天津医科大学理论课教案首页

课程名称：系统生物学　　**课程内容/章节：**基因组学（测序数据分析）/ 第 2 章

教师姓名：伊现富　　**职称：**讲师　　**教学日期：**2016 年 9 月 20 日 13:30-15:30

授课对象：生物医学工程与技术学院 2013 级生信班（本）　　**听课人数：**28

授课方式：理论讲授　　**学时数：**2　　**教材版本：**系统生物学，第 1 版

教学目的与要求（分掌握、熟悉、了解、自学四个层次）：

- 掌握 FASTQ、BED、GFF 等数据格式，第二代测序数据分析的基本流程，外显子组测序的分析步骤。
- 熟悉 SAM、VCF 等数据格式，测序深度、覆盖度等术语，测序数据分析的常用工具。
- 了解 SRA、GEO 等数据库，外显子组测序的流程和应用。
- 自学 SRA、GEO 等数据库的使用，测序数据分析常用工具的使用。

授课内容及学时分配：

- (5’) 引言与导入：回顾第二代测序的主要技术和基本流程。
- (30’) 数据库与数据格式：介绍 SRA 和 GEO 等与第二代测序相关的数据库，讲解第二代测序数据分析中常见的 FASTQ、SAM、BED、GFF 和 VCF 等数据格式。
- (40’) 测序数据分析：讲解测序深度和覆盖度等术语，总结测序数据分析的主要流程，介绍分析流程中每个步骤的作用、常用工具和注意事项。
- (20’) 外显子组测序：介绍外显子组测序的基本流程，讲解外显子组测序数据分析的基本步骤，通过实例介绍外显子组测序的应用。
- (5’) 总结与答疑：总结授课内容中的知识点与技能，解答学生疑问。

教学重点、难点及解决策略：

- 重点：FASTQ、BED、GFF 等数据格式，第二代测序数据的分析流程。
- 难点：SAM、VCF 等数据格式。
- 解决策略：通过实例讲解和比较类比帮助学生理解、记忆。

专业外语词汇或术语：

深度（depth）
覆盖度（coverage）
质量控制（QC，quality control）
预处理（preprocessing）
外显子组测序（WES，whole exome sequencing）
全基因组测序（WGS，whole genome sequencing）

辅助教学情况：

- 多媒体：与第二代测序相关的数据库和数据格式。
- 板书：第二代测序数据的分析流程。

复习思考题：

- 举例说明 FASTQ、BED 和 GFF 数据格式。
- 解释测序深度和覆盖度。
- 总结测序数据分析的基本流程。
- 列举测序数据分析中的常用工具。

参考资料：

- 维基百科等网络资源。

一、 引言与导入（5 分钟）

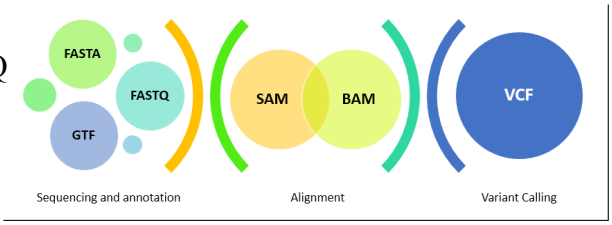
1. 测序历史：第一代（Sanger）⇒ 第二代（高通量）⇒ 第三代（单分子）
2. 二代测序：Roche/454，Illumina/Solexa（桥式扩增 + 边合成边测序），ABI/SOLiD

二、 数据库与数据格式（30 分钟）

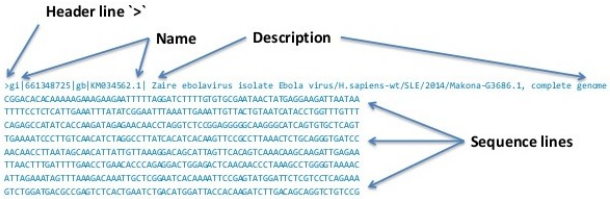
1. 数据库
   - 测序数据：SRA（Sequence Read Archive），GEO（Gene Expression Omnibus）
   - 肿瘤相关：TCGA（Cancer Genome Atlas），ICGC（International Cancer Consortium）
   - 其他：1000 Genomes Project
2. 数据格式

