生物信息学进展

ChIP-Seq 数据分析-终期报告

学　　院：信息学院

专　　业：生物信息学

学生姓名：张子栋

学　　号：2020317210101

湖北 · 武汉

2023 年 3 月 16 日

目录

1 实验材料

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 中检索文献并下载数据

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。

1.1.3 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 作为研究数据。

登录服务器后，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
```

1.2 线虫参考基因组

1.2.1 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。

1.3 实验软件

1.3.1 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。

1.3.2 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

1.3.3 BWA

BWA 是一种能够将差异度较小的序列比对到一个较大的参考基因组上的软件包。它由三个不同的算法组成：BWA-backtrack，BWA-SW 和 BWA-MEM。BWA-backtrack 适用于比对 Illumina 的序列，reads 长度最长能到 100 bp。BWA-SW 和 BWA-MEM 适用于比对长序列，支持的长度为 70 bp - 1 Mbp；同时支持剪接性比对。

BWA 的使用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 格式的文件，可以用 Samtools 进行后续的处理。

1.3.4 Bowtie

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。

1.3.5 BWA 与 Bowtie

Bowtie 和 BWA 都是常用的短序列比对工具，它们有一些相似之处，也有一些不同之处。

- 相似之处
    - 都是基于 Burrows-Wheeler Transform（BWT）的算法，利用后缀数组和 FM-index 进行比对。
        * BWT 是 Burrows-Wheeler Transform 的缩写，它是一种数据转换算法，可以把一个文本转换成一个相似的文本，使得相同的字符更容易聚集在一起，从而方便后续的压缩。BWT 的原理是对文本的所有循环移位进行字典序排序，然后取最后一列作为转换后的文本。BWT 是可逆的，也就是说可以从转换后的文本恢复原文本。
    - 都能够比对单端或双端的 reads，支持多种格式的输入和输出。
    - 都能够处理比对错误和插入缺失，但是对于较长的插入缺失，效果不佳。

- 不同之处
  - BWA 有两种模式：BWA-MEM 和 BWA-ALN，前者适用于较长的 reads（> 70 bp），后者适用于较短的 reads（< 70 bp）。Bowtie 有两个版本：Bowtie 和 Bowtie2，前者只支持全局比对，后者支持局部比对和剪接性比对。
  - BWA 比 Bowtie2 更准确，但是 Bowtie2 比 BWA 更快。BWA 比 Bowtie 更敏感，但是 Bowtie 比 BWA 更节省内存。
  - BWA 和 Bowtie2 都能够比对较长的 reads，但是 BWA-MEM 对于较长的 reads 更优于 Bowtie2。Bowtie 只能够比对较短的 reads（< 50 bp）。
  - BWA 和 Bowtie2 都能够处理比对错误和插入缺失，但是 BWA-MEM 对于较短的插入缺失更优于 Bowtie2。Bowtie 只能够处理比对错误，不能处理插入缺失。

1.3.6 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
```

- 除 PCR 重复，例如：

```
samtools rmdup in.bam out.rmdup.bam
```

- 统计比对结果，例如：

```
samtools flagstat in.bam
```

- 查看比对结果，例如：

```
samtools tview in.bam ref.fa
```

- 生成 BCF 文件，用于 SNP 和 indel 的分析，例如：

```
samtools mpileup -uf ref.fa in.bam | bcftools call -c - > out.
   bcf
```

1.3.7 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。

1.3.8 MACS

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。

1.3.9 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。

1.3.10 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。

1.3.11 PANTHER

Panther 是一种用于 GO 分析的软件。它是一个基于隐马模型（HMM）的序列搜索工具，与直接使用 GO 数据库不同，Panther 采用的是其自主整理的基因注释结构。

