蛋白质和 DNA 结合位点定位

生信 2001 张子栋 梁国相

成员与分工

- 张子栋
  - 代码实现（Java & R 部分）
  - 实验报告撰写
  - 模型建立
  - 数据可视化
- 梁国相
  - 代码校对
  - 曲线拟合统计量计算

多重检验问题

5% 水平的假设检验, 在 100 次假设检验中, 至少出现一次错误(错误地拒绝原假设)的概率为

$$1-(1-0.05)^{100} \approx 0.994$$

当一个数据集有多词假设检验时, 需要做多重假设检验校正.

控制错误的方法

$Bonferroni\ Correction$

改变显著性水平 $\alpha = \frac{\alpha}{m}$ 得到新的显著性水平, $reject\ H_i\ if\ p_i \leq \alpha$

> 例如, 如果检验 1000 次, 就将阈值($\frac{\alpha}{m}$) 设定为 $\frac{5\%}{1000}$, 即使检验 1000 次, 出现错误的概率还是保持在 $N \times 1000 = 5\%$
> 该方法虽然简单, 但是检验过于严格, 导致最后找不到显著表达的的蛋白(假阴性)

False Discovery Rate (FDR)

对于 m 次假设检验 $H_1, H_2, \cdots, H_m$, 得到 P 值: $P_1, P_2, \cdots, P_m$, 将 P 值从小到大进行排序: $P_{(1)}, P_{(2)}, \cdots, P_{(m)}$
对于给定的 $\overline{\alpha}$, 找到满足条件 $P(k) \leq \frac{k}{m}\overline{\alpha}$ 的最大 k 值
然后拒绝 $H_i, i = 1, 2, \cdots, k$ 这些原假设

> 相对 Bonferroni 来说, FDR 用比较温和的方法对 p 值进行了校正. 其试图在假阳性和假阴性间达到平衡, 将假/真阳性比例控制到一定范围之内, 例如, 如果检验 1000 次, 我们设定的阈值为 $0.05(5\%)$, 那么无论我们得到多少个差异蛋白, 这些差异蛋白出现假阳性的概率保持在 5% 之内, 这就叫 $FDR < 5\%$.

使用 R 中的 `p.adjust()`

```
p.adjust(p, method = p.adjust.methods, n = length(p))
```

- `p` 是多重假设检验的多个 `p` 值
- `p.adjust.methods` 有: 'holm''hochberg''hommel''bonferroni''BH''BY''fdr''none'

使用 R 中的 `p.adjust()`

`p.adjust(p, method = p.adjust.methods, n = length(p))`

- `p` 是多重假设检验的多个 `p` 值
- `p.adjust.methods` 有: 'holm''hochberg''hommel''bonferroni''BH''BY''fdr''none'

实验思路

- 原假设: 读取位点 `reads` 随机落在基因组上.
- 分布特征: $B(n,p),\ n\to\infty,\ p\to 0$
  - 近似为泊松分布
  - $P(x)=\frac{e^{-\lambda}\lambda^x}{x!}$
- 计算 P 值
  - P 值越小, 越表明测序 `reads` 落在该 DNA 区间不是随机的, 从而说明蛋白质结合具有偏好性.
- 注意事项
  - 蛋白质跟 DNA 结合位点具有一定范围, 可能不是单个位点
  - DNA `reads` 具有偏好性不天然等价于结合位点
    - 数据除了随机误差, 还可能具有系统偏好性

