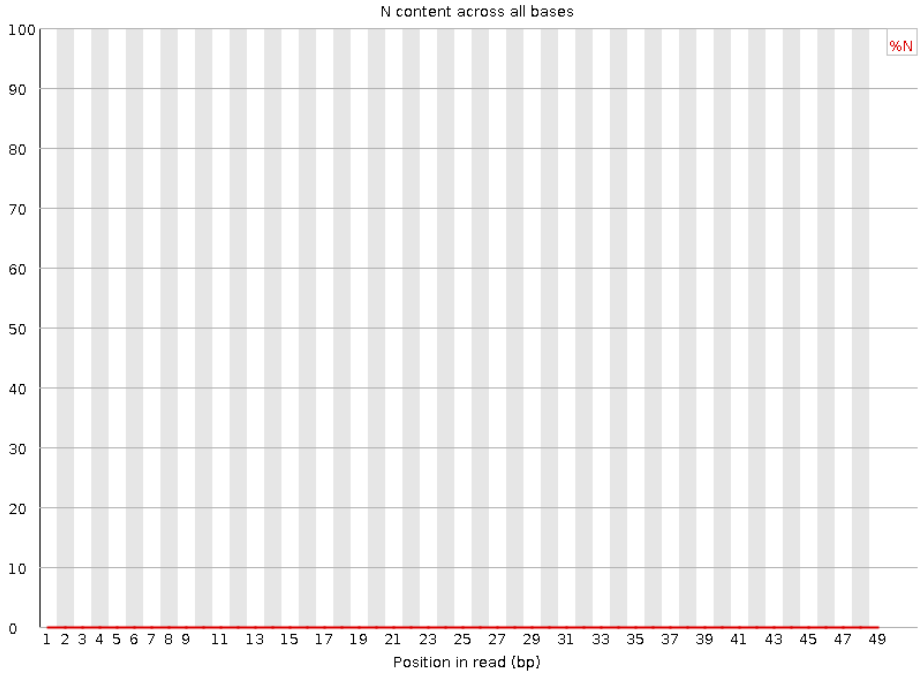


图 3: Per base N content

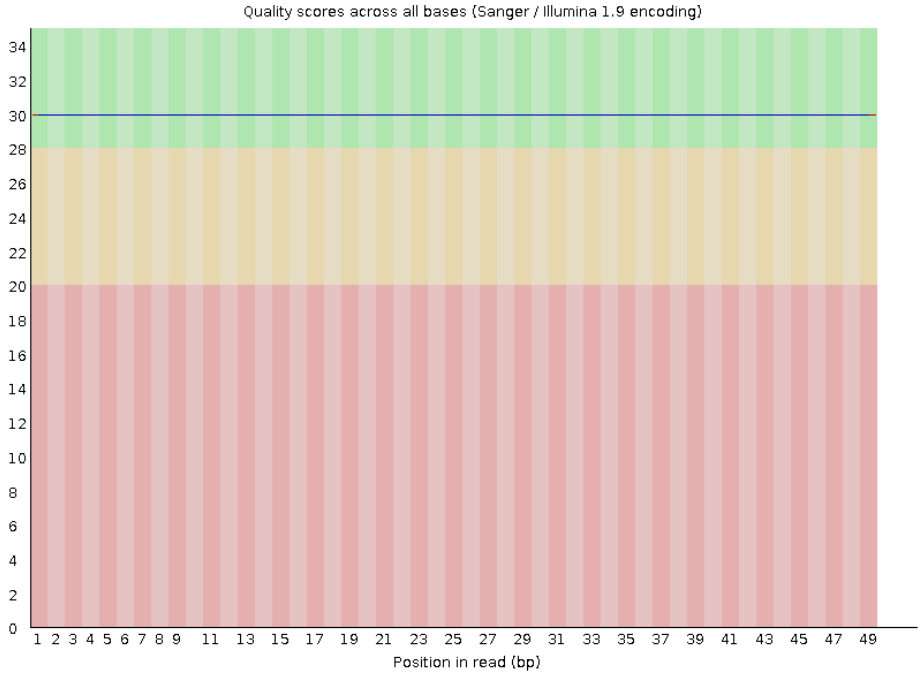


图 4: Per base quality

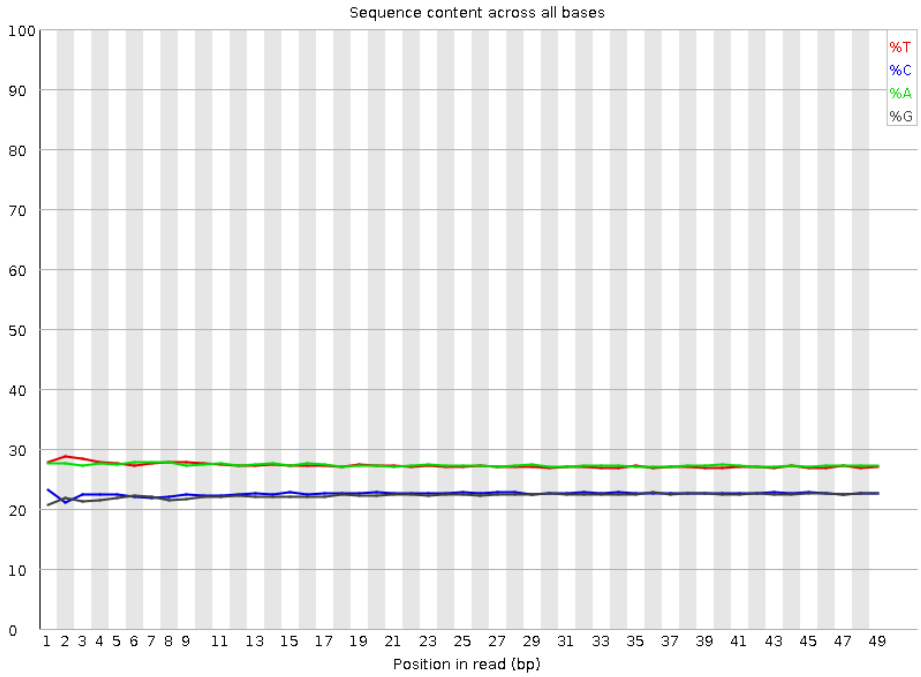


图 5: Per base sequence content

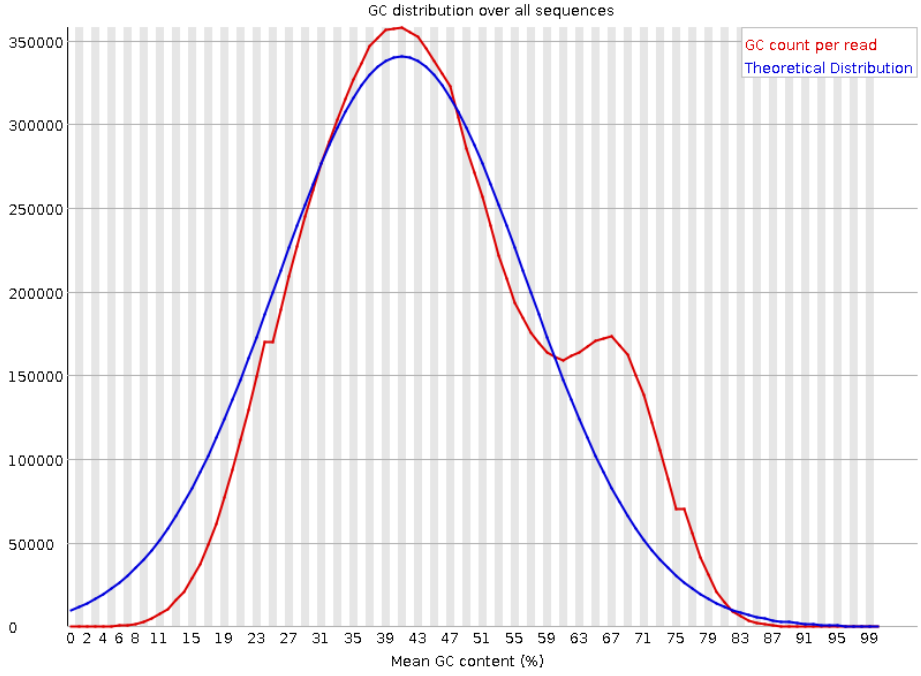


图 6: Per sequence GC content

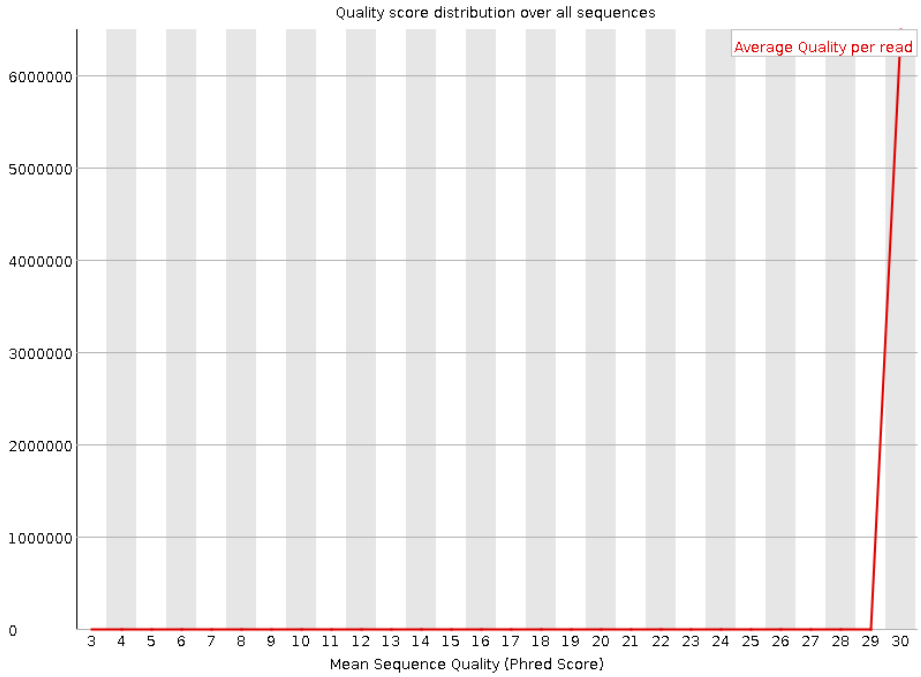