2 实验流程及结果

2.1 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
```

在选定 SRR14325856 作为研究数据前，还尝试了另外几个数据（SRR14325853，SRR14325854），但这几个数据均没有过表达序列，故弃用。

2.1.1 FastQC 分析结果

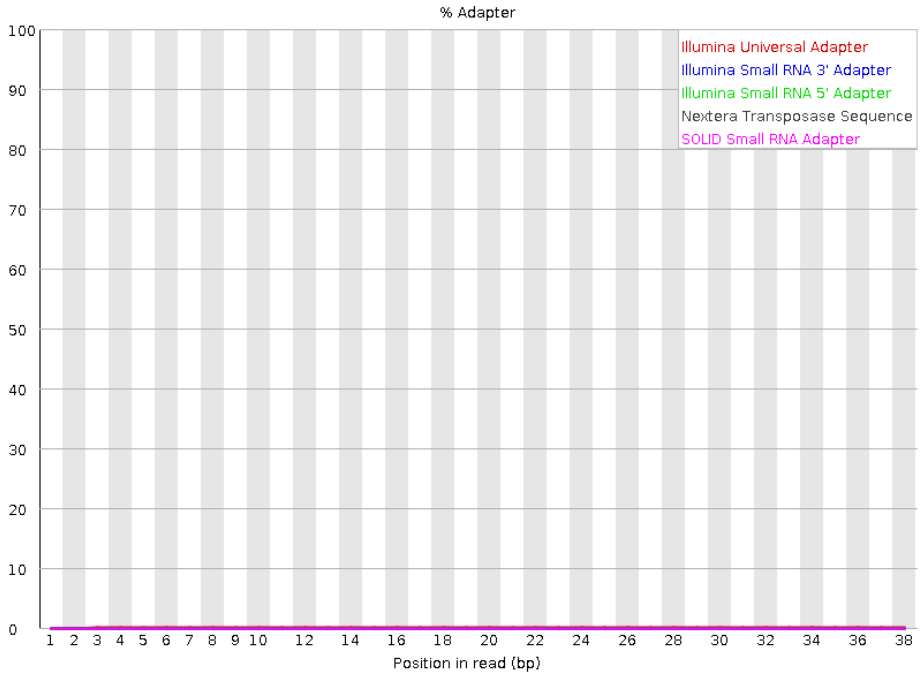


图 1: Adapter content

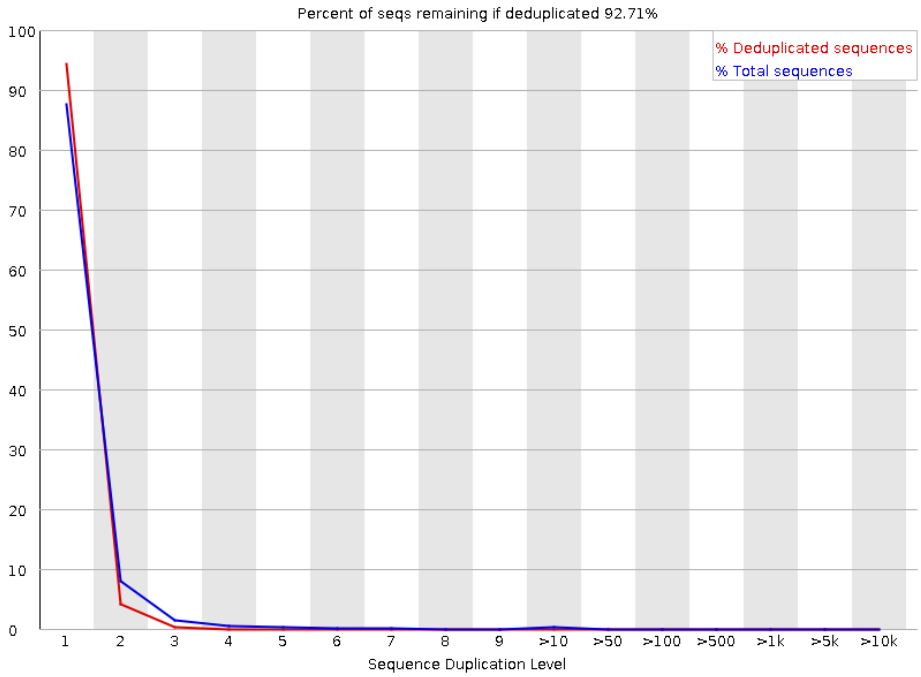


图 2: Duplication levels

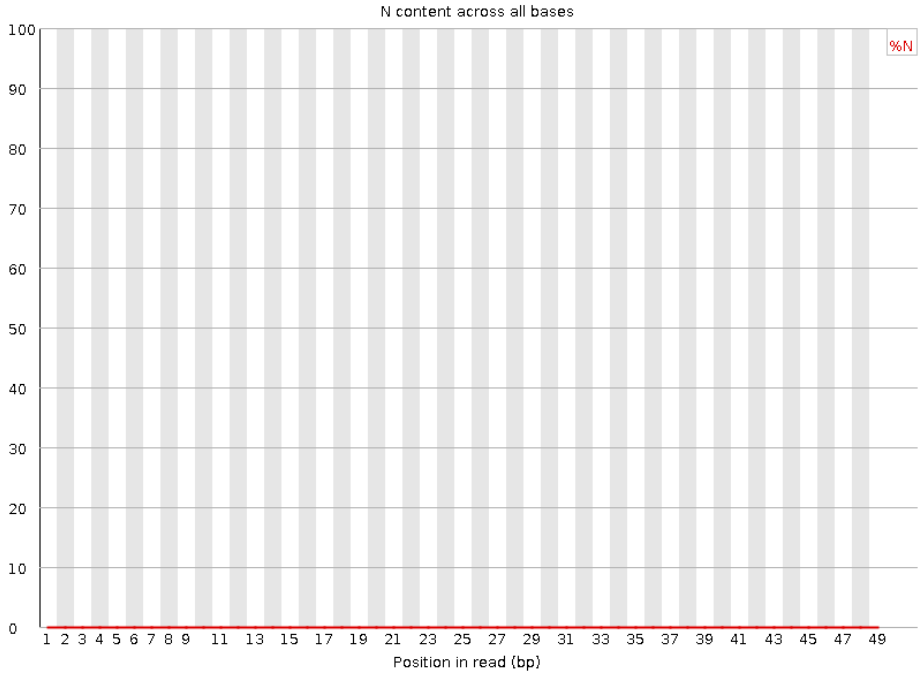


图 3: Per base N content

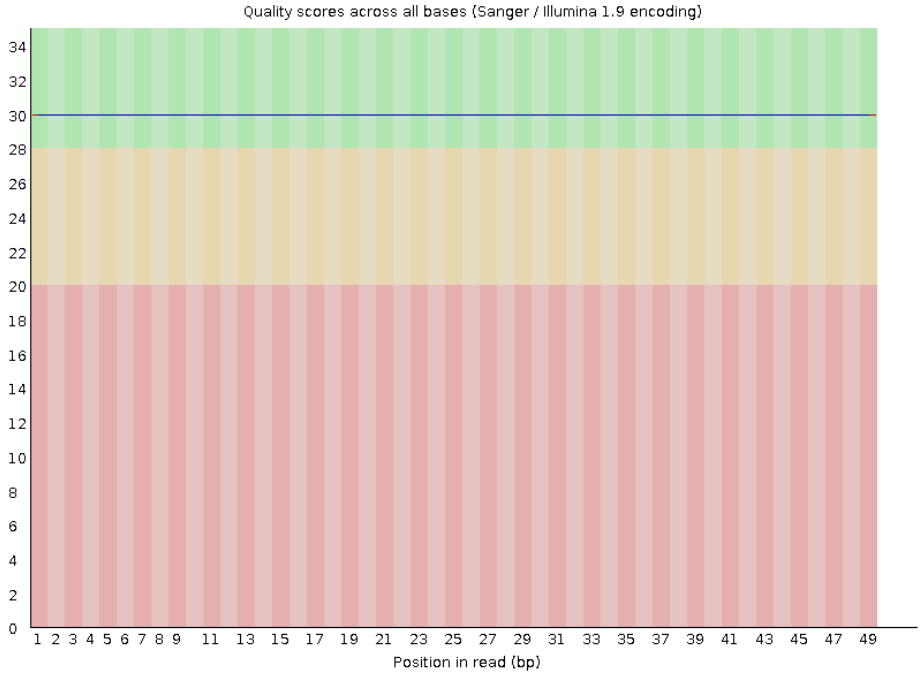


图 4: Per base quality

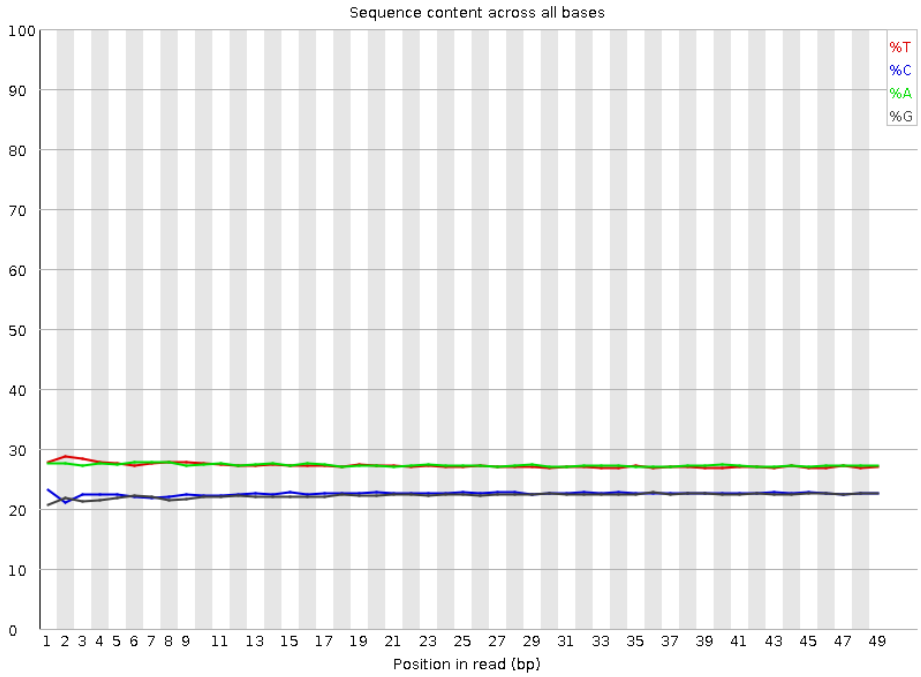


图 5: Per base sequence content

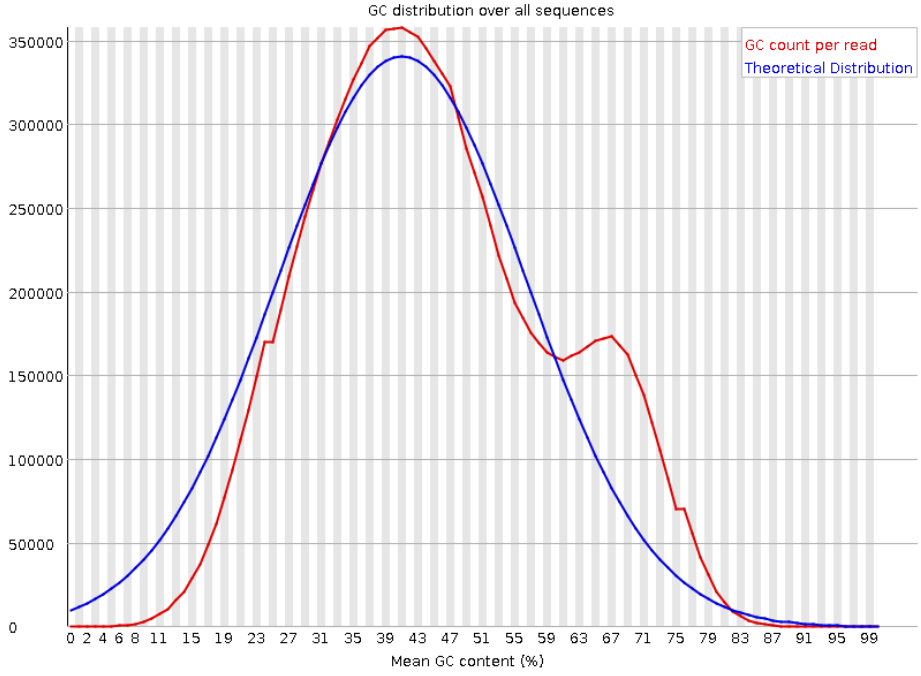