定位峰

分析数据和曲线特征, 寻找局部最大值

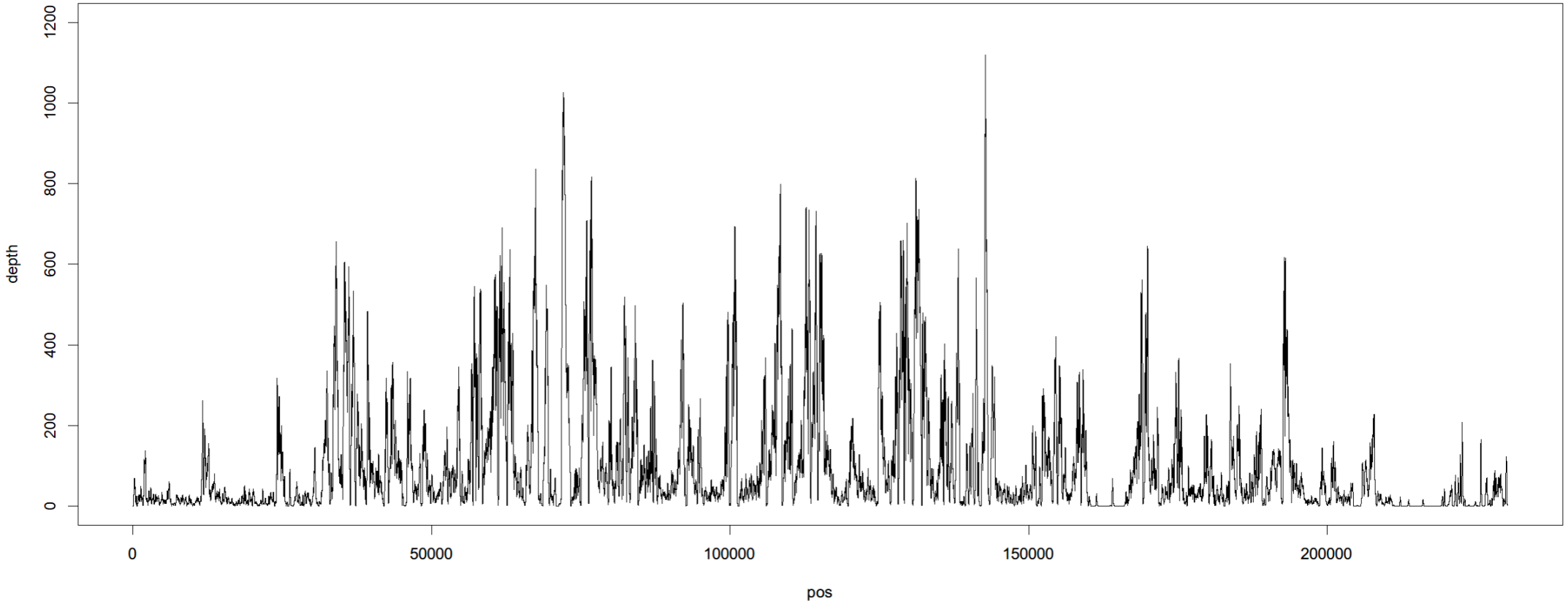
1. 阈值筛选峰: 人为设定, 分位数, 拒绝域临界点
2. 局部极大值筛选峰(原始值找顶点, 如以最大值顶点为中心左右各扩展 75 bp)

寻找显著峰的方法

1. 使用局部(或全局)泊松分布计算峰中各剪辑的测序深度出现的概率, 并计算局部(或全局)平均测序深度 λ (泊松分布均值)对应的概率值作为总体均值(总体理论概率), 然后将峰作为一个样本跟总体均值相比较
2. 根据测序深度作为观察值做一个样本均数假设检验
3. 根据泊松分布直接计算超过这个峰均值的所有观测值之和, 通过这个累计概率是否小于 0.05 判断是否为显著峰