图 7: Per sequence quality

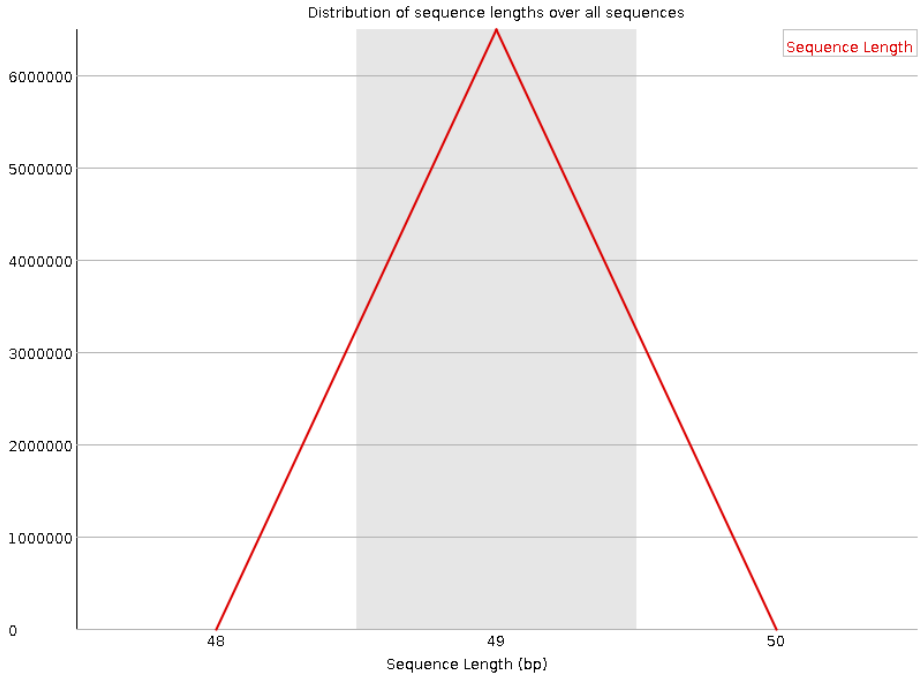


图 8: Sequence length distribution

Sequence	Count	Percentage	Possible Source
AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACTGTGAAATCTCGTAT	11589	0.17850426090548746	TruSeq Adapter, Index 13 (97% over 36bp)