图 6: Per sequence GC content

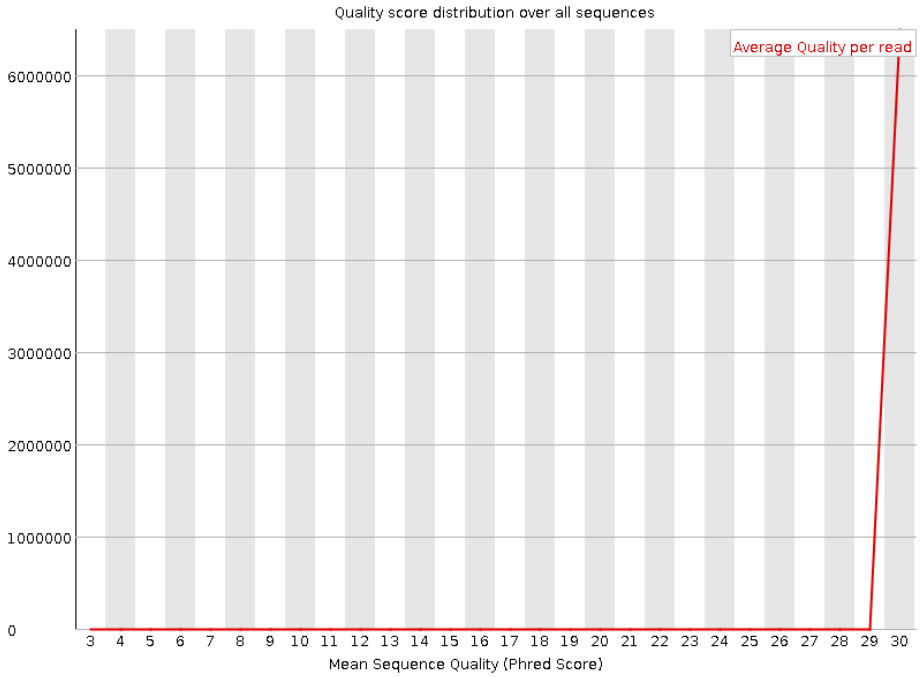


图 7: Per sequence quality

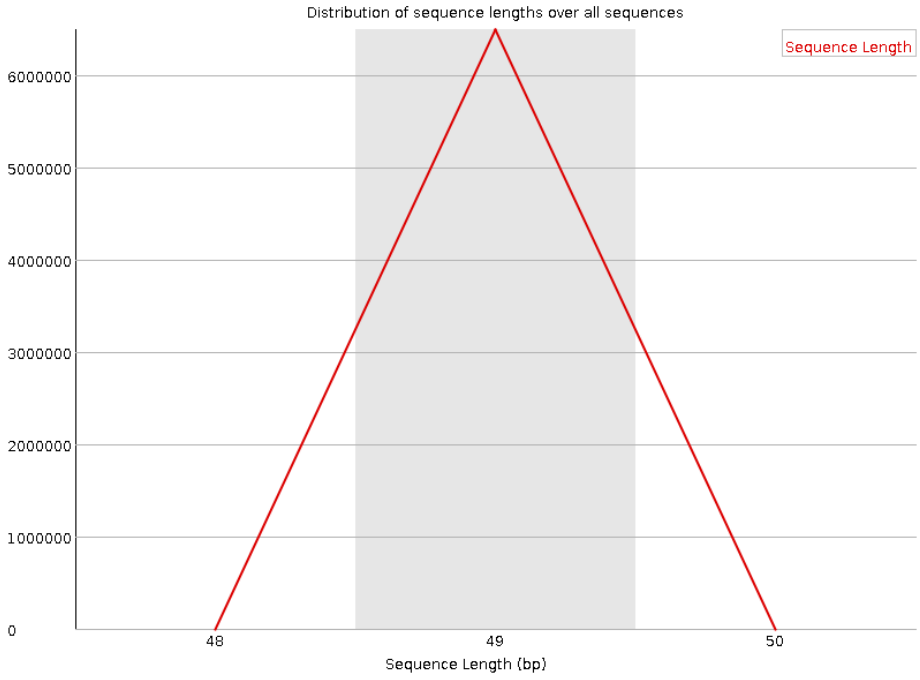


图 8: Sequence length distribution

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

图 9: Overrepresented sequences

根据 FastQC 结果可以得出：

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

2.2 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/bio_2022_2023_2/
    bio_zdzhang/SRR14325856.fastq /Bioinfo/bio_2022_2023_2/
    bio_zdzhang/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。

