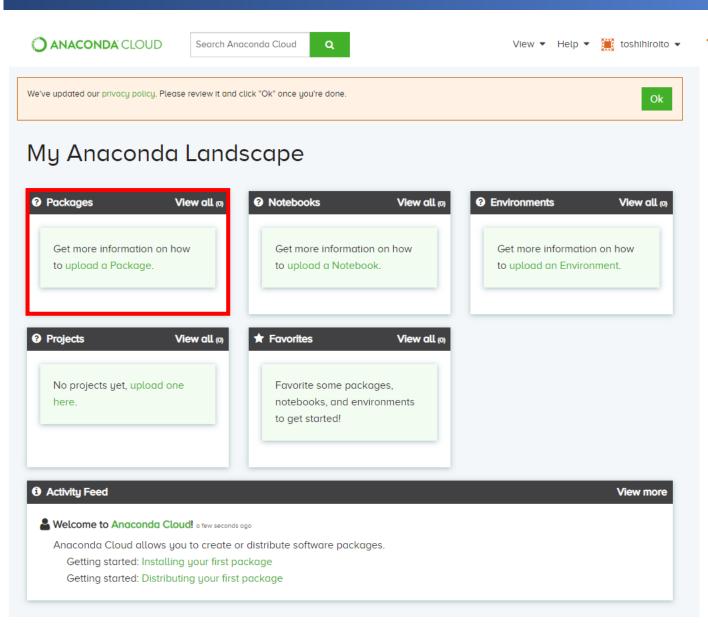
# バイオインフォマティクス トレーニング (第3回) 2021年6月24日

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 伊藤 寿宏 toshihiroito@nibiohn.go.jp

