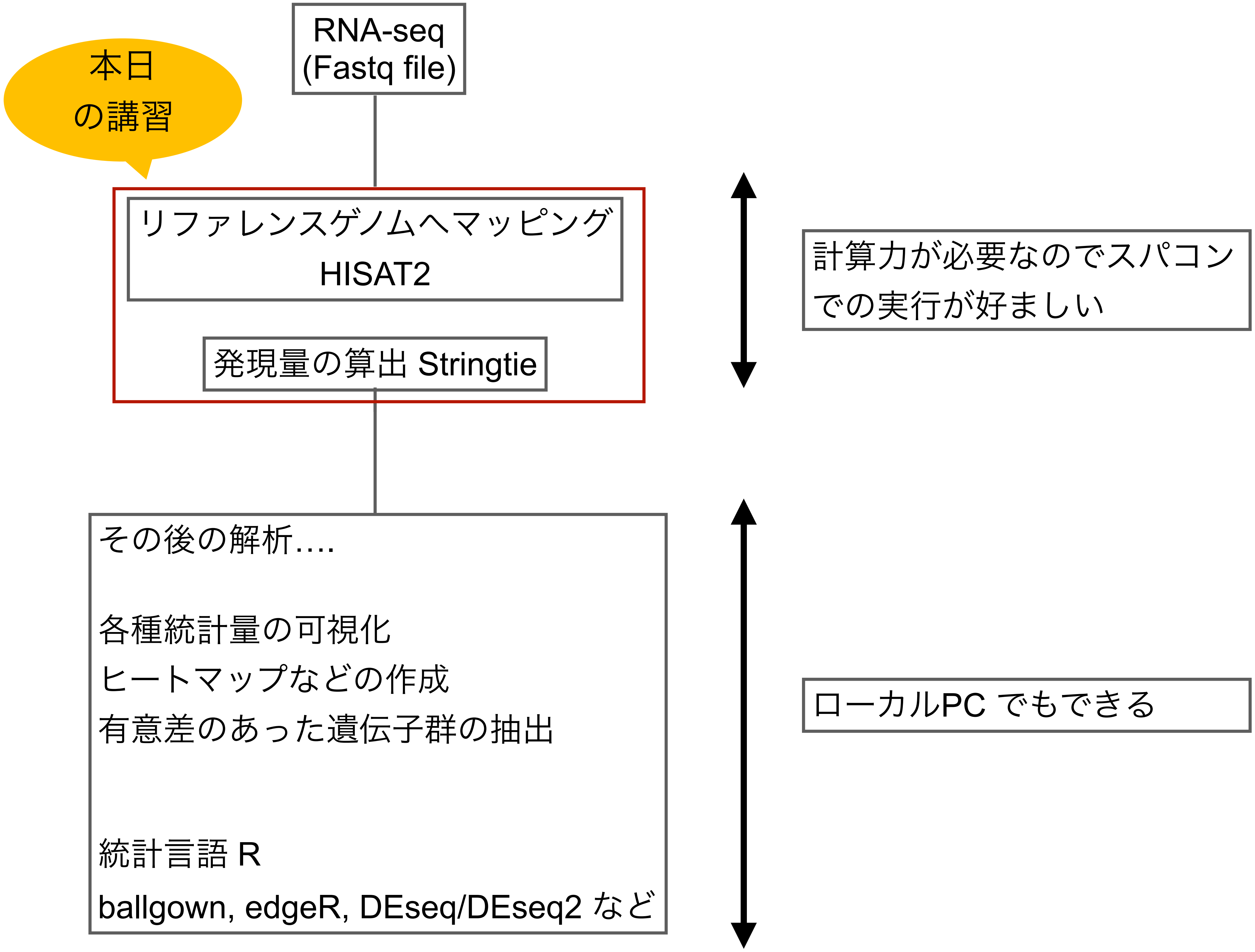
2023年度 PAGS・DDBJ合同 初級者情報解析講習会

2023/10/30

RNA-seq 解析

国立遺伝学研究所 望月孝子

本日の講習の流れ RNA-seq 発現量解析



本日
の講習

RNA-seq
(Fastq file)

リファレンスゲノムへマッピング
HISAT2

発現量の算出 Stringtie

計算力が必要なのでスパコン
での実行が好ましい

その後の解析....