图 9: Overrepresented sequences

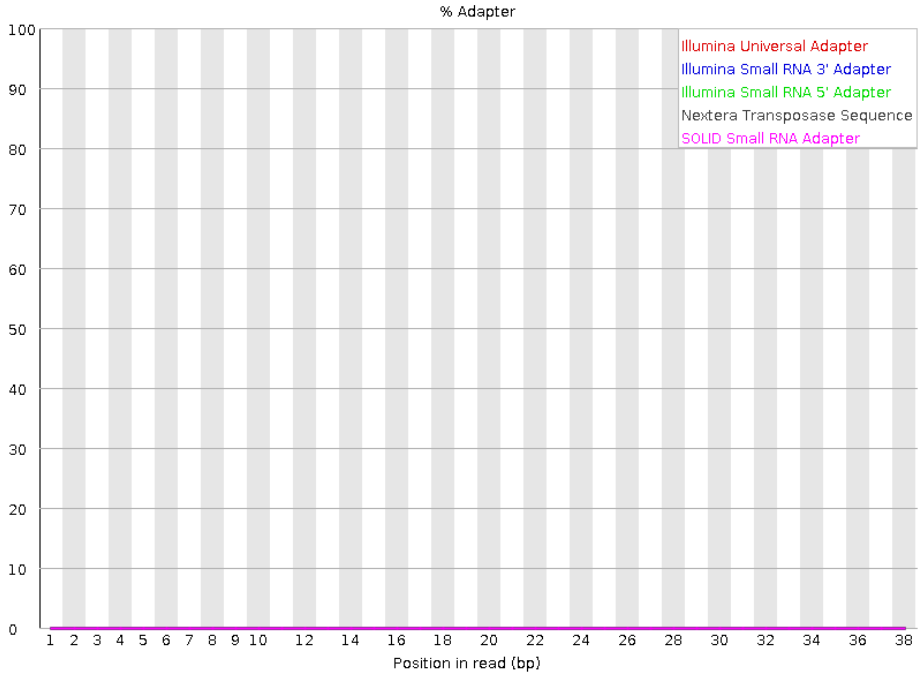


图 10: Adapter content (Processed)

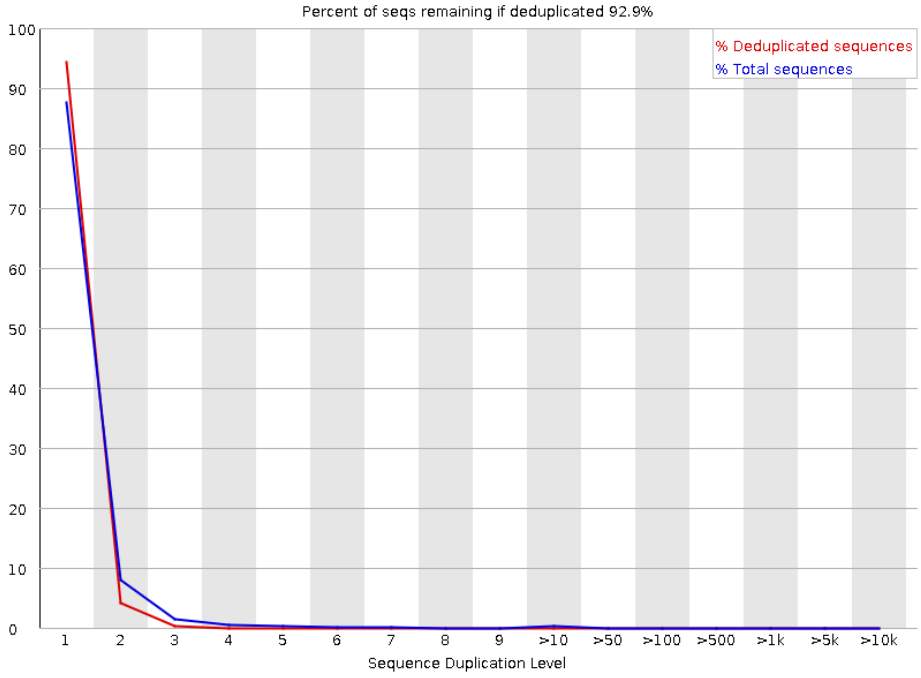


图 11: Duplication levels (Processed)

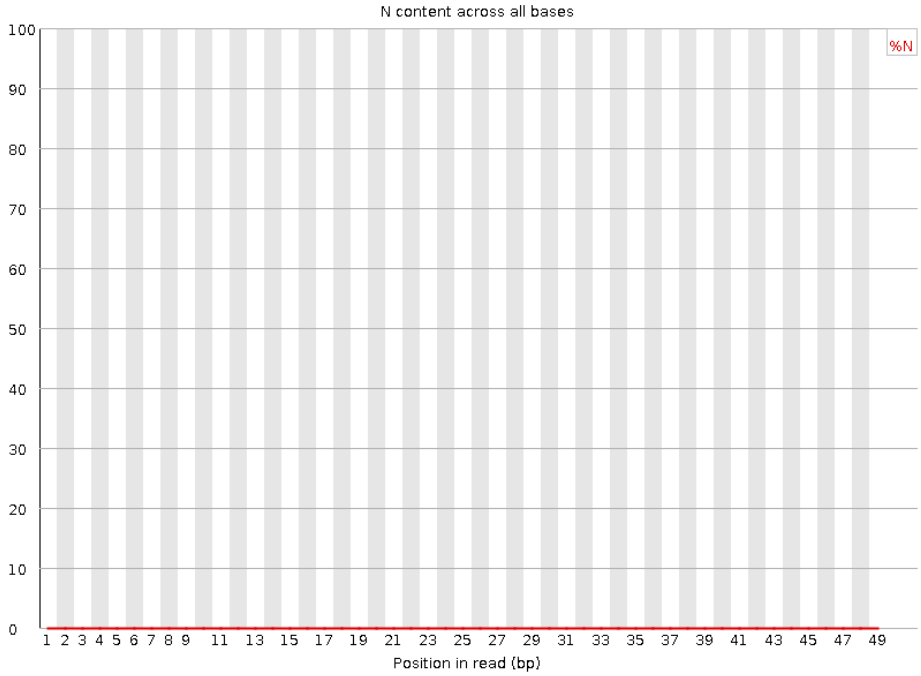


图 12: Per base N content (Processed)