2.3 使用 FastQC 分析处理后的数据

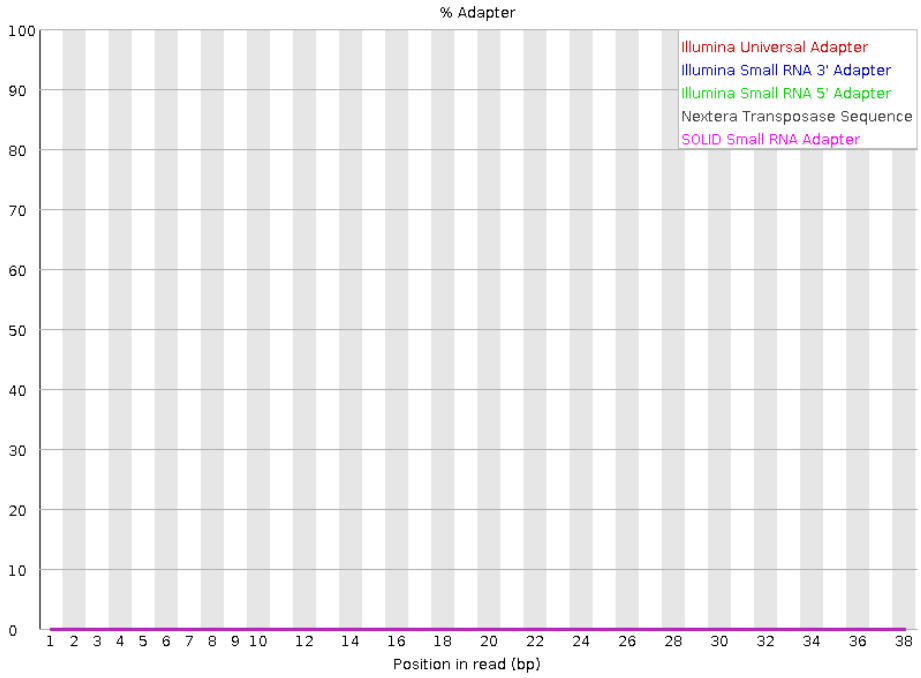


图 10: Adapter content (Processed)

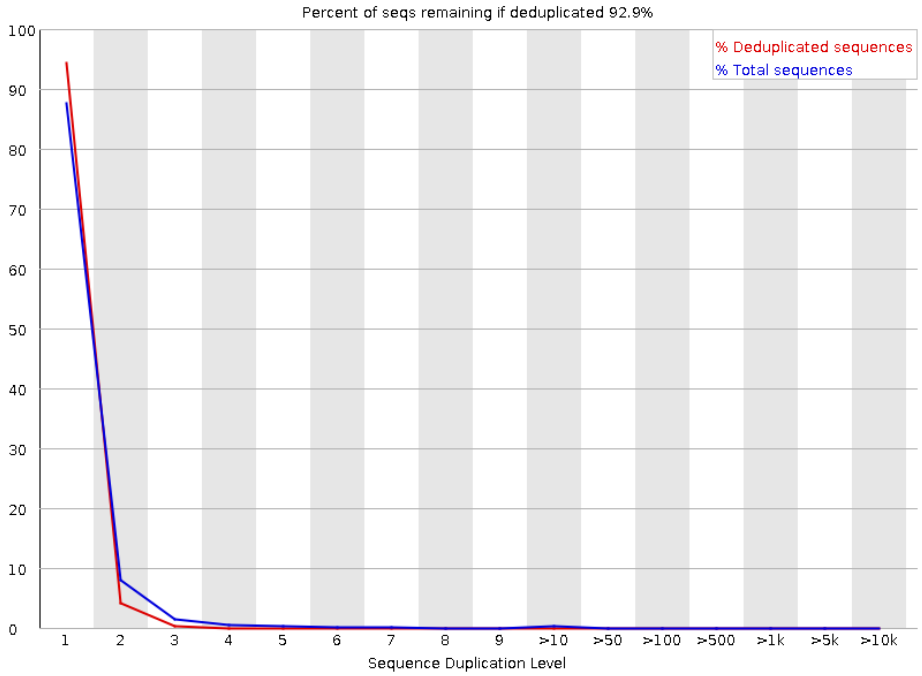


图 11: Duplication levels (Processed)

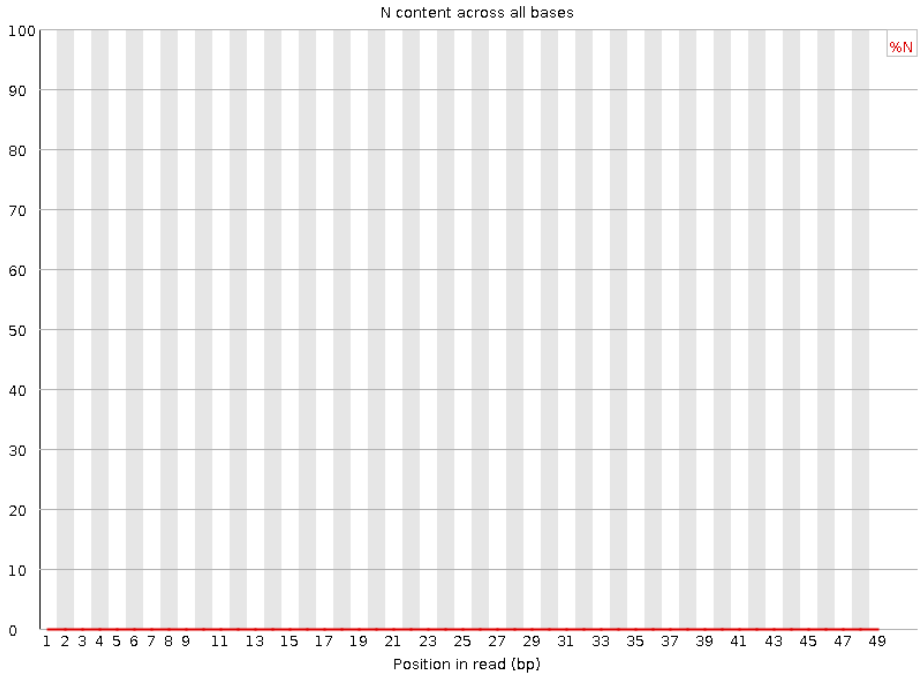


图 12: Per base N content (Processed)

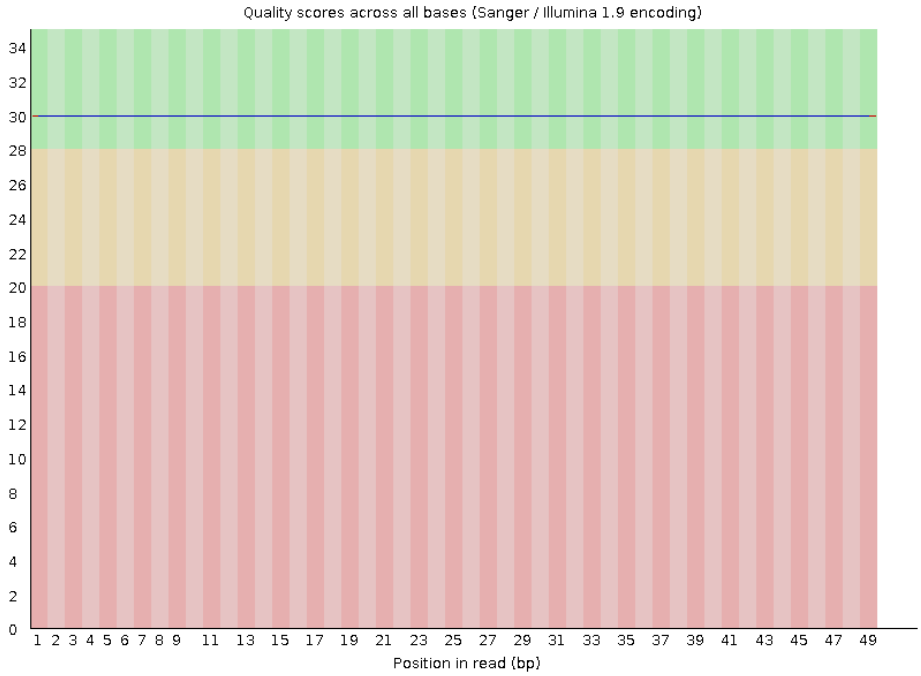


图 13: Per base quality (Processed)

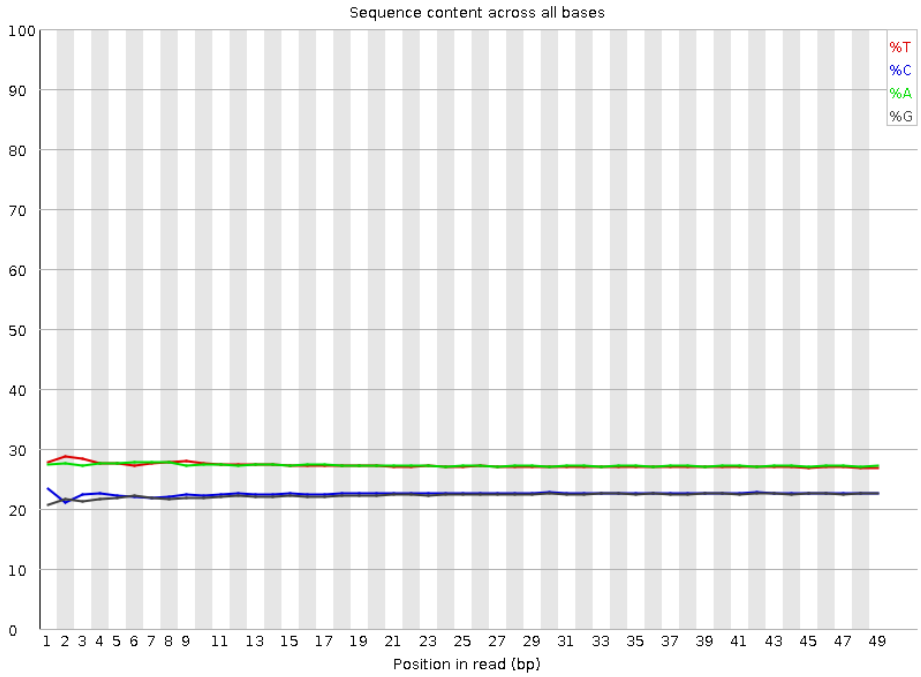


图 14: Per base sequence content (Processed)

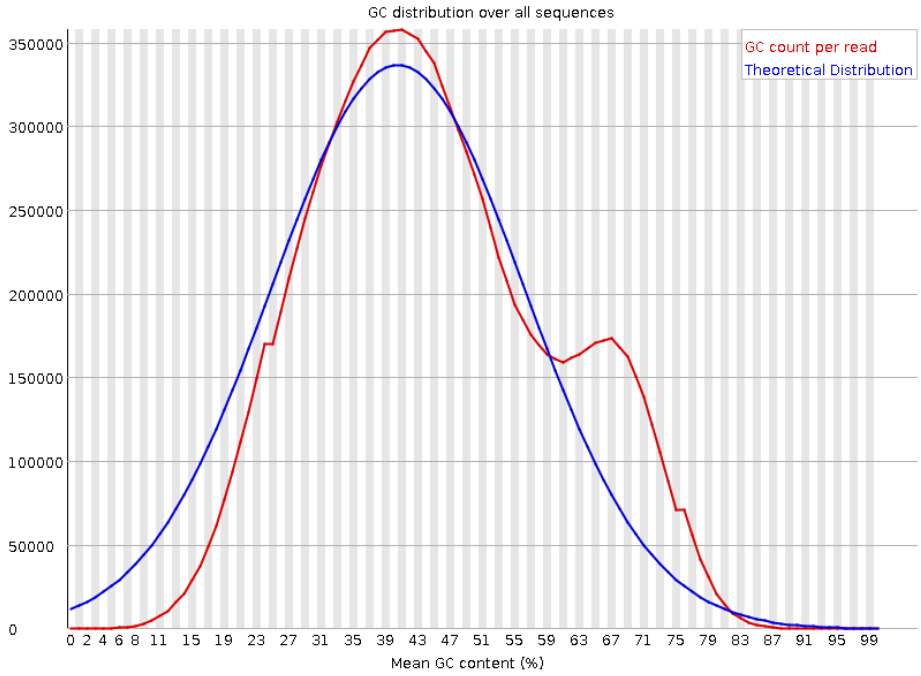


图 15: Per sequence GC content (Processed)

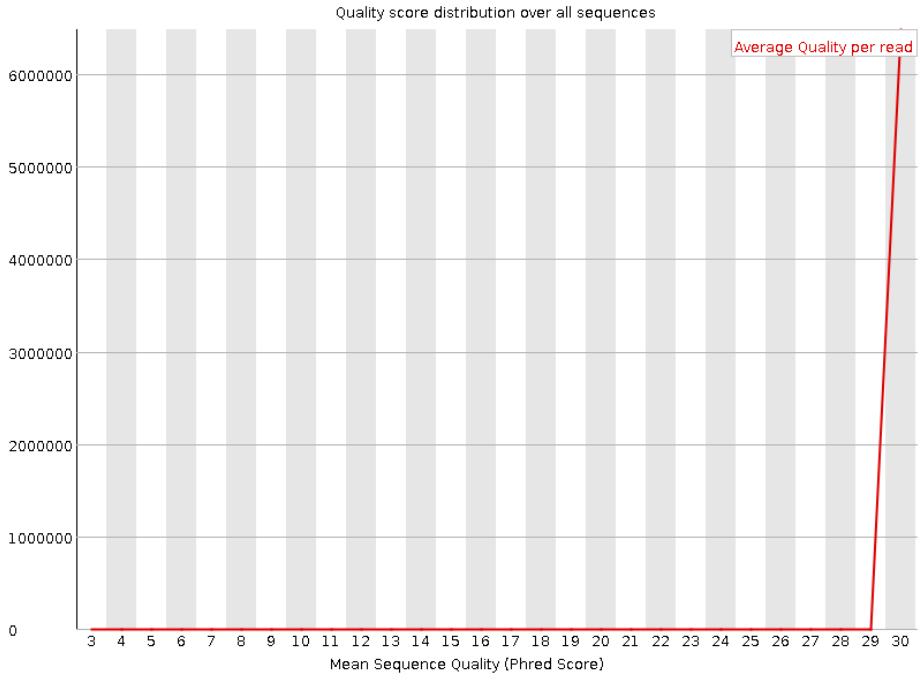