各種統計量の可視化
ヒートマップなどの作成
有意差のあった遺伝子群の抽出

統計言語 R
ballgown, edgeR, DEseq/DEseq2 など

ローカルPC でもできる

配布データのコピー

ホームディレクトリ に移動

```
$ cd
```

ホームディレクトリ に20231030 というファイル/ディレクトリがないかを確認。

```
$ ls 20231030
ls: 20231030 にアクセスできません: そのようなファイルやディレクトリはありません
```

あれば、講習時間だけファイル/ディレクトリ 名前を一時的に変更してください。

```
$ mv 20231030 20231030_tmp
```

講習データをコピー

```
$ cp -r /usr/local/shared_data/lecture/20231030 .
```

本日の講習はこちらのディレクトリで

```
$ cd 20231030
```

配布データの確認 (1)

```
$ ls -al
合計 24
drwxr-xr-x  6 koshu3 koshu 4096 10月 16 15:30 .
drwxr-x--- 13 koshu3 koshu 4096 10月 13 14:50 ..
drwxr-xr-x  5 koshu3 koshu 4096 10月 16 15:28 outputs
drwxr-xr-x  2 koshu3 koshu 4096 10月 16 10:53 reads
drwxr-xr-x  2 koshu3 koshu 4096 10月 16 11:47 reference
drwxr-xr-x  2 koshu3 koshu 4096 10月 17  2022 scripts
```

事前に実行した
結果ファイル

講習用リード
ファイル

リファレンス
ファイル

実行スクリプト

```
それぞれのディレクトリ の中身は
$ ls outputs
$ ls outputs/hisat2_index
$ ls outputs/hisat2
$ ls outputs/stringtie
$ ls reads
$ ls reference
$ ls scripts
```

配布データの確認 (2)

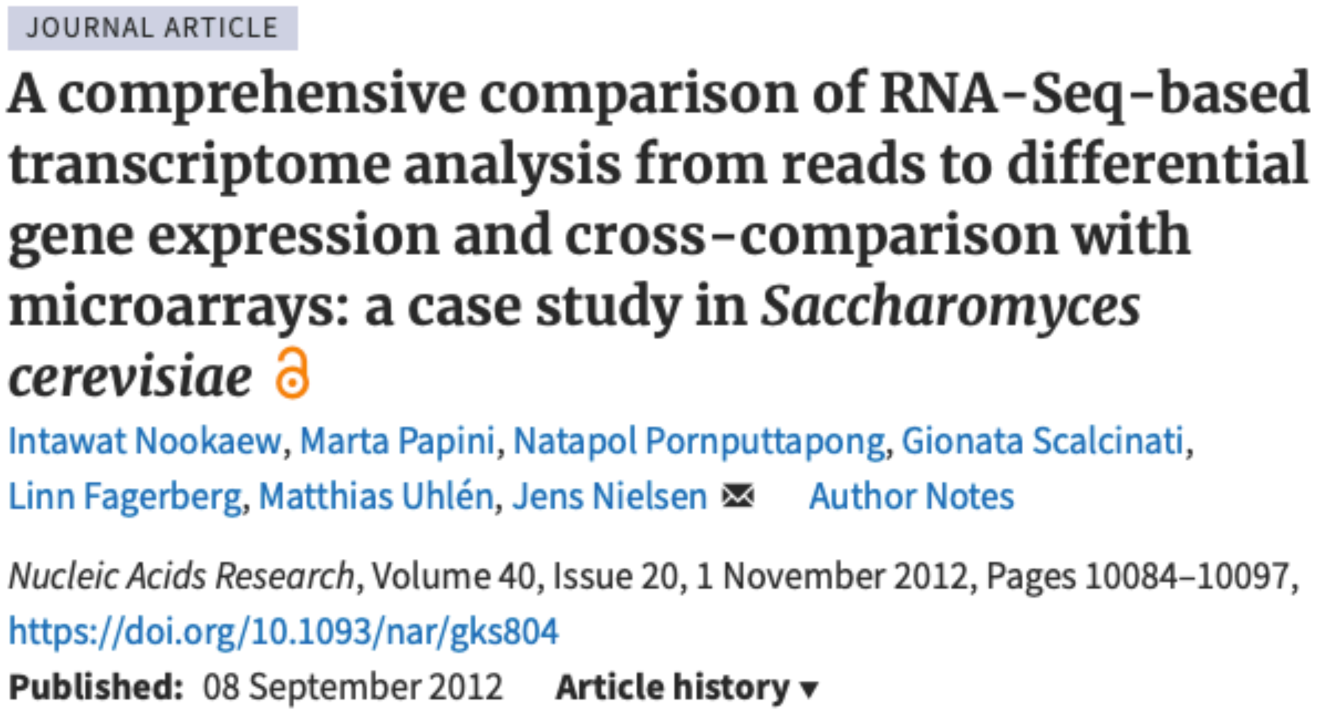
配布データの構成

```
20231030
  |_____ outputs  # 解析結果
              |___hisat2
              |___hisat2_index
              |___stringtie
  |----- reads       # リードファイル格納用
            |___SRR453566_1.fastq.gz
            |___SRR453566_2.fastq.gz
            |___SRR453569_1.fastq.gz
            |___SRR453569_2.fastq.gz
  |----- reference   # リファレンスファイル
            |___s288c.fa
            |___s288c.gff
  |----- scripts     # スクリプト
            |___hisat2.sh          # condaにて実装
            |___hisat2_index.sh  # condaにて実装
            |___stringtie.sh       # condaにて実装
            |___hisat2_singularity.sh        # singularityにて実装
            |___hisat2_index_singularity.sh  # singularityにて実装
            |___stringtie_singularity.sh       # singularityにて実装
```