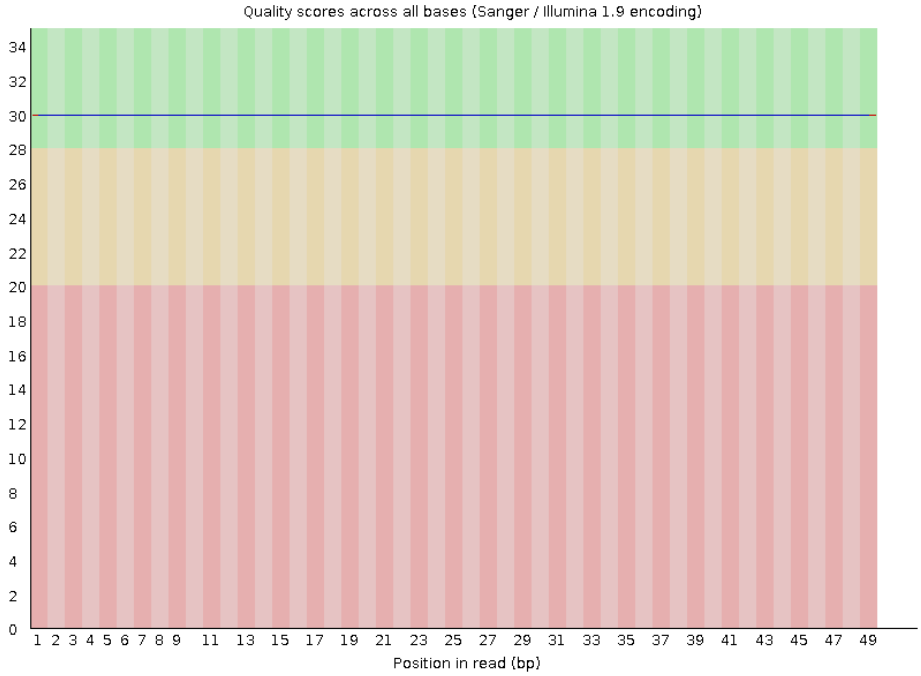


图 13: Per base quality (Processed)

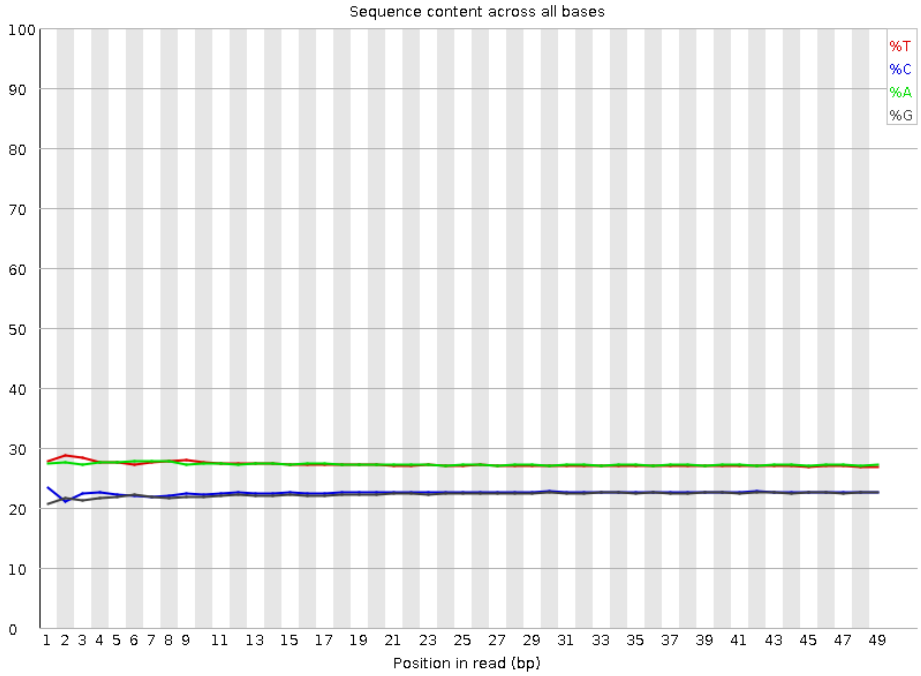


图 14: Per base sequence content (Processed)

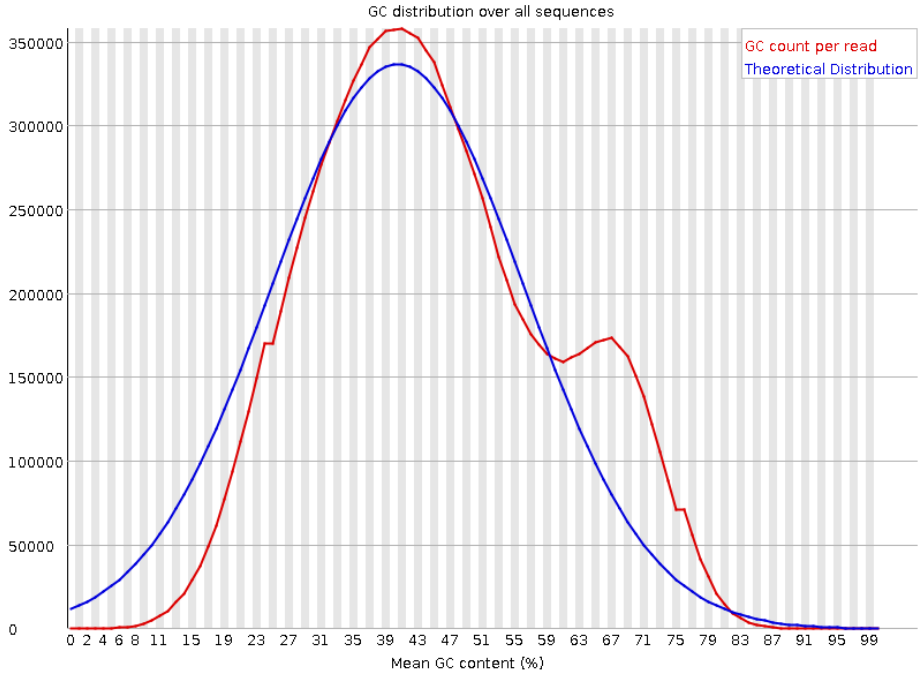


图 15: Per sequence GC content (Processed)