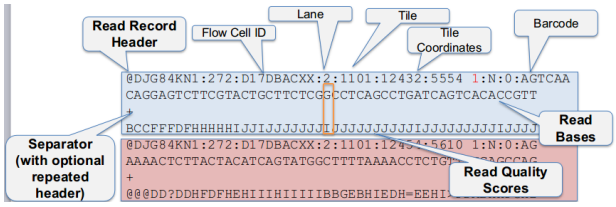
(1) 简介

- 序列与读段：FASTA、2bit，FASTQ
- 读段比对：SAM、BAM
- 特征注释：BED、GTF/GFF
- 变异信息：VCF、BCF



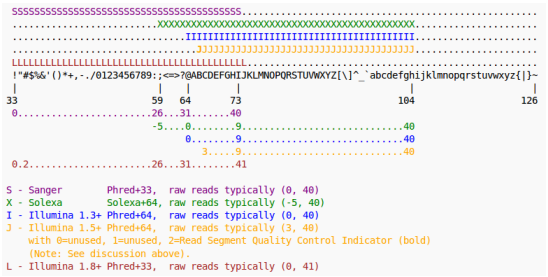
(2) 【重点】序列格式：FASTA 和 FASTQ

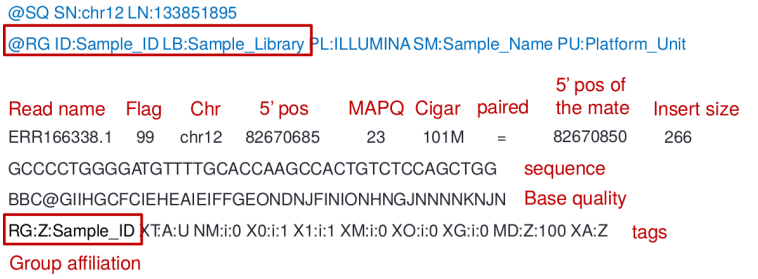




- FASTQ = FASTA + PHRED (quality score)
- 常用后缀：.fq, .fastq
- ID：/1 和/2⇒PE
- PHRED：$Q_{sanger} = -10log_{10}p$

Phred Quality Score	Probability of Incorrect Base Call	Base Call Accuracy	
10	1 in 10	90%	
20	1 in 100	99%	→ 1% error rate
30	1 in 1,000	99.9%	
40	1 in 10,000	99.99%	
50	1 in 100,000	99.999%	





(3) 【难点】比对格式：SAM

- SAM：Sequence Alignment/Map format, human readable
- BAM：Binary version of SAM, compress⇒smaller, index⇒random access

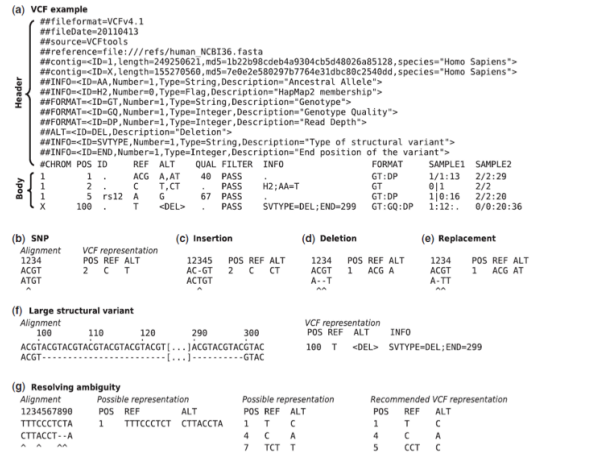
(4) 【重点】注释格式：BED 和 GTF/GFF

- BED⇒bigBed, bedGraph
- GTF: GFF2.5, Gene Transfer Format
- GFF: GFF3, General Feature Format
- 坐标系统
  - BED: [0-based), length=stop-start
  - GTF/GFF: [1-based], lengt=stop-start+1

chr1	817371	819837	ENSG00000177757.2_FAM87B_lincRNA	0	+
chr1	826206	827522	ENSG00000225880.5_LINC00115_lincRNA	0	-
chr1	827608	859446	ENSG00000228794.5_LINC01128_processed_transcript	0	+
chr1	868071	876903	ENSG00000230368.2_FAM41C_lincRNA	0	-
chr1	873292	874349	ENSG00000234711.1_TUBB8P11_unprocessed_pseudogene	0	+
chr1	904834	915976	ENSG00000272438.1_RP11-54O7.16_lincRNA	0	+
chr1	911435	914948	ENSG00000230699.2_RP11-54O7.1_lincRNA	0	+
chr1	914171	914971	ENSG00000241180.1_RP11-54O7.2_lincRNA	0	+
chr1	916865	921016	ENSG00000223764.2_RP11-54O7.3_lincRNA	0	-
chr1	924880	944581	ENSG00000187634.7_SAMD11_protein_coding	0	+