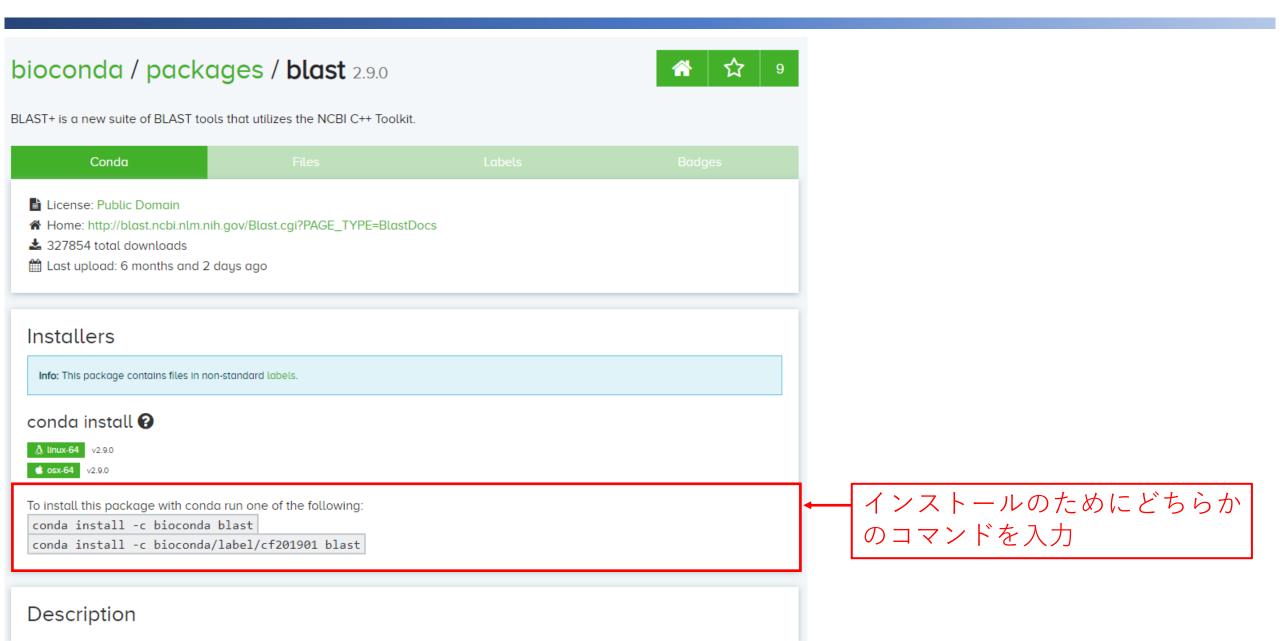
#### Anaconda・Minicondaとは



#### Anaconda · Miniconda

- ▶ オープンソースのパッケージマネージャーで、パッケージのインストールから、バージョン管理までを行うことが可能
- ➤ Anaconda Cloudでインストール可能なパッケージを確認できる(赤い □の部分)
- ➤ Anacondaは、必要以上に多くのパッケージをインストールすることがあることから、インストールに時間がかかる&ディスク容量を圧迫するので、Anacondaの最小構成であるMinicondaを利用が便利

#### Anaconda・Minicondaを用いたパッケージのインストール

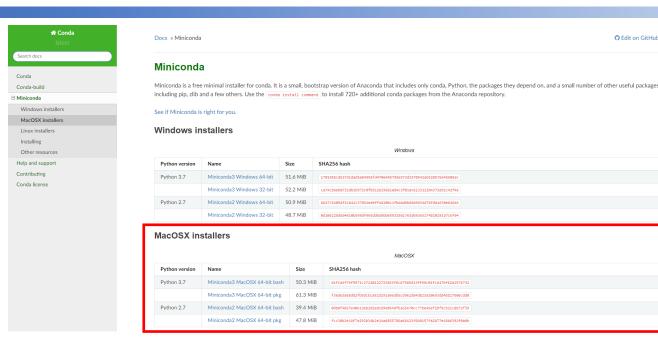


### コマンド操作(Biocondaパッケージをインストールしよう・その1)

# BIOCONDA®

**Bioconda** is a channel for the <u>conda</u> package manager specializing in bioinformatics software. Bioconda consists of:

- · a repository of recipes hosted on GitHub
- a build system turning these recipes into conda packages
- a repository of packages containing over 7000 bioinformatics packages ready to use with conda install
- over 850 contributors and 570 members who add, modify, update and maintain the recipes



◆ Minicondaをダウンロードし、システム環境構築しよう(ホームディレクトリ)

wget  $\{ \frac{\text{weblink}}{\text{weblink}} \}$  #OSおよびPythonのバージョンに合わせて、インストーラーをダウンロードする 【インストーラーを実行】 #minicondaのインストール(色々と質問されるが、基本的にEnterを押すか、もしくはYesと入力) cd miniconda $\{ \frac{\text{NN-Normal}}{\text{Normal}} \}$  / bin #miniconda2のインストール後に、更新されたbashの設定ファイルを再読み込み conda -h #condaが正常にインストールされたかどうかチェック。エラーが返ってこなければOK

./conda config --add channels conda-forge

./conda config --add channels defaults

./conda config --add channels r

./conda config --add channels bioconda

\_ #パッケージのレポジトリ名(チャネル)をminicondaの設定 ̄ファイルに登録する

#### condaコマンド

- ◆ conda: ディレクトリ移動のための基本コマンド
  - ➤ conda install 【パッケージ名】 [Anacondaリポジトリからパッケージをインストールする]
  - ➤ conda search 【パッケージ名の一部】 [Anacondaリポジトリに登録されているパッケージを検索する]
  - ▶ conda -c [パッケージをインストールするためのチャネルを設定する]
  - ➤ conda -y [途中で訊かれる質問をすべてyesで返す]