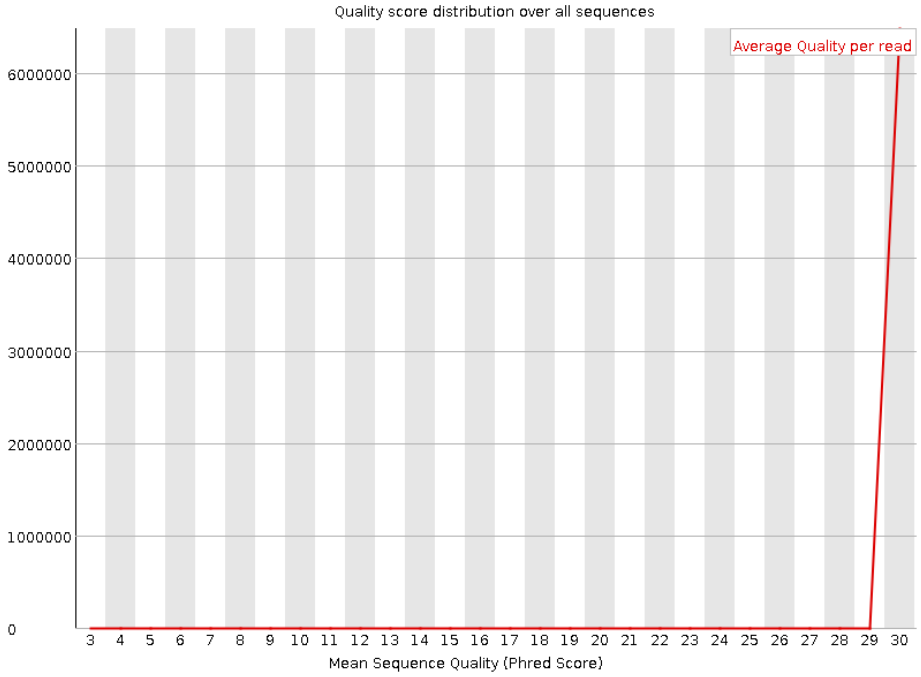


图 16: Per sequence quality (Processed)

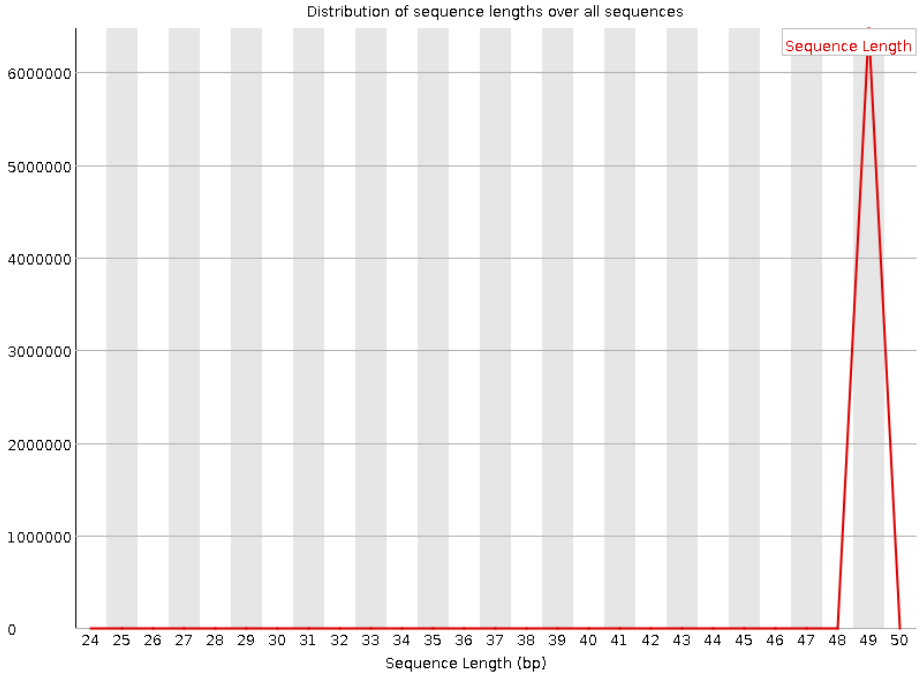
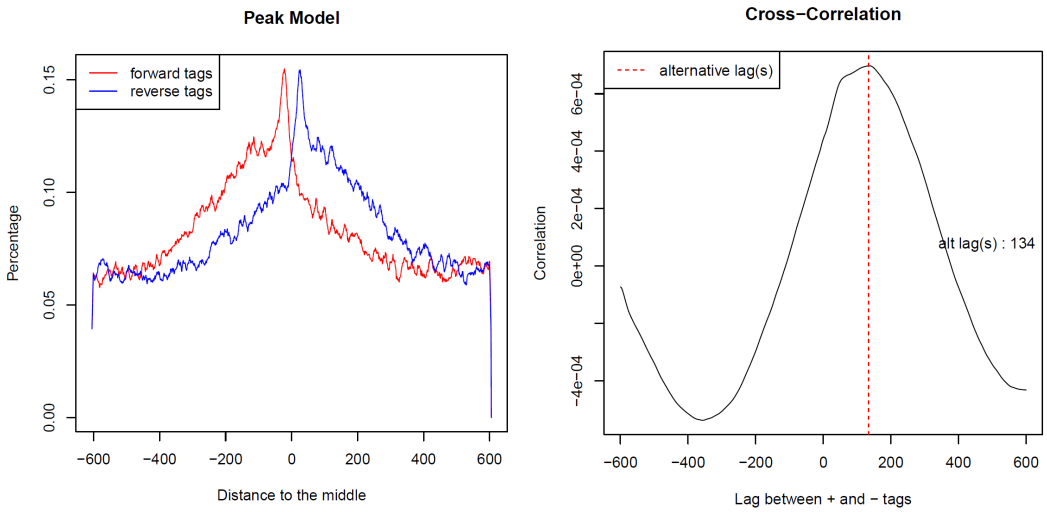


图 17: Sequence length distribution (Processed)