(5) 【难点】变异格式：VCF

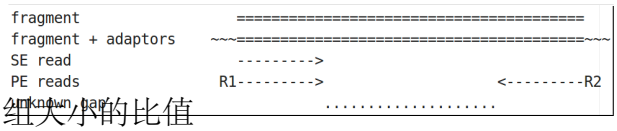
```
##GTF format
381 Twinscan  exon          150   200   .   +   .  gene_id "381.000"; transcript_id "381.000.1";
381 Twinscan  exon          300   401   .   +   .  gene_id "381.000"; transcript_id "381.000.1";
381 Twinscan  CDS           380   401   .   +   0  gene_id "381.000"; transcript_id "381.000.1";
381 Twinscan  exon          501   650   .   +   .  gene_id "381.000"; transcript_id "381.000.1";
381 Twinscan  CDS           501   650   .   +   2  gene_id "381.000"; transcript_id "381.000.1";
381 Twinscan  exon          700   800   .   +   .  gene_id "381.000"; transcript_id "381.000.1";
381 Twinscan  CDS           700   707   .   +   2  gene_id "381.000"; transcript_id "381.000.1";
381 Twinscan  exon          900  1000   .   +   .  gene_id "381.000"; transcript_id "381.000.1";
381 Twinscan  start_codon   380   382   .   +   0  gene_id "381.000"; transcript_id "381.000.1";
381 Twinscan  stop_codon    708   710   .   +   0  gene_id "381.000"; transcript_id "381.000.1";


##gff-version 3
##sequence-region   ctg123 1 1497228
ctg123 Prokka gene             1000  9000  .  +  .  ID=gene00001;Name=EDEN
ctg123 Prokka TF_binding_site 1000  1012  .  +  .  ID=tfbs00001;Parent=gene00001
ctg123 Prokka mRNA             1050  9000  .  +  .  ID=mRNA00001;Parent=gene00001;Name=EDEN.1
ctg123 Prokka mRNA             1050  9000  .  +  .  ID=mRNA00002;Parent=gene00001;Name=EDEN.2
ctg123 Prokka mRNA             1300  9000  .  +  .  ID=mRNA00003;Parent=gene00001;Name=EDEN.3
ctg123 Prokka exon             1300  1500  .  +  .  ID=exon00001;Parent=mRNA00003
ctg123 Prokka exon             1050  1500  .  +  .  ID=exon00002;Parent=mRNA00001,mRNA00002
ctg123 Prokka exon             3000  3902  .  +  .  ID=exon00003;Parent=mRNA00001,mRNA00003
ctg123 Prokka exon             5000  5500  .  +  .  ID=exon00004;Parent=mRNA00001,mRNA00002,mRNA00003
ctg123 Prokka exon             7000  9000  .  +  .  ID=exon00005;Parent=mRNA00001,mRNA00002,mRNA00003
ctg123 Prokka CDS              1201  1500  .  +  0  ID=cds00001;Parent=mRNA00001;Name=edenprotein.1
ctg123 Prokka CDS              3000  3902  .  +  0  ID=cds00001;Parent=mRNA00001;Name=edenprotein.1
ctg123 Prokka CDS              5000  5500  .  +  0  ID=cds00001;Parent=mRNA00001;Name=edenprotein.1
ctg123 Prokka CDS              7000  7600  .  +  0  ID=cds00001;Parent=mRNA00001;Name=edenprotein.1
ctg123 Prokka CDS              1201  1500  .  +  0  ID=cds00002;Parent=mRNA00002;Name=edenprotein.2
ctg123 Prokka CDS              5000  5500  .  +  0  ID=cds00002;Parent=mRNA00002;Name=edenprotein.2
ctg123 Prokka CDS              7000  7600  .  +  0  ID=cds00002;Parent=mRNA00002;Name=edenprotein.2
ctg123 Prokka CDS              3301  3902  .  +  0  ID=cds00003;Parent=mRNA00003;Name=edenprotein.3
ctg123 Prokka CDS              5000  5500  .  +  1  ID=cds00003;Parent=mRNA00003;Name=edenprotein.3
ctg123 Prokka CDS              7000  7600  .  +  1  ID=cds00003;Parent=mRNA00003;Name=edenprotein.3
```