### コマンド操作(Biocondaパッケージをインストールしよう・その2)

◆ Biocondaパッケージ"BLAST"をインストールし、さらにNCBIデータベースを構築し、SRR444595.fastqファイルの配列を検索しよう

```
conda install -y htop #システム上で動いているプロセスやCPU・メモリの使用率を閲覧するためのツール
conda install -c bioconda -y blast #問い合わせ配列(Query)に類似した配列(Reference)をデータベース中から検索
するツール。Basic Local Alignment Search Toolの略
conda install -y fastx toolkit #FASTQ のクオリティコントロールによく利用されるツールの一つ
mkdir -p blastdb/nr && mkdir -p blastdb/nt #NCBIデータベースを構築するためのディレクトリを作成
cd blastdb/nt #ディレクトリ移動
screen #仮想ターミナルの起動
wget ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/nt.*.tar.gz #NCBI ntデータベースをダウンロード(時間がかかる)
#Ctrl+a+dでディタッチ、プロセス終了後に下記コマンドで解凍
tar -zxvf nt.*.tar.gz
cp ~/SRR444595.fastq ./
fastq to fasta -i SRR444595.fastq -o SRR444595.fasta -Q33 #SRR444595.fastqファイルをPhredクオリティスコアが
33(1/2000のベースコールミス)以上のreadだけを残すように、fastaファイルに変換
blastn -db nt -guery SRR444595.fasta -out SRR444595.csv #NCBI ntデータベースに対し、SRR444595.fastaファイル
のreadを検索
```

#### fasta形式

#### fasta

- ➤ NCBIやDDBJなどから塩基配列の情報だけを抽出してシンプルにした形式
- ➤ BLASTを用いて塩基配列、もしくはアミノ酸配列を検索する場合、配列情報をfasta形式で記述する必要がある
- 1行目:>で始まるヘッダ行で、アクセッション番号やシークエンスIDなどが記述されている
- 2行目:塩基配列、もしくはアミノ酸配列

>SRR444595.6 GA-K\_0045:1:1:4903:1082/1 TCTTCACCGGAATGAGAAGGATACTTCAGTTCTGAT

# fastq形式

#### fastq

- ▶ 次世代シークエンサーで検出されたシークエンスリードの配列を保存した形式
- ▶ シークエンスリードのクオリティチェックやデータの加工にはfastq形式のファイルが 主に用いられる

● 1行目:@で始まるヘッダ行で、アクセッション番号やシークエンスIDなどが記述されている

● 2行目:塩基配列

● 3行目:+で始まるヘッダ行

● 4行目:配列のクオリティスコア (ASCII 文字で表示)

@SRR444595.1 GA-K\_0045:1:1:2896:1080/1 GGNGGAGATGTTGTGACTGGTGGTGGTGCTGAGACA

+

??#9>?BBBBGGGDBDBDDEAFDAFB>BB?E>GG@8

Symbol	ASCII	Q-	Symbol	ASCII	Q-	Symbol	ASCII	Q-
	Code	Score		Code	Score		Code	Score
!	33	0	/	47	14	=	61	28
"	34	1	0	48	15	>	62	29
#	35	2	1	49	16	?	63	30
\$	36	3	2	50	17	@	64	31
%	37	4	3	51	18	A	65	32
&z	38	5	4	52	19	В	66	33
,	39	6	5	53	20	С	67	34
(	40	7	6	54	21	D	68	35
)	41	8	7	55	22	Е	69	36
*	42	9	8	56	23	F	70	37
+	43	10	9	57	24	G	71	38
,	44	11	:	58	25	Н	72	39
-	45	12	;	59	26	I	73	40
	46	13	<	60	27			

※塩基配列をシーケシングするときには塩基の解読エラー(ベースコールミス)が生じるので、エラーの生じる確率を $P_{error}$ とすると、クオリティスコア $Q=-10log_{10}P_{error}$ として算出される(Q=10: 塩基の解読エラーが生じる確率は10%、 Q=30: 塩基の解読エラーが生じる確率は0.1%)