Peak model Cross-Correlation

图 18: Peak calling 结果

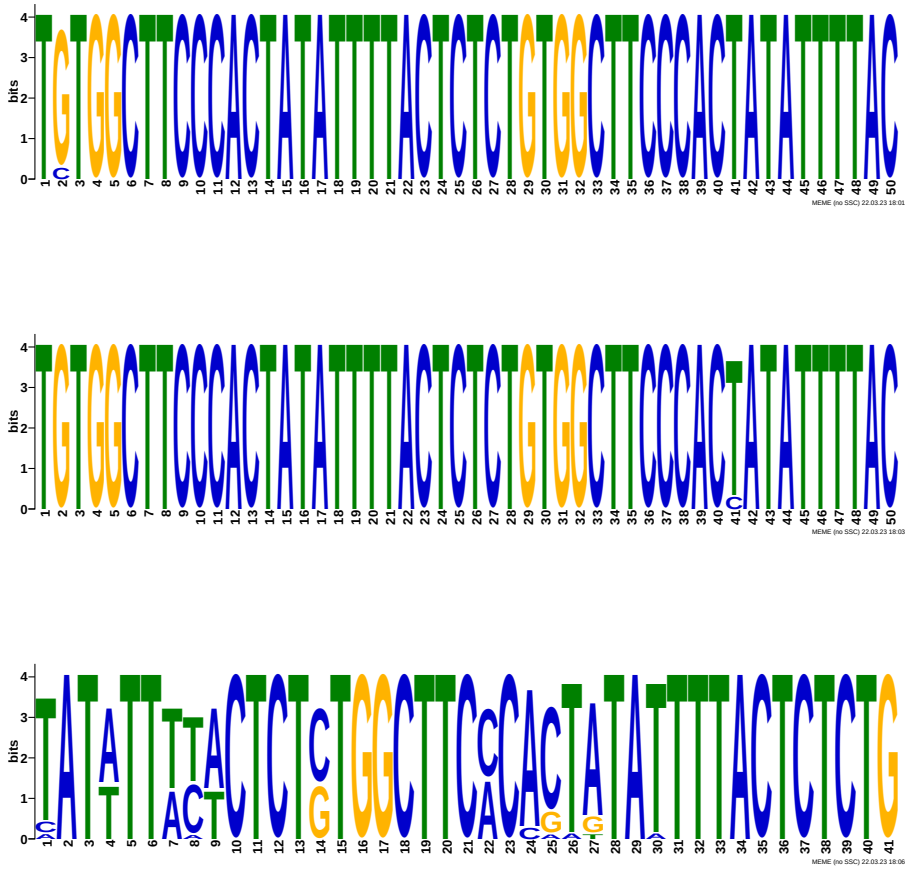


图 19: MEME 输出结果

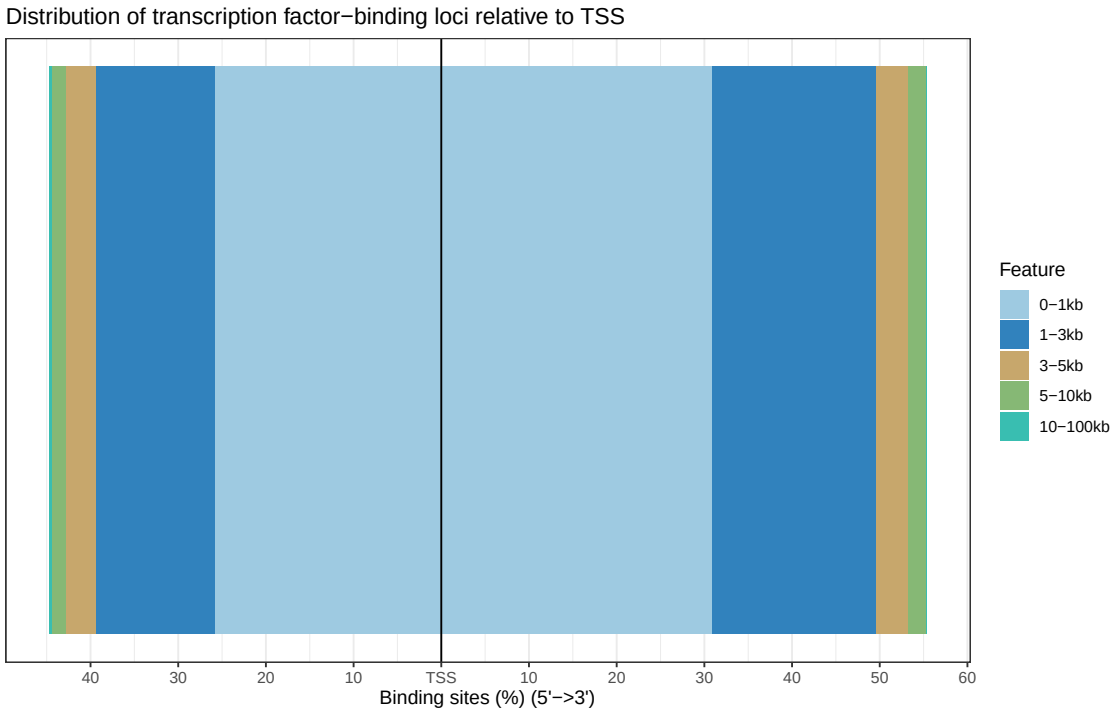


图 20: Distribution of transcription factor−binding loci relative to TSS