图 16: Per sequence quality (Processed)

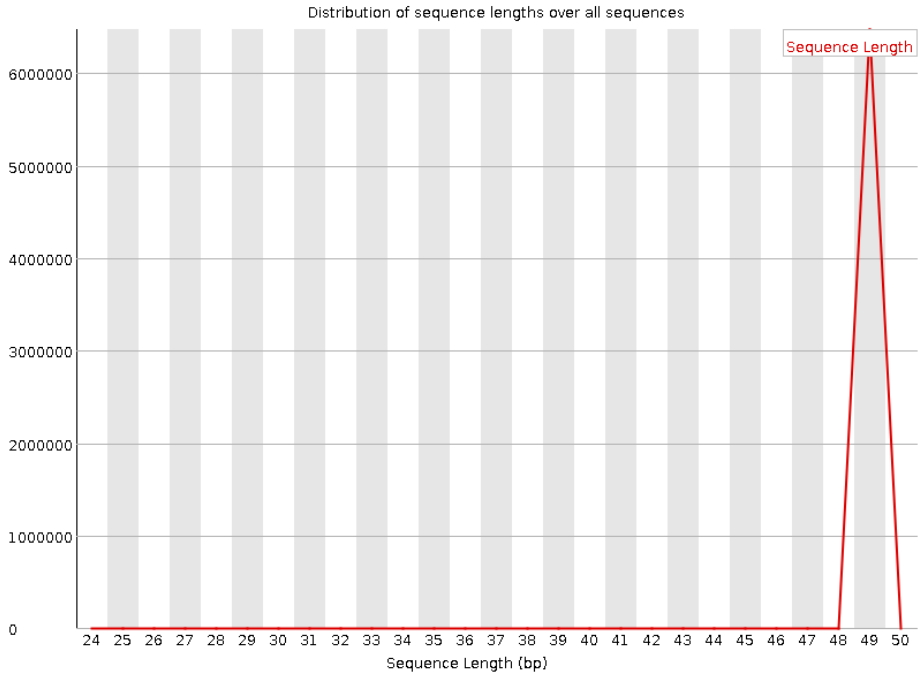


图 17: Sequence length distribution (Processed)

- 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。

2.4 BWA 比对

2.4.1 建立参考基因组索引

使用 BWA 软件进行比对之前，需要先建立索引，索引是一种数据结构，可以加快比对的速度，减少内存的占用。建立索引的原理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哈希表，记录每个 k-mer 的出现位置。比对的时候，BWA 会将 reads 也分割成多个子序列，然后在哈希表中查找匹配的位置，从而找到最佳的比对位置。

具体命令：`bwa index c_elegans.PRJNA275000.WS286.genomic.fa.gz`

得到文件：`c_elegans.PRJNA275000.WS286.genomic.fa`

2.4.2 BWA 比对

具体命令：