クオリティスコアとASCII文字は、ASCII $_{code}=Q+33=-10log_{10}P_{error}+33$ の関係となる

# NCBI SRA (Sequence Read Archive) へのアクセス



#### データ取得方法

<u>ERX3654510</u>: Illumina HiSeq 4000 sequencing; Single cell RNA-sequencing of lineage-negative fraction of stromal cells isolated from inguinal white adipose tissue in mouse

1 ILLUMINA (Illumina HiSeq 4000) run: 5.2M spots, 260.5M bases, 122.6Mb downloads

Design: Single cell RNA-sequencing of lineage-negative fraction of stromal cells isolated from inguinal white adipose tissue in mouse

Submitted by: UCSF (University of California, San Francisco)

Study: Single cell RNA-sequencing of lineage-negative fraction of stromal cells isolated from inguinal white adipose tissue in mouse

PRJEB35376 • ERP118414 • All experiments • All runs

show Abstract

Sample: Protocols: Tissue of male C57BL6J mice was harvested, digested, and stromal cells isolated via differential centrifugation. The lineagenegative fraction of stromal cells was purified via affinity column. Following centrifugation and removal of the medium, cells were resuspended at a concentration of 150-500 cells/μL. This cell suspension was mixed with C1 Cell Suspension Reagent (Fluidigm, Cat # 634833) at the recommended ratio of 3:2 immediately before loading 5 μL of this final mix on the C1 IFC. Cells were lysed via Module 2 mRNA-seq kit per Fluidigm protocol specifications (PN 100-7168). Resultant mRNA was stabilized and reverse-transcribed using the SMARTer kit (Clontech), also per Fluidigm protocol specifications. Approximate run time was ~7.75 hours (6.5 hours for lysis, reverse transcription, and amplification; and 1.25 hours for harvest). 3μL amplicons were diluted with 10μL C1 DNA Dilution Reagent (Fluidigm) to generate 13 μL mix, and transferred to a new plate. Sample concentrations were normalize

SAMEA6225556 • ERS4025322 • All experiments • All runs

Organism: Mus musculus

#### Library:

Name: ING\_(no-Tx)\_single-219\_s
Instrument: Illumina HiSeq 4000

Strategy: RNA-Seg

Source: TRANSCRIPTOMIC SINGLE CELL

Selection: Oligo-dT Layout: SINGLE

Construction protocol: Tissue of male C57BL6J mice was harvested, digested, and stromal cells isolated via differential centrifugation. The lineage-negative fraction of stromal cells was purified via affinity column. Following centrifugation and removal of the medium, cells were resuspended at a concentration of 150–500 cells/µL. This cell suspension was mixed with C1 Cell Suspension Reagent (Fluidigm, Cat # 634833) at the recommended ratio of 3:2 immediately before loading 5 µL of this final mix on the C1 IFC. Cells were lysed via Module 2 mRNA-seq kit per Fluidigm protocol specifications (PN 100-7168). Resultant mRNA was stabilized and reverse-transcribed using the SMARTer kit (Clontech), also per Fluidigm protocol specifications. Approximate run time was ~7.75 hours (6.5 hours for lysis, reverse transcription, and amplification; and 1.25 hours for harvest). 3µL amplicons were diluted with 10µL C1 DNA Dilution Reagent (Fluidigm) to generate 13 µL mix, and transferred to a new plate. Sample concentrations were normalized manually, then prepared for successive tagmentation, amplification, and pooling per the Illumina Nextera XT DNA Library Preparation protocol guidelines.



Runs: 1 run, 5.2M spots, 260.5M bases, <u>122.6Mb</u>

Run	# of Spots	# of Bases	Size	Published	
ERR3662870	5,209,918	260.5M	122.6Mb	2020-04-29	

#### データ取得方法

Illumina HiSeq 4000 sequencing; Single cell RNA-sequencing of lineage-negative fraction of stromal cells isolated from inguinal white adipose tissue in mouse (ERR3662870)



SRA archive data is normalized by the SRA load process and used by the <u>SRA</u>
<u>Toolkit</u> to read and produce formats like FASTQ, SAM, etc. The default toolkit configuration enables it to find and retrieve SRA runs by accession.