Conda activate

```
$ conda activate pags_rnaseq
```

講習用 RNA-seq データ



JOURNAL ARTICLE

A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*

Intawat Nookaew, Marta Papini, Natapol Pornputtapong, Gionata Scalcinati, Linn Fagerberg, Matthias Uhlén, Jens Nielsen ✉ Author Notes

Nucleic Acids Research, Volume 40, Issue 20, 1 November 2012, Pages 10084–10097, https://doi.org/10.1093/nar/gks804

Published: 08 September 2012 **Article history ▾**

Saccharomyces cerevisiae CEN.PK113-7D

バッチ培養	ケモスタット培養
SRR453566	SRR453569
SRR453567	SRR453570
SRR453568	SRR453571

Biological replicates 3回ずつ

```
$ ls reads/
SRR453566_1.fastq.gz  SRR453566_2.fastq.gz  SRR453569_1.fastq.gz  SRR453569_2.fastq.gz
```

Paired-end データ

Paired-end データ

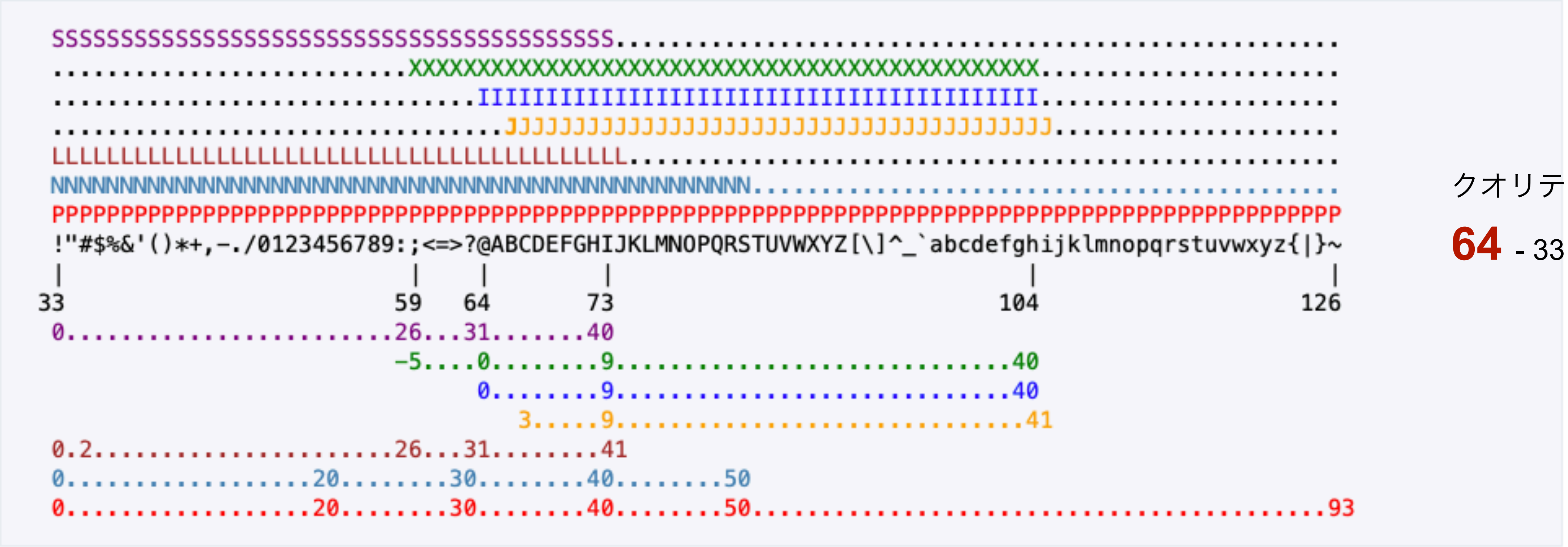
FASTQ フォーマット

4行で1配列の情報を表す。

```
$ zcat reads/SRR453566_1.fastq.gz | more
@SRR453566.1 HWI-ST167:4:1101:1597:1986/1
NAAAACTTTGGATGACTTCAACAACTATTCTTCTGAAATCAACAAAATATCACCAACTTCCGCCAACACAAAGTCTTACAGTGCAACAACAAGTGATGTTG
+
#4=DFFFFHHHHHJJJJJJJJJJJJJJJJIJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJIIJJJIJJJJJJJHHHEFFFFFFFEECEECCC@ABDACCC@CCCCD
```

1行目: @ の後ろにその配列のID
2行目: 配列
3行目: + を記載する。(配列のID を記載してもしなくてもよい)
4行目: その配列のクオリティ値

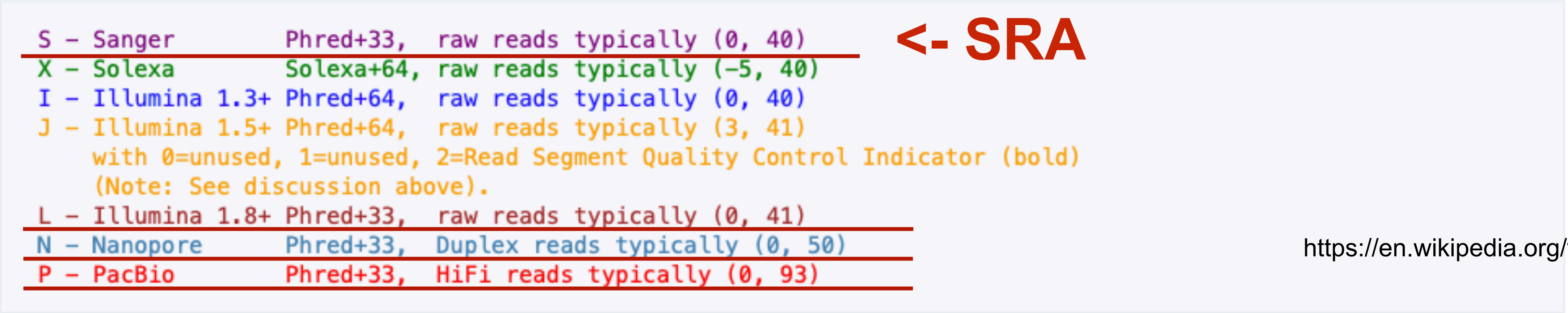
クオリティ値はアスキーコードで表示
アスキー値 - 33 が クオリティ値



```
 SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS.....................................................
 ..........................XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX......................
 ...............................IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII......................
 .................................JJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJ.....................
 LLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLL....................................................
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN...........................................
 PPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPP
 !"#$%&'()*+,-./0123456789:;<=>?@ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ[\]^_`abcdefghijklmnopqrstuvwxyz{|}~
 |                         |    |        |                              |                     |
33                        59   64       73                            104                   126
 0........................26...31.......40
                          -5....0........9.............................40
                                0........9.............................40
                                   3.....9..............................41
 0.2......................26...31........41
 0..................20........30........40........50
 0..................20........30........40........50..........................................93
```