```
1 bwa mem ~/bwa_index/c_elegans.PRJNA275000.WS286.genomic.fa ~/
    SRR14325856.processed.fastq > ~/bwa_result/c_elegans_ChIP-Seq.sam
```

得到文件：c_elegans_ChIP-Seq.sam

2.5 Bowtie 比对

2.5.1 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
```

2.5.2 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

2.6 Samtools 统计比对结果

2.6.1 BWA 比对结果

具体命令：

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

输出结果：

```
6479093 + 0 in total (QC-passed reads + QC-failed reads)
0 + 0 secondary
9 + 0 supplementary
0 + 0 duplicates
3428962 + 0 mapped (52.92\% : 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)
```

2.6.2 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)
```

2.7 Peak Calling

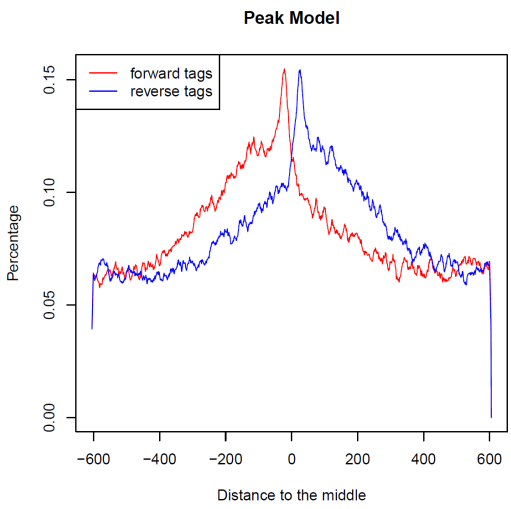
利用计算的方法找到 ChIP-seq 或 ATAC-seq 中 reads 富集的基因组区域。

具体命令：

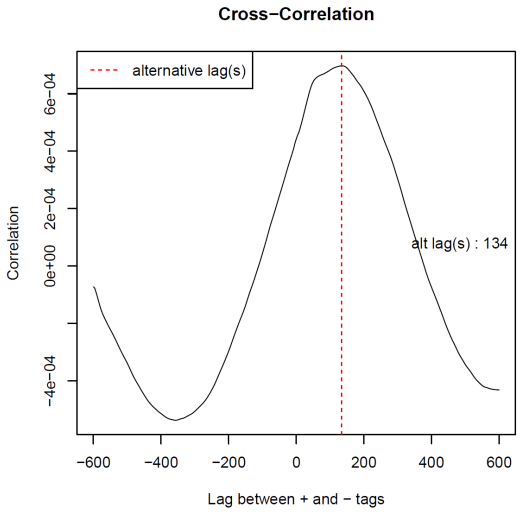
```
macs2 callpeak -t ~/bwa_result/c_elegans_ChIP-Seq.sam -f SAM -g ce -
    n test
```

生成文件：

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



Peak model



Cross-Correlation

图 18: Peak calling 结果

2.8 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.

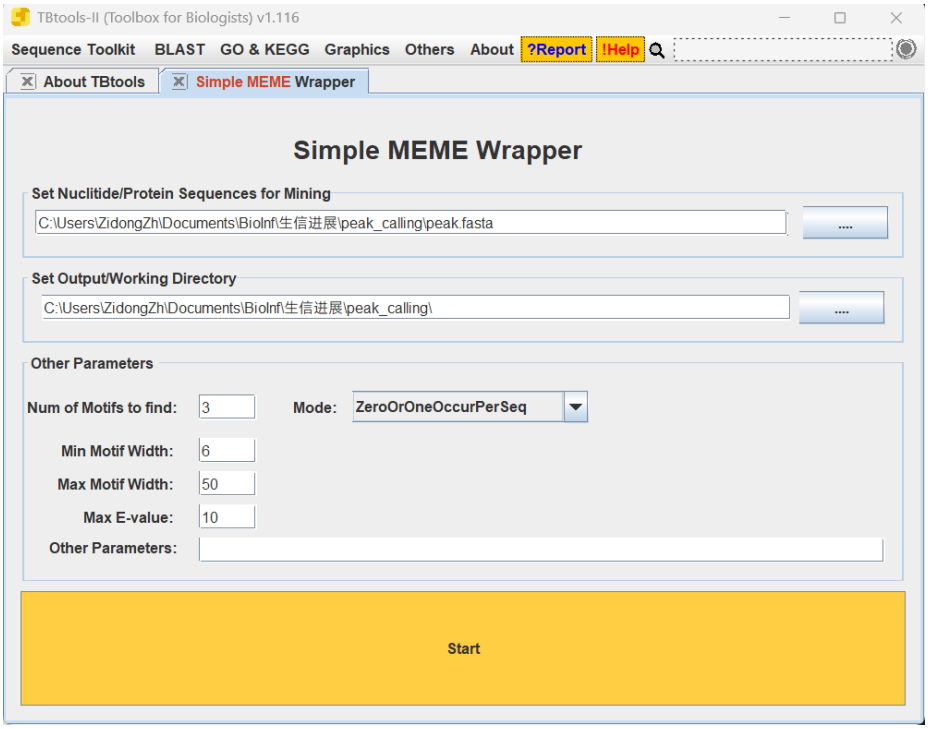


图 19: TBtools 下使用 MEME

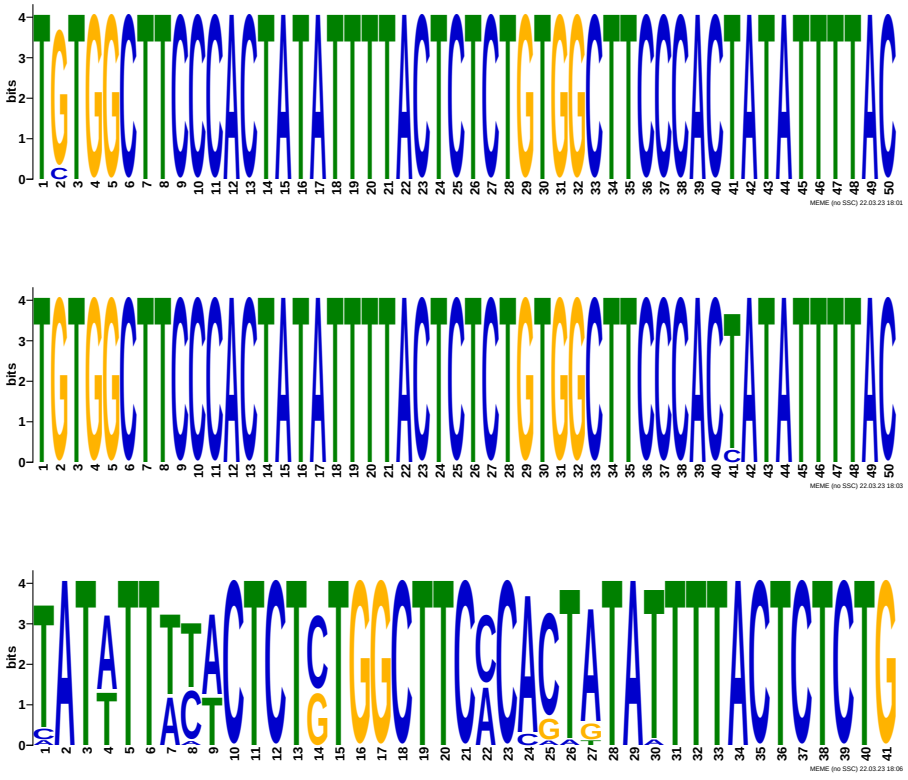


图 20: MEME 输出结果

2.9 Peak 注释

使用 R 包 ChIPseeker 进行 peak 注释。

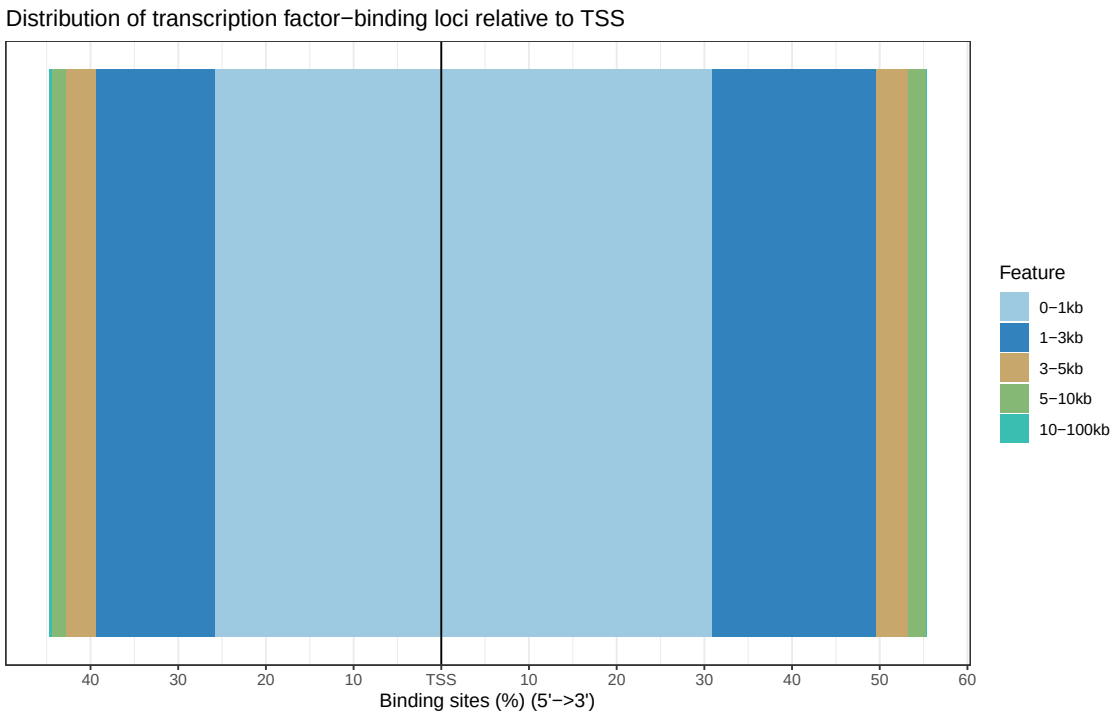