Public SRA files are now available from GCP and AWS cloud platforms as well as from NCBI. Access to most data in the cloud requires a user account with the cloud service provider. The user's account will incur costs for cloud compute or to copy data outside of the specified cloud service region.

Туре	Size	Location	Name	Free Egress	Access Type
run	125,544 Kb	NCBI	https://sra-download.ncbi.nlm.nih.gov/traces/era9/ERR/ERR3662/ERR3662870	worldwide	anonymous
		AWS	https://sra-pub-run-odp.s3.amazonaws.com/sra/ERR3662870/ERR3662870	worldwide	anonymous
		GCP	gs://sra-pub-run-6/ERR3662870/ERR3662870.1	gs.US	gcp identity

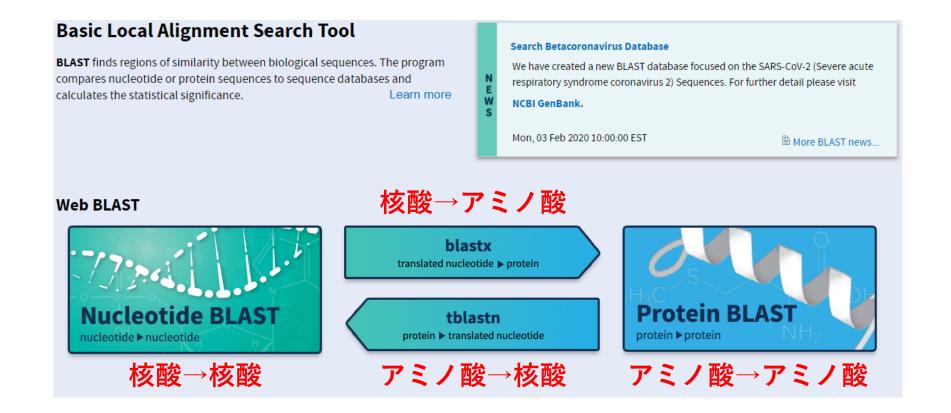


ここからダウンロード

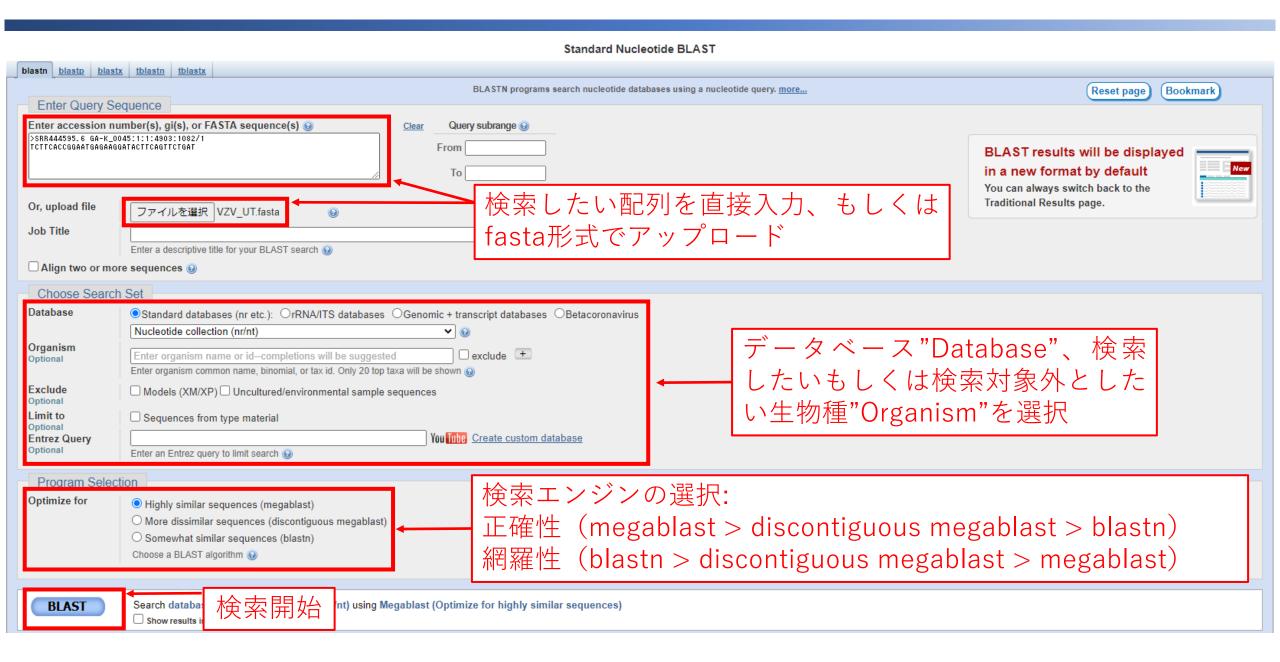
◆ SRA形式なので、fastqに変換して使用

# **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool)

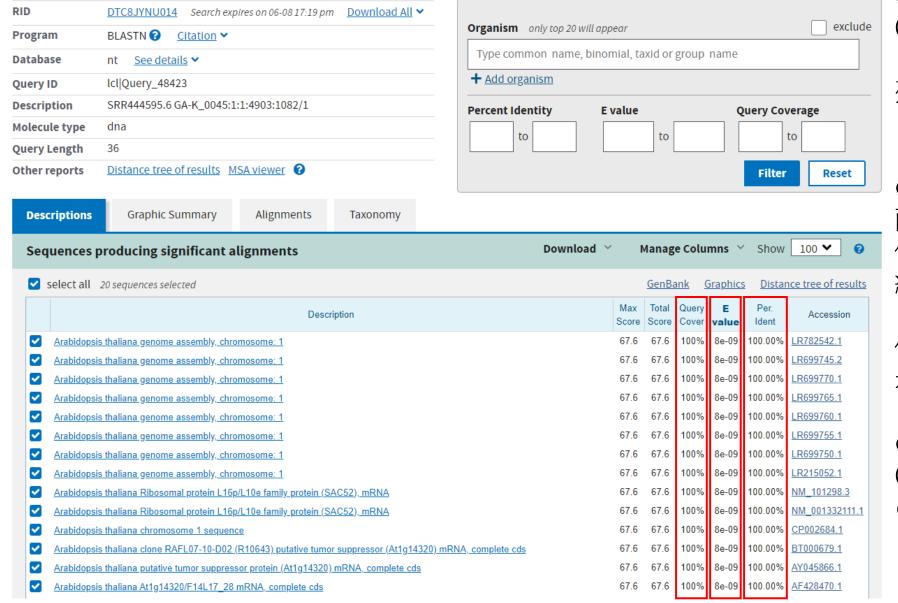
- ◆ BLASTは、入力配列(<u>query</u>)と相同性のある配列(<u>subject</u>)をデータベースから検索するツール(**Web版・ローカル版**がある)
  - ▶ 入力配列、もしくは検索対象となるデータベースの種類(核酸・アミノ酸)の組み合わせによりblastのプログラム名が異なる
    - 今回は"Nucleotide BLAST(核酸→核酸)"を使用する