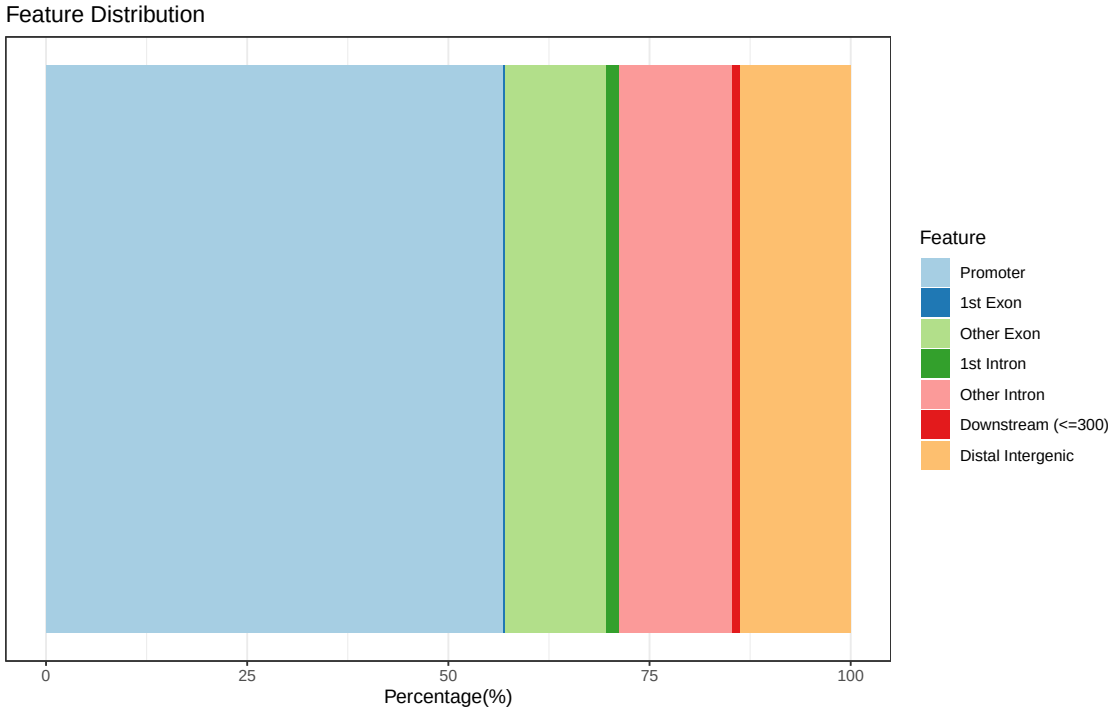


图 21: Feature Distribution in Percentage

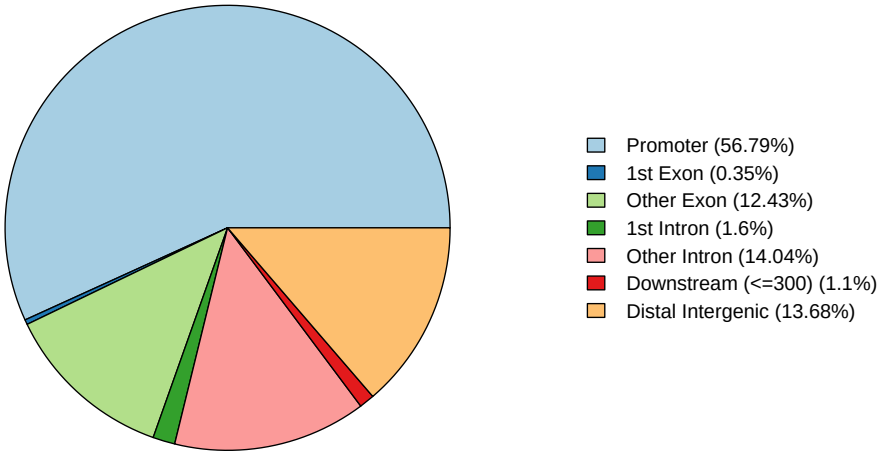
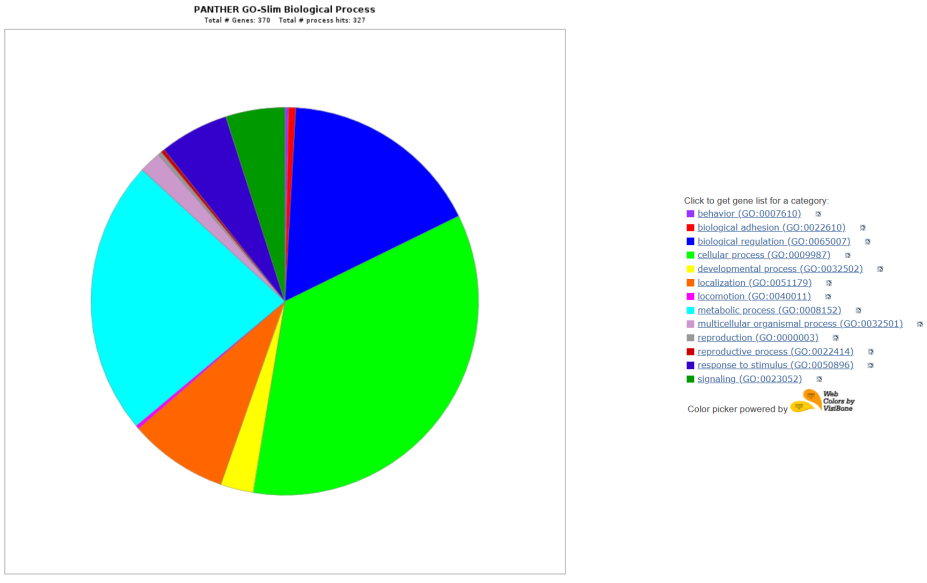
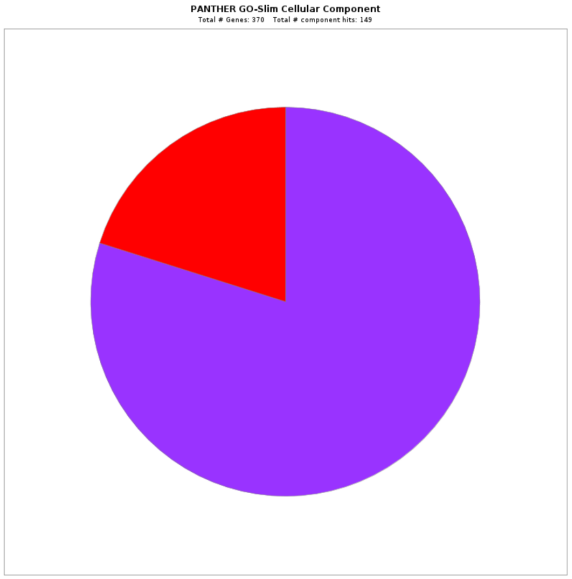