具体命令：

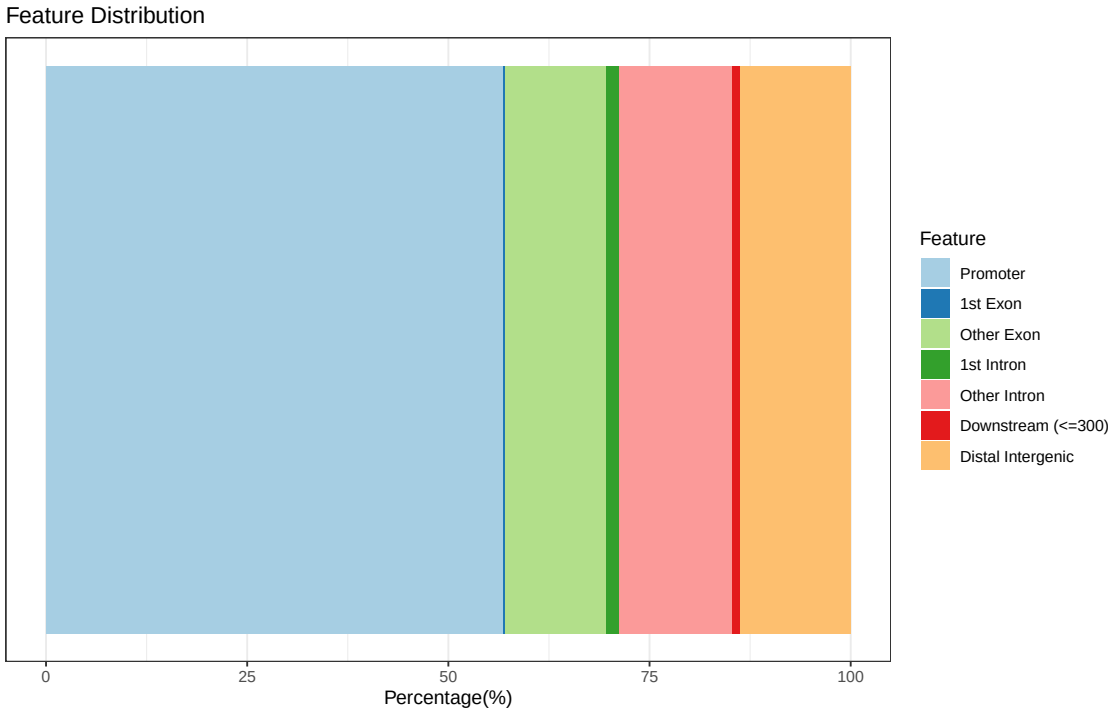
```
library(ChIPseeker)
library(GenomicFeatures)
txdb <- makeTxDbFromGFF(file = file.choose(), format = "gff3")
peak <- readPeakFile(file.choose())
peakAnno <- annotatePeak(peak,
                         TxDb=txdb,
                         tssRegion=c(-1000, 1000))
```

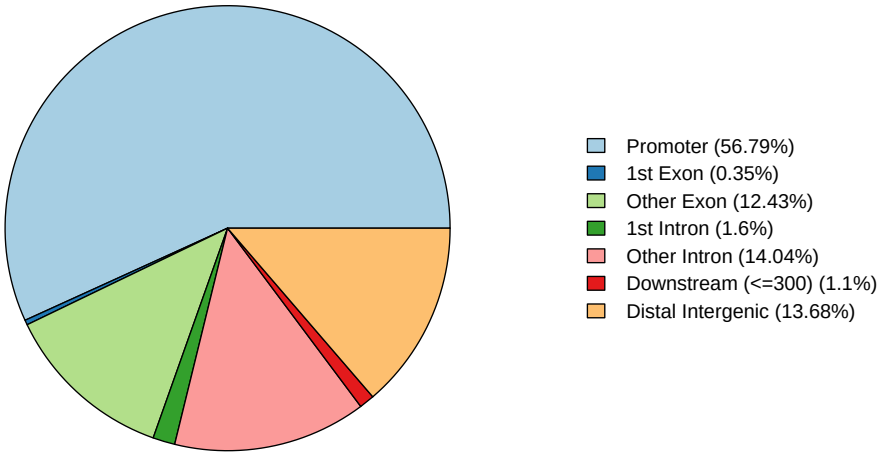
导出 Gene List 用于进一步的 Gene Ontology 分析。

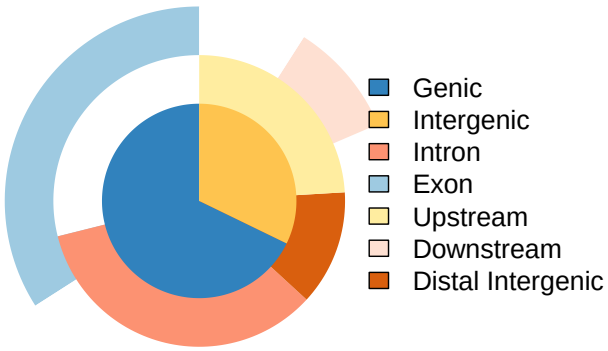
```
df <- as.data.frame(peakAnno)
gene <- df[,14]
write.table (gene, file ="D:\\gene_list.txt", sep ="", row.names =
    FALSE, col.names =FALSE, quote =FALSE)
```

结果可视化：



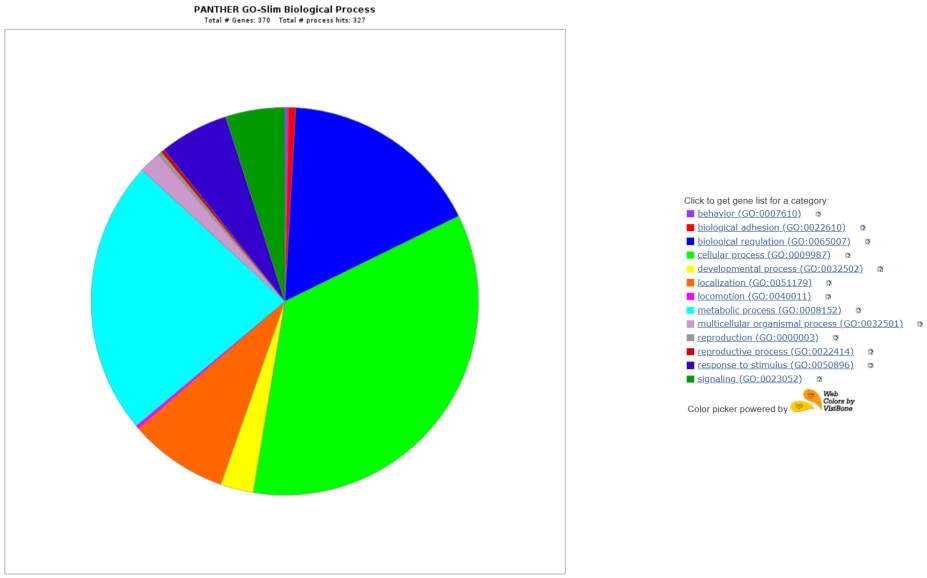

Feature Distribution
0
25
50
75
100
Percentage(%)
Feature
Promoter
1st Exon
Other Exon
1st Intron
Other Intron
Downstream (<=300)
Distal Intergenic

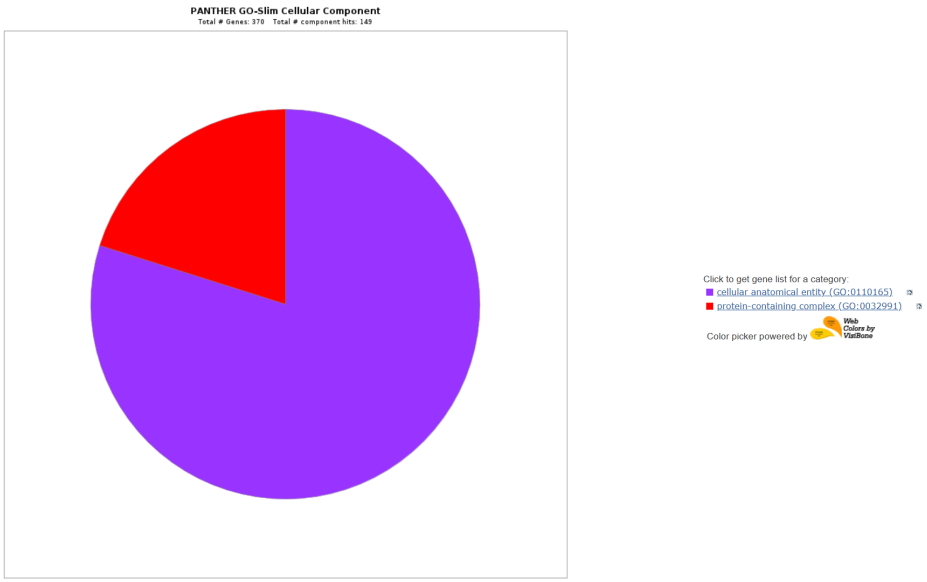

Promoter (56.79%)
1st Exon (0.35%)
Other Exon (12.43%)
1st Intron (1.6%)
Other Intron (14.04%)
Downstream (<=300) (1.1%)
Distal Intergenic (13.68%)

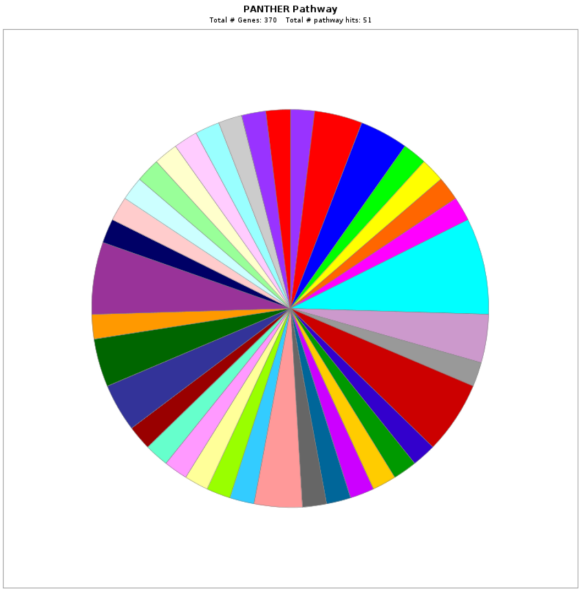

Genic
Intergenic
Intron
Exon
Upstream
Downstream
Distal Intergenic

2.10 Gene Ontology

使用 Panther 进行 GO 分析。将 gene list 上传至 Panther 网站，选择物种为线虫。结果：

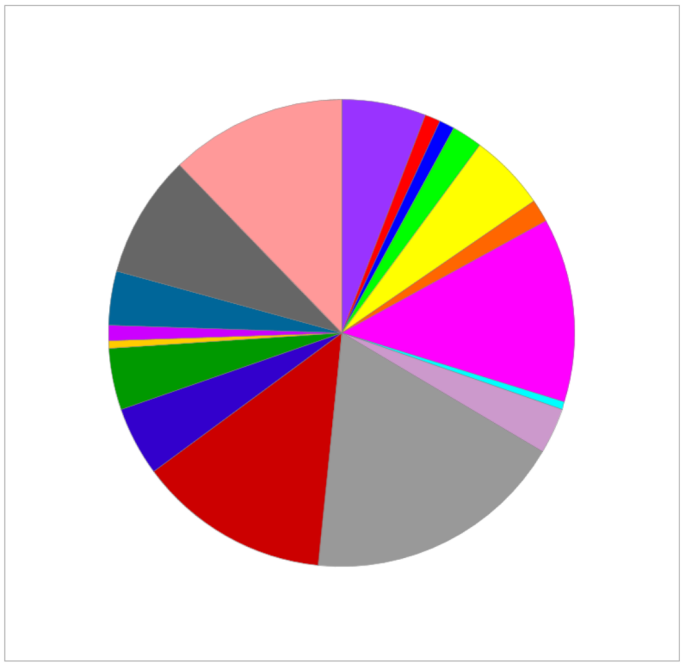






Click to get gene list for a category:

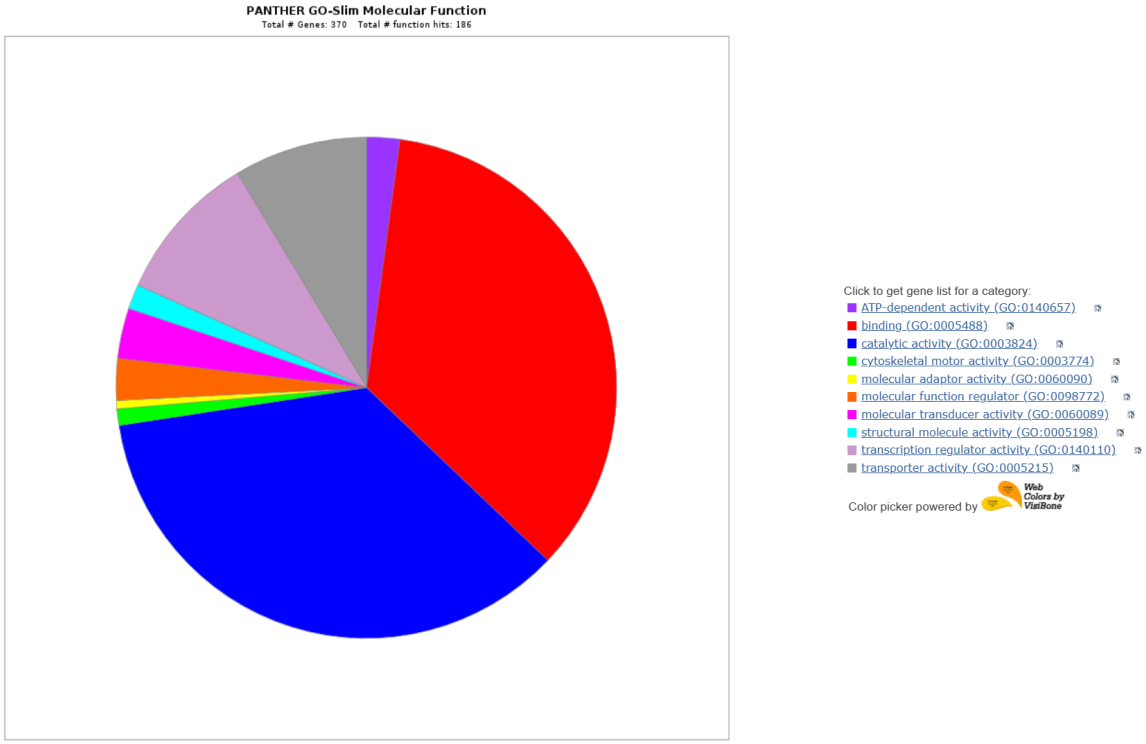