#### BLAST(Web版blastn・解析例)



### BLAST(Web版blastn・解析例その2)



**Filter Results** 

Job Title

SRR444595.6 GA-K\_0045:1:1:4903:1082/1

#### Query Cover

Query配列の使用率。 この値が小さい場合、query配 列の一部分だけが類似してい ることを示す。

#### E value

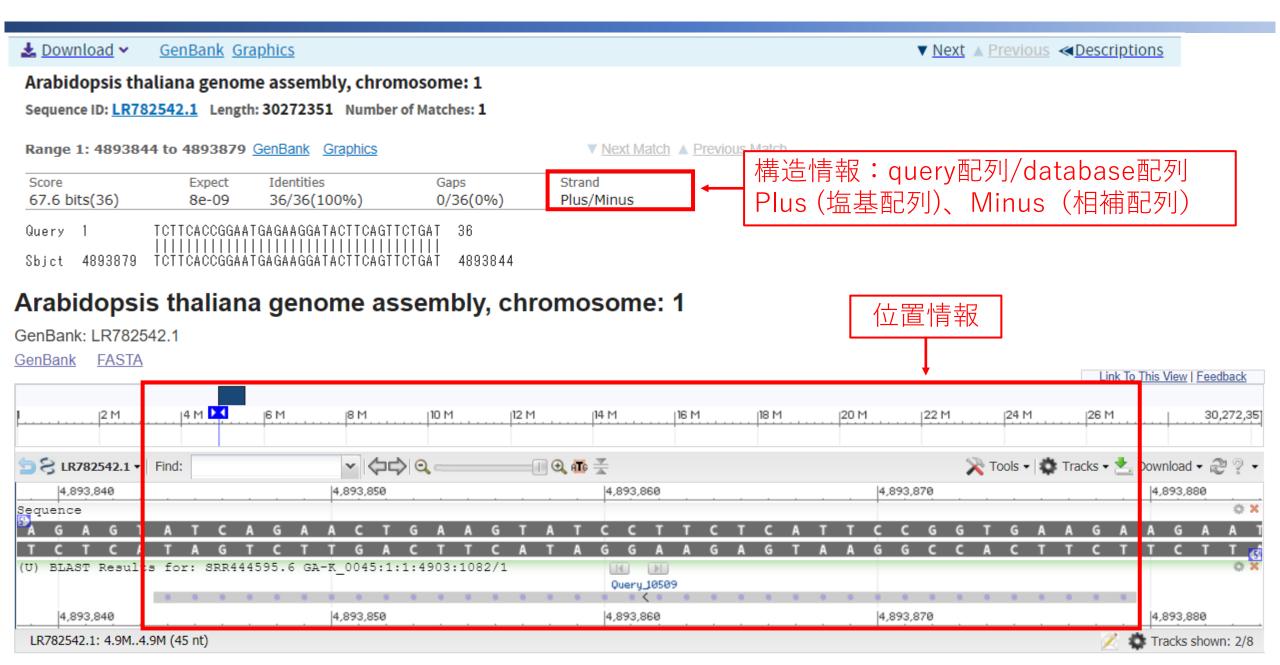
配列の一致が偶然現れる期待 値。

統計検定におけるp値と同じような意味で、値が小さいほど偶然では起こりえない一致を示す。

#### Per. Ident

**Query**配列とデータベース配列 の一致率。

# BLAST(Web版blastn・解析例その3)



補足資料

Table 1 ASCII Characters Encoding Q-scores 0-40

Symbol	ASCII	Q-	Symbol	ASCII	Q-	Symbol	ASCII	Q-
	Code	Score		Code	Score		Code	Score
!	33	0	/	47	14	=	61	28
"	34	1	0	48	15	>	62	29
#	35	2	1	49	16	?	63	30
\$	36	3	2	50	17	@	64	31
%	37	4	3	51	18	A	65	32
&	38	5	4	52	19	В	66	33
'	39	6	5	53	20	С	67	34
(	40	7	6	54	21	D	68	35
)	41	8	7	55	22	Е	69	36
*	42	9	8	56	23	F	70	37
+	43	10	9	57	24	G	71	38
,	44	11	:	58	25	Н	72	39
-	45	12	;	59	26	I	73	40
	46	13	<	60	27			

**ASCII(アスキー、英: American Standard Code for Information Interchange)**は、現代英語や西ヨーロッパ言語で使われるラテン文字を中心とした文字コード。これはコンピュータその他の通信機器において最もよく使われているものである(Wikipediaより)。