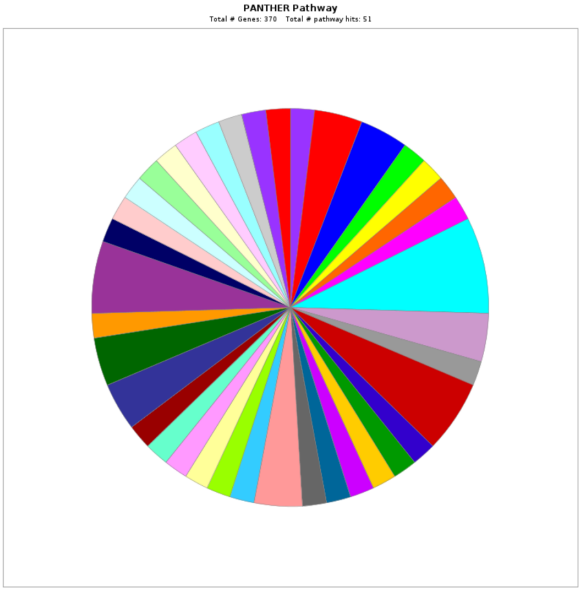
图 22: Feature Distribution in Pie Chart



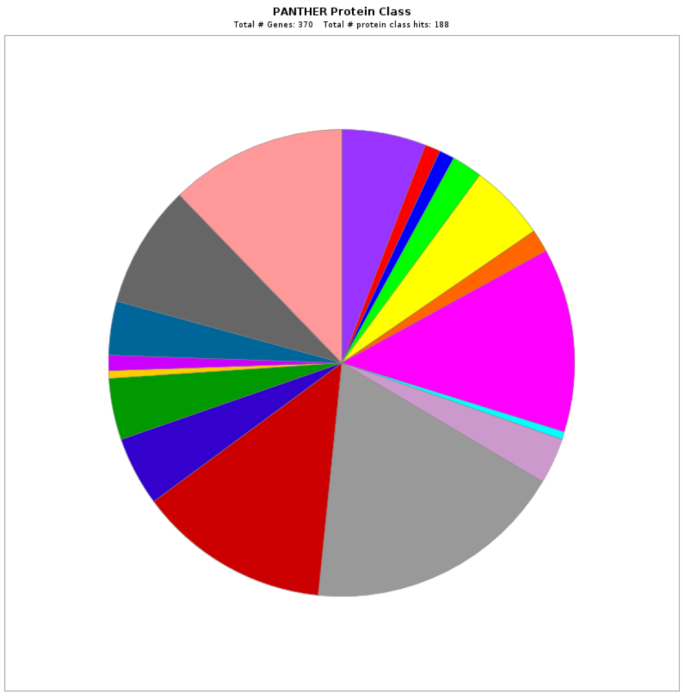


Click to get gene list for a category:
- cellular anatomical entity (GO:0110165)
- protein-containing complex (GO:0032991)

Color picker powered by Web Colors by VisiBone

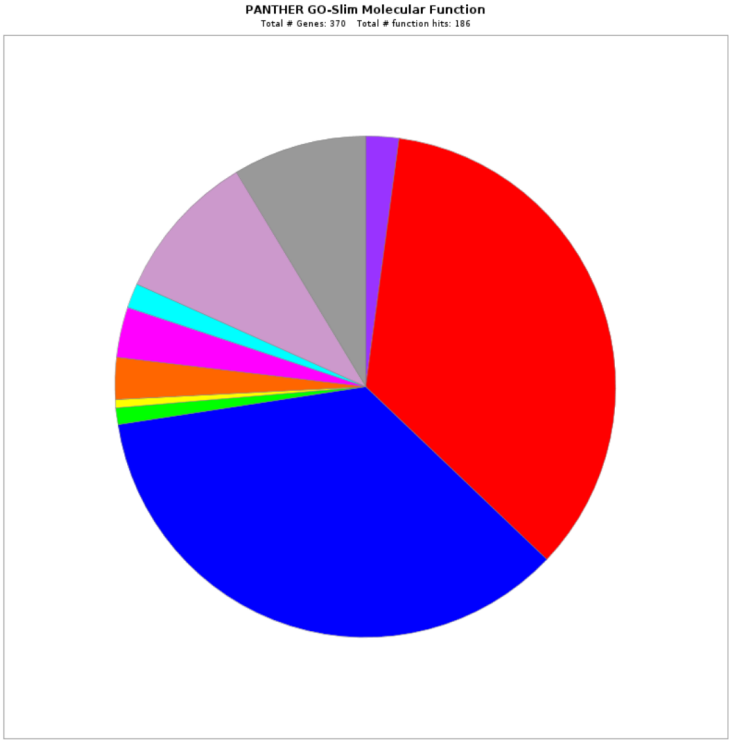


Click to get gene list for a category:
- Alzheimer disease-presenilin pathway (P00004)
- Angiogenesis (P00005)
- Apoptosis signaling pathway (P00006)
- Blood coagulation (P00011)
- Cell cycle (P00013)
- Cytoskeletal regulation by Rho GTPase (P00016)
- DNA replication (P00017)
- EGF receptor signaling pathway (P00018)
- Endothelin signaling pathway (P00019)
- FAS signaling pathway (P00020)
- FGF signaling pathway (P00021)
- Glutamine glutamate conversion (P02745)
- Glycolysis (P00024)
- Heme biosynthesis (P02746)
- Heterotrimeric G-protein signaling pathway-rod outer segment phototransduction (P00028)
- Hypoxia response via HIF activation (P00030)
- Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)
- Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade (P00032)
- Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade (P00033)
- Interferon-gamma signaling pathway (P00035)
- Interleukin signaling pathway (P00036)
- Ionotropic glutamate receptor pathway (P00037)
- Metabotropic glutamate receptor group III pathway (P00039)
- Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway (P00042)
- Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway (P00043)
- Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway (P00044)
- Notch signaling pathway (P00045)
- PDGF signaling pathway (P00047)
- PI3 kinase pathway (P00048)
- Parkinson disease (P00049)
- Pyruvate metabolism (P02772)
- TCA cycle (P00051)
- Ubiquitin proteasome pathway (P00060)
- VEGF signaling pathway (P00056)
- Wnt signaling pathway (P00057)
- p53 pathway by glucose deprivation (P04397)
- p53 pathway feedback loops 2 (P04398)
- p53 pathway (P00059)



Click to get gene list for a category:
- RNA metabolism protein (PC00031)
- calcium-binding protein (PC00060)
- cell adhesion molecule (PC00069)
- chaperone (PC00072)
- cytoskeletal protein (PC00085)
- extracellular matrix protein (PC00102)
- gene-specific transcriptional regulator (PC00264)
- intercellular signal molecule (PC00207)
- membrane traffic protein (PC00150)
- metabolite interconversion enzyme (PC00262)
- protein modifying enzyme (PC00260)
- protein-binding activity modulator (PC00095)
- scaffold/adaptor protein (PC00226)
- structural protein (PC00211)
- transfer/carrier protein (PC00219)
- translational protein (PC00263)
- transmembrane signal receptor (PC00197)
- transporter (PC00227)

Color picker powered by Web Colors by VisiBone



Click to get gene list for a category:
- ATP-dependent activity (GO:0140657)
- binding (GO:0005488)
- catalytic activity (GO:0003824)
- cytoskeletal motor activity (GO:0003774)
- molecular adaptor activity (GO:0060090)
- molecular function regulator (GO:0098772)
- molecular transducer activity (GO:0060089)
- structural molecule activity (GO:0005198)
- transcription regulator activity (GO:0140110)
- transporter activity (GO:0005215)

Color picker powered by Web Colors by VisiBone