Ćwiczenie nr 3 z MBI, Resekwencjonowanie genomu człowieka

Kinga Kimnes, Jakub Skałecki

18 grudnia 2019

W ramach przeprowadzanego ćwiczenia wykorzystano plik FASTA zawierający fragment ludzkiego genomu referencyjnego (GRCh37) uzyskanego przez Human Genome Consortium w 2009 roku. Plik ten zawiera sekwencję chromosomu 1.

1 Mapowanie

Początkowo dokonano indeksowania pliku FASTA poprzez zastosowanie programu BWA (Burrows-Wheeler Alignment Tool). Jest on stosowany do mapowania sekwencji o małej rozbieżności względem duzego genomu referencyjnego, takiego jak genom ludzki. Pakiet BWA składa się z trzech algorytmów: BWA-backtrack, BWA-SW oraz BW-MEM, przy czym dla zapytań o wysokiej jakości zalecany jest ostatni z nich z uwagi na wydajność i dokładność. Następnie, za pomocą ostatniego ze wskazanych algorytmów - BWA-MEM, wygenerowano plik SAM (Sequence Alignment/Map) zawierający mapowania kolejnych sekwencji z pliku coriell_chr1.fq na sekwencję referencyjną, którą stanowił plik chr1.fa (sekwencja chromosomu 1).

Typowa (średnia) długość odczytu to 75.5bp, o odchyleniu standardowym równym około 1.17. W dalszej kolejności dokonano sortowania mapowań oraz wygenerowano plik BAM (Binary Alignment/Map - stanowiący binarny odpowiednik pliku SAM). Rozmiary plików wynosiły kolejno: FASTQ-57MB, SAM - 77MB, BAM - 14MB.

Plik FASTQ zawiera sekwencje (odczyty) oraz zapisaną symbolicznie ocenę jakości dla każdego nukleotydu (ilość równa długości sekwencji). Plik SAM zawiera ponadto informacje o mapowaniu sekwencji na genom referencyjny, co czyni go większym.

2 Wizualizacja przykładowego wariantu w genie IQGAP3

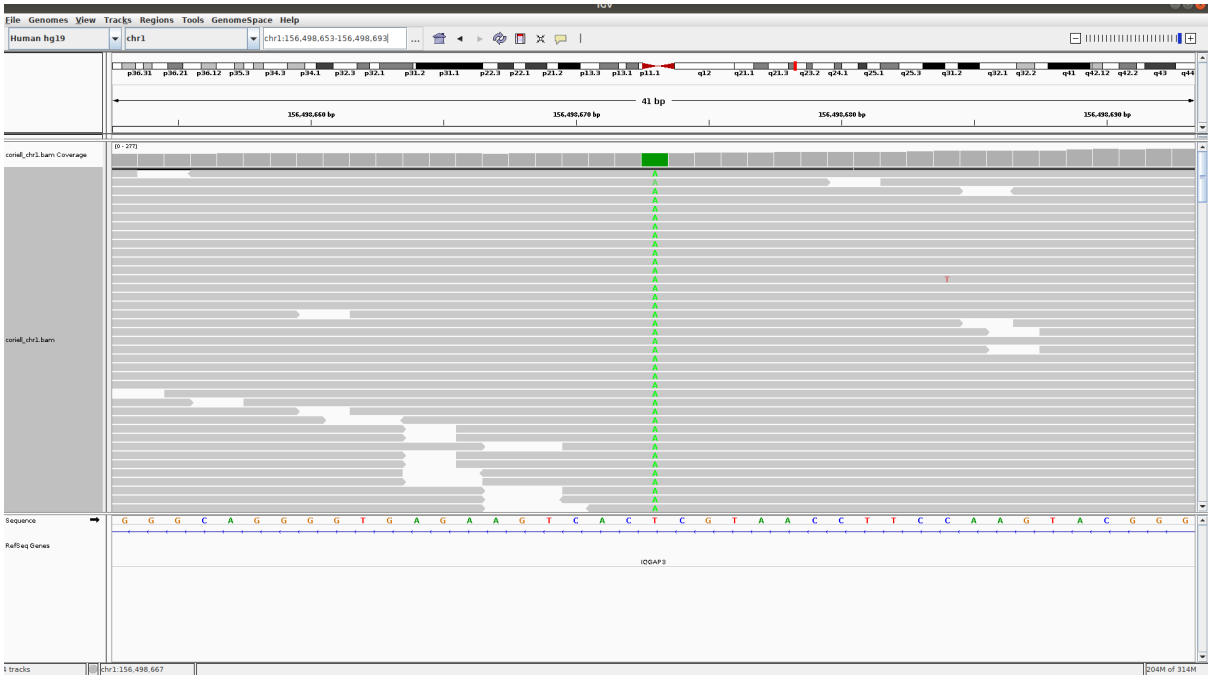
Przykładowy wariant ma pozycję 156,498,673 i jest wariantem homozygotycznym. Zrzut ekranu znajduje się na rysunku 2.