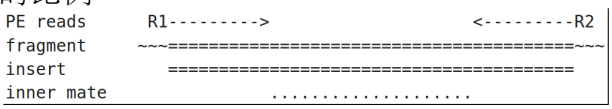


三、 测序数据分析（40 分钟）

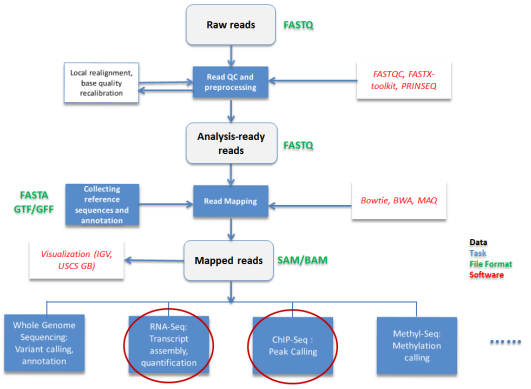
1. 常见术语

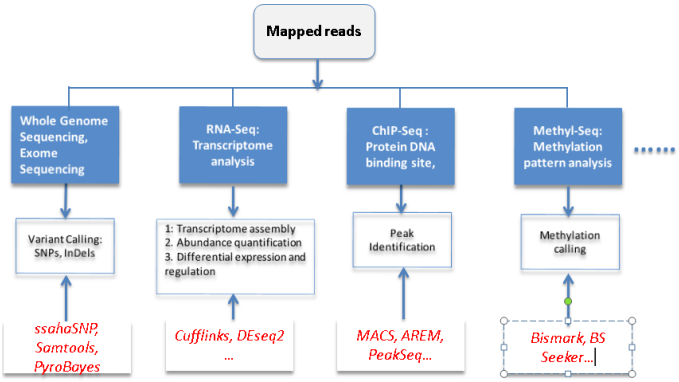
- 深度：测序得到的总碱基数与待测基因组大小的比值
- 覆盖度：测序获得的序列占整个基因组的比例
- SE(single end) vs.PE(paired end)
- PE: insert vs. inner mate distance





2. 分析流程





(1) Quality Control: FastQC, NGS QC Toolkit, SolexaQA

(2) Preprocessing(trim & filter): FASTX-Toolkit, PRINSEQ

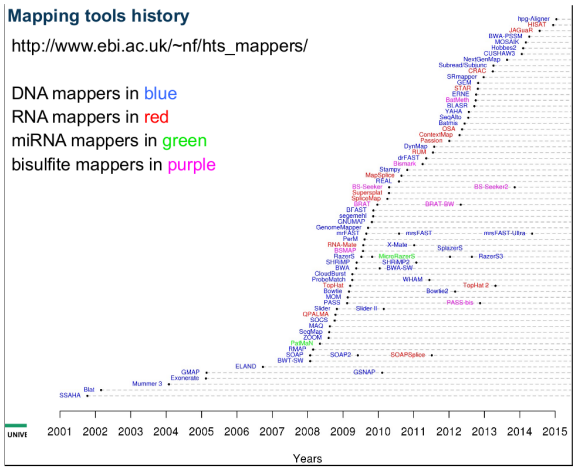
(3) Mapping: BWA, Bowtie, SOAP

(4) Calling Variants: Samtools, GATK, VarScan

(5) Variant Annotation: SnpEff, ANNOVAR, SeattleSeq Annotation, SIFT, PolyPhen-2

(6) Visualization: Genome Browser, IGV, Tablet, Circos

(7) Others: Galaxy, Picard, bedtools, BEDOPS, csvkit



3. 补遗

- Removal of PCR duplicates
- Indel Realignment
- Base quality recalibration
- Others: Replicates(biological vs. technical), depth, length, SE vs. PE

四、 外显子组测序（20 分钟）

1. 基本概念
   - exome：genome ⇒ 1%，30Mb
   - WES：exome ⇒ sequencing
   - WGS：genome ⇒ sequencing
2. 【重点】流程：实验 + 分析
3. 应用实例

五、 总结与答疑（5 分钟）

1. 知识点
   - 数据库：SRA、GEO
   - 数据格式：FASTQ、BED、GTF/GFF，SAM、VCF
   - 测序术语：深度、覆盖度、PE
   - 分析流程：QC、preprocessing, mapping、variants、annotation, visualization
   - 外显子组测序：实验与分析流程
2. 技能
   - 测序数据分析软件：使用方法
   - 全基因组测序：数据分析
   - 外显子组测序：数据分析