实验过程

- 读取数据与可视化



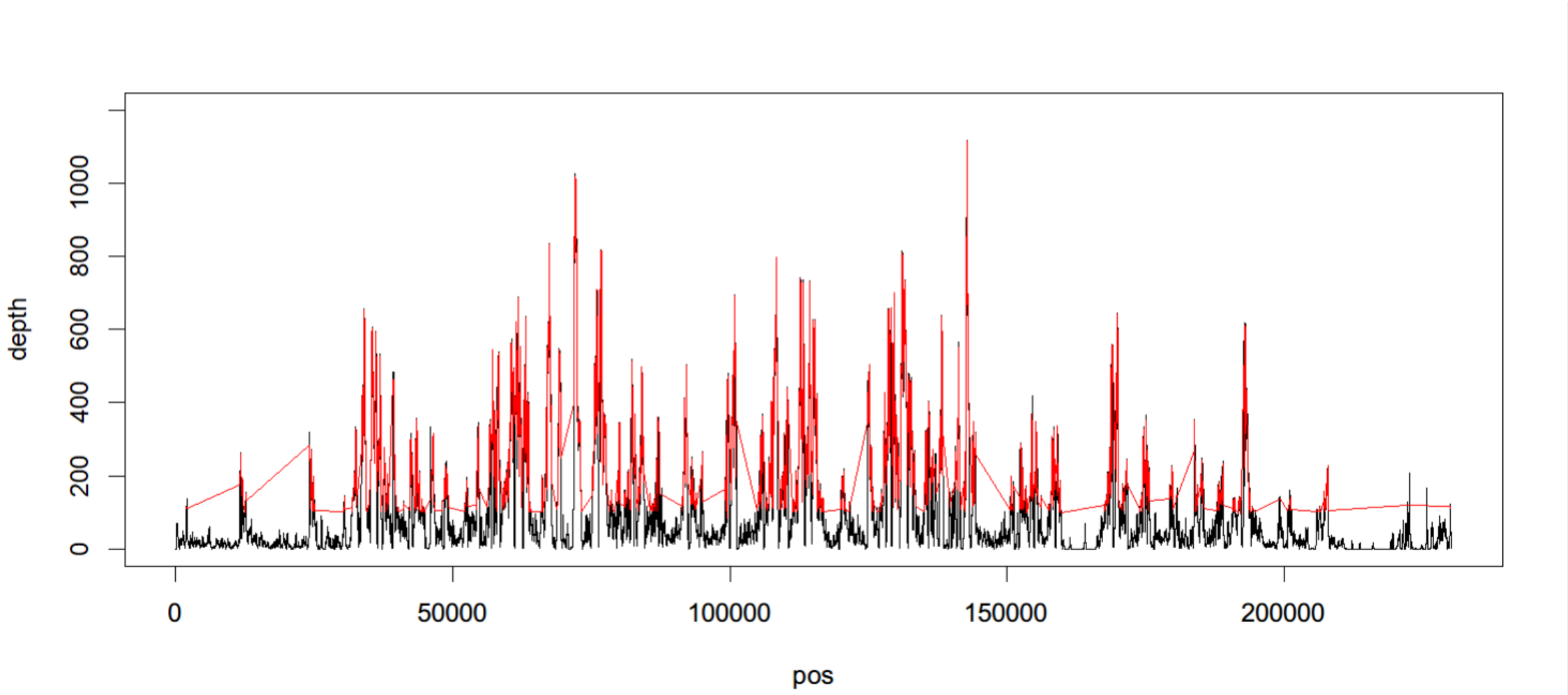
获取待筛峰

- 使用 Java 计算大于均值的极大值，存入集合内
- 由于 R 循环效率低，同样使用 Java 扩展峰值区间（±75 bp）
- 导出数据到 R

统计量计算

- 使用 R t.test() 计算局部 p 值
- 使用 p.adjust() fdr 法校正 p 值
- 筛选出峰值（p < 2.2e-16）
- t 检验 （峰值概率与总体概率(lambda=mean)）

峰值可视化



存在的问题

- 由数据可视化和峰值数量(5540)可以看出，筛选结果不理想

曲线拟合筛选峰

- 思路
  - 使用 `smooth.spline()` 拟合数据
  - 求出一阶导数零点(接近 `0`，选取的具体范围为 `±0.003`)
  - 求小于零的二阶导数
  - 一阶导数与二阶导数求交集
  - 得到极大值
  - `t.test()` 筛选显著峰

峰值可视化