3 Wykrywanie wariantów

Ilość wariantów bez filtracji to 6050, po odfiltrowaniu wariantów z pokryciem mniejszym niż 11 zostało ich 241. Dalsza filtracja może odbyć się po np INFO/MQ - średnia jakość mapowania.

4 Adnotacje wariantów

W wyniku przeprowadzonej za pomocą narzędzia Variant Effect Predictor adnotacji przefiltorwanego pliku VCF uzyskano wykres typu "pie chart" przedstawiający statystyki wariantów. Największy udział procentowy posiada intron_variant (36%). Odpowiadające mu wiersze zamieszczono w tabeli 1.



Rysunek 1: Przykładowy wariant w oknie IGV

Tabela 1:

. . 1:156498673-156498673 A intron_variant MODIFIER IQGAP3 ENSG00000183856 Transcript ENST00000361170.2 protein_coding - 35/37 -------rs1171564 --1 -HGNC 20669 -----0.5998 --------
. 1:156498673-156498673 A upstream_gene_variant MODIFIER snoU13 ENSG00000238843 Transcript ENST00000458777.1 snoRNA ---------rs1171564 449 1 -RFAM ------0.5998 --------
. 1:156498673-156498673 A intron_variant,NMD_transcript_variant MODIFIER IQGAP3 ENSG00000183856 Transcript ENST00000491900.1 nonsense_mediated_decay -34/37 -------rs1171564 --1 -HGNC 20669 -----0.5998 --------

Jest to wariant w sekwencji niekodującej (o czym świadczy wartość w kolumnie Intron (35/37) oraz Consequence (intron_variant)) w pierwszym wierszu powyższego listingu.

5 Wnioski

Celem ćwiczenia była analiza danych z resekwencjonowania fragmentu genomu ludzkiego, a materiał badawczy stanowiła sekwencja chromosomu 1. W wyniku mapowania tejże sekwencji do genomu referencyjnego uzsykano dodatkowe informacje w postaci dopasowanych (wykrytych) wariantów - plik SAM.W celu zwizualizowania uzyskanych danych, wykorzystano program IGV, do którego załadowano binarny odpowiednik tego pliku. Otrzymane dane umożliwiają zarówno weryfikację różnic w stosunku do genomu referencyjnego, jak i pomiar tej różnicy (liczba nukleotydów oznaczonych jako inne niż referencyjne, zsumowana dla wszystkich pokryć). Raport wygenerowany w oparciu o przefiltrowany plik VCF za pomocą narzędzia VEP pozwolił na określenie typu adnotowanych wariantów. Duża część z nich występuje w intronach (sekwencjach niekodujących - 36%) i transkryptach niekodujących (10%). Pośród sekwencji kodujących, największą część stanowią warianty równoznaczne (57%) - w których nie następuje żadna zmiana kodowanego aminokwasu.