クオリティ値 @ の場合

64 - 33 = **31**



```
S - Sanger        Phred+33,  raw reads typically (0, 40)
X - Solexa        Solexa+64, raw reads typically (-5, 40)
I - Illumina 1.3+ Phred+64,  raw reads typically (0, 40)
J - Illumina 1.5+ Phred+64,  raw reads typically (3, 41)
    with 0=unused, 1=unused, 2=Read Segment Quality Control Indicator (bold)
    (Note: See discussion above).
L - Illumina 1.8+ Phred+33,  raw reads typically (0, 41)
N - Nanopore      Phred+33,  Duplex reads typically (0, 50)
P - PacBio        Phred+33,  HiFi reads typically (0, 93)
```

<- SRA

https://en.wikipedia.org/wiki/FASTQ_format

講習用 リファレンスファイル　ゲノム配列 fasta

```
$ ls reference/
s288c.fa  s288c.gff
```

ゲノム配列

ファイルの中身を確認

```
$ more reference/s288c.fa
>NC_001133.9 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome I, complete sequence
CCACACCACACCCACACACCCACACACCACACCACACACCACACCACACCCACACACACACATCCTAACA
CTACCCTAACACAGCCCTAATCTAACCCTGGCCAACCTGTCTCTCAACTTACCCTCCATTACCCTGCCTC
CACTCGTTACCCTGTCCCATTCAACCATACCACTCCGAACCACCATCCATCCCTCTACTTACTACCACTC
ACCCACCGTTACCCTCCAATTACCCATATCCAACCCACTGCCACTTACCCTACCATTACCC
```

染色体16本分の配列

FASTA ヘッダの出力

```
$ grep ">" reference/s288c.fa
>NC_001133.9 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome I, complete sequence
>NC_001134.8 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome II, complete sequence
>NC_001135.5 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome III, complete sequence
>NC_001136.10 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome IV, complete sequence
>NC_001137.3 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome V, complete sequence
>NC_001138.5 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome VI, complete sequence
>NC_001139.9 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome VII, complete sequence
>NC_001140.6 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome VIII, complete sequence
>NC_001141.2 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome IX, complete sequence
>NC_001142.9 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome X, complete sequence
>NC_001143.9 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome XI, complete sequence
>NC_001144.5 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome XII, complete sequence
>NC_001145.3 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome XIII, complete sequence
>NC_001146.8 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome XIV, complete sequence
>NC_001147.6 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome XV, complete sequence
>NC_001148.4 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome XVI, complete sequence
```

講習用 リファレンスファイル　アノテーションファイル

```
$ ls reference/
s288c.fa  s288c.gff
```

アノテー
ションファイル

ファイルの中身を確認

```
$ more reference/s288c.gff
##gff-version 3
#!gff-spec-version 1.21
#!processor NCBI annotwriter
#!genome-build R64
#!genome-build-accession NCBI_Assembly:GCF_000146045.2
#!annotation-source SGD R64-3-1
##sequence-region NC_001133.9 1 230218
##species https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=559292
NC_001133.9  RefSeq  region  1  230218  .  +  .  ID=NC_001133.9:1..230218;Dbxref=taxon
NC_001133.9  RefSeq  telomere  1  801  .  -  .  ID=id-NC_001133.9:1..801;Dbxref=SGD:S0
NC_001133.9  RefSeq  origin_of_replication  707  776  .  +  .  ID=id-NC_001133.9:707..
NC_001133.9  RefSeq  gene  1807  2169  .  -  .  ID=gene-YAL068C;Dbxref=GeneID:851229;N
NC_001133.9  RefSeq  mRNA  1807  2169  .  -  .  ID=rna-NM_001180043.1;Parent=gene-YAL0
NC_001133.9  RefSeq  exon  1807  2169  .  -  .  ID=exon-NM_001180043.1-1;Parent=rna-NM
NC_001133.9  RefSeq  CDS  1807  2169  .  -  0  ID=cds-NP_009332.1;Parent=rna-NM_00118
```