- Alzheimer disease-presenilin pathway (P00004)
- Angiogenesis (P00005)
- Apoptosis signaling pathway (P00006)
- Blood coagulation (P00011)
- Cell cycle (P00013)
- Cytoskeletal regulation by Rho GTPase (P00016)
- DNA replication (P00017)
- EGF receptor signaling pathway (P00018)
- Endothelin signaling 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 VanBone


PANTHER GO-Slim Molecular Function
Total # Genes: 370 Total # function hits: 186
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

3 实验总结

3.1 数据预处理

这一步主要完成对原始数据进行质量评估和去接头处理。了解了 FastQC 和 Trimmomatic 软件的使用流程：

- FastQC 是一个用于检测测序数据质量的工具，可以直接对压缩文件进行操作，生成质量报告。可以根据报告中的各项指标来判断数据是否需要进行去接头和质量过滤。
- Trimmomatic 是一个用于修剪和裁剪测序数据的工具，支持多线程和双端模式。可以使用该工具去除技术序列（如接头、PCR 引物等）和低质量碱基。
- 使用 Trimmomatic 时，需要提供序列文件，并指定相应的参数，如最小重叠碱基数、最多错配数、最小长度等。还可以选择不同的裁剪策略，如滑动窗口法、平均质量法等。
- 使用 Trimmomatic 后，再次使用 FastQC 检测处理后的数据质量，并与原始数据进行比较。

3.2 序列比对

在序列比对中主要使用了 BWA 和 Bowtie 两个软件，需要注意以下几点：

- 在进行比对之前，需要检查测序数据的质量，去除低质量的序列，去除接头序列，去除重复序列等，以提高比对的准确性和效率。
- 在进行比对之后，需要检查比对结果的质量，去除低质量的比对，去除重复的比对，去除错误的比对等，以提高后续分析的准确性和效率
- 进行比对和统计的过程中，需要注意数据的格式，文件的路径，参数的设置，命令的输出等，以避免出现错误或者异常。

3.3 Peak Calling & Motif Analysis

使用 MACS 和 MEME 进行数据分析时需要注意：

- 选择合适的对照组和参数，以减少假阳性和假阴性的结果。
- 对于宽峰或窄峰，使用不同的模式和参数进行分析。
- 对于差异 peak 分析，考虑到样本间的批次效应和生物学重复性。
- 对于 motif 分析，考虑到基因组背景和转录因子结合位点的特征。