GFF フォーマット

遺伝子アノテーションのフォーマット

```
##gff-version 3
#!gff-spec-version 1.21
#!processor NCBI annotwriter
#!genome-build R64
#!genome-build-accession NCBI_Assembly:GCF_000146045.2
#!annotation-source SGD R64-2-1
##sequence-region NC_001133.9 1 230218
##species https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=559292
NC_001133.9  RefSeq gene    1807  2169  .  -  .  ID=gene0;Dbxref=GeneID:851229;Name=PAU8;end_range=2169,.;gbkey=Gene;gene=PAU8;
NC_001133.9  RefSeq mRNA    1807  2169  .  -  .  ID=rna0;Parent=gene0;Dbxref=GeneID:851229,Genbank:NM_001180043.1;Name=NM_0011
NC_001133.9  RefSeq exon    1807  2169  .  -  .  ID=id3;Parent=rna0;Dbxref=GeneID:851229,Genbank:NM_001180043.1;end_range=2169,.;g
NC_001133.9  RefSeq CDS     1807  2169  .  -  0  ID=cds0;Parent=rna0;Dbxref=SGD:S000002142,GeneID:851229,Genbank:NP_009332.1;Nam
NC_001133.9  RefSeq gene    2480  2707  .  +  .  ID=gene1;Dbxref=GeneID:1466426;Name=YAL067W-A;end_range=2707,.;gbkey=Gene;gene
NC_001133.9  RefSeq mRNA    2480  2707  .  +  .  ID=rna1;Parent=gene1;Dbxref=GeneID:1466426,Genbank:NM_001184582.1;Name=NM_001
NC_001133.9  RefSeq exon    2480  2707  .  +  .  ID=id4;Parent=rna1;Dbxref=GeneID:1466426,Genbank:NM_001184582.1;end_range=2707,.;
NC_001133.9  RefSeq CDS     2480  2707  .  +  0  ID=cds1;Parent=rna1;Dbxref=SGD:S000028593,GeneID:1466426,Genbank:NP_878038.1;Na
NC_001133.9  RefSeq gene    7235  9016  .  -  .  ID=gene2;Dbxref=GeneID:851230;Name=SEO1;end_range=9016,.;gbkey=Gene;gene=SEO1;
NC_001133.9  RefSeq mRNA    7235  9016  .  -  .  ID=rna2;Parent=gene2;Dbxref=GeneID:851230,Genbank:NM_001178208.1;Name=NM_0011
NC_001133.9  RefSeq exon    7235  9016  .  -  .  ID=id5;Parent=rna2;Dbxref=GeneID:851230,Genbank:NM_001178208.1;end_range=9016,.;g
NC_001133.9  RefSeq CDS     7235  9016  .  -  0  ID=cds2;Parent=rna2;Dbxref=SGD:S000000062,GeneID:851230,Genbank:NP_009333.1;Nam
```

タブ区切りフォーマット。値がない場合は、”.” が設定される。

1. seqname：染色体 or スキャフォールドの名前
2. source：アノテーションを生成したプログラムまたはデータソースの名前
3. feature：フィーチャータイプ（mRNA, gene, exon, CDS ….）
4. start：スタートポジション (1bp 〜)
5. end：エンドポジション (1bp 〜)
6. score：スコア
7. strand：+(forward)、-(reverse)または '.'
8. frame：翻訳フレーム（0, 1, 2）
9. attribute：追加情報。セミコロンで区切られたタグと値のペアのリスト。

リファレンスゲノムへリードをマッピング

ステップ

1. リファレンスゲノムのインデックスを作成

   hisat2_index.sh

2. リードをリファレンスゲノムへマッピング

   hisat2.sh　　2サンプル分をアレイジョブで同時実行

スクリプト

```
$ ls scripts/hisat2*
scripts/hisat2.sh  scripts/hisat2_index.sh
scripts/hisat2_index_singularity.sh  scripts/hisat2_singularity.sh
```

マッピング用インデックスの作成　　　スクリプトの確認

```
$ more scripts/hisat2_index.sh
#$ -S /bin/bash
#$ -pe def_slot 2
#$ -cwd
#$ -l mem_req=10G,s_vmem=10G


conda activate pags_rnaseq

GENOME=./reference/s288c.fa
INDEX=./reference/s288c.fa

hisat2-build $GENOME $INDEX
```

conda 仮想環境
の指定

リファレンスゲノムの
インデックス化

qsub コマンドのオプション

-S 使用するインタプリタのパス

-pe def_slot 1 ジョブスロット数

-cwd　ホームディレクトリではなく、qsubコマンド実行時のディレクトリでジョブ を実行。
　　標準出力 / 標準エラー出力ファイルは、qsubコマンド実行時のディレクトリに出力。

-l 主にキューの選択、メモリ利用上限の変更に使う

　mem_req: 使用するメモリの量を宣言する。(ジョブ管理システムUGEのジョブリソース管理に対する宣言)

　s_vmem: ジョブが使用可能な仮想メモリの上限値。 (OS に対する宣言)

キューの指定: Thin ノードへの投入は、キューの指定は不要。

マッピング用インデックスの作成　　　オプションの確認

```
$ hisat2-build -h
HISAT2 version 2.2.1 by Daehwan Kim (infphilo@gmail.com, http://www.ccb.jhu.edu/people/infphilo)
Usage: hisat2-build [options]* <reference_in> <ht2_index_base>
    reference_in            comma-separated list of files with ref sequences
    hisat2_index_base       write ht2 data to files with this dir/basename
Options:
    -c                      reference sequences given on cmd line (as
                            <reference_in>)
    --large-index           force generated index to be 'large', even if ref
                            has fewer than 4 billion nucleotides
    -a/--noauto             disable automatic -p/--bmax/--dcv memory-fitting
    -p <int>                number of threads
    --bmax <int>            max bucket sz for blockwise suffix-array builder
    --bmaxdivn <int>        max bucket sz as divisor of ref len (default: 4)
    --dcv <int>             diff-cover period for blockwise (default: 1024)
    --nodc                  disable diff-cover (algorithm becomes quadratic)
    -r/--noref              don't build .3/.4.ht2 (packed reference) portion
    -3/--justref            just build .3/.4.ht2 (packed reference) portion
    -o/--offrate <int>      SA is sampled every 2^offRate BWT chars (default: 5)
    -t/--ftabchars <int>    # of chars consumed in initial lookup (default: 10)
    --localoffrate <int>    SA (local) is sampled every 2^offRate BWT chars (default: 3)
    --localftabchars <int>  # of chars consumed in initial lookup in a local index (default: 6)
    --snp <path>            SNP file name
    --haplotype <path>      haplotype file name
    --ss <path>             Splice site file name
    --exon <path>           Exon file name
    --repeat-ref <path>     Repeat reference file name
    --repeat-info <path>    Repeat information file name
    --repeat-snp <path>     Repeat snp file name
    --repeat-haplotype <path>   Repeat haplotype file name
    --seed <int>            seed for random number generator
    -q/--quiet              disable verbose output (for debugging)
    -h/--help               print detailed description of tool and its options
    --usage                 print this usage message
    --version               print version information and quit
```

マッピング用インデックスの作成　　　　　　　実行

実行

講習中はqsub を実行しないでください。

```
$ qsub scripts/hisat2_index.sh
Your job 24706258 ("hisat2_index.sh") has been submitted
```

ステータスの確認

```
$ qstat
job-ID     prior   name       user   state submit/start at     queue         jclass slots ja-task-ID
------------------------------------------------------------------------------------------------------
  24704406 0.25025 QLOGIN     koshu3 r     10/16/2023 10:42:12 login.q@at138             1
  24706258 0.00000 hisat2_ind koshu3 qw    10/16/2023 11:47:09                           2
```

実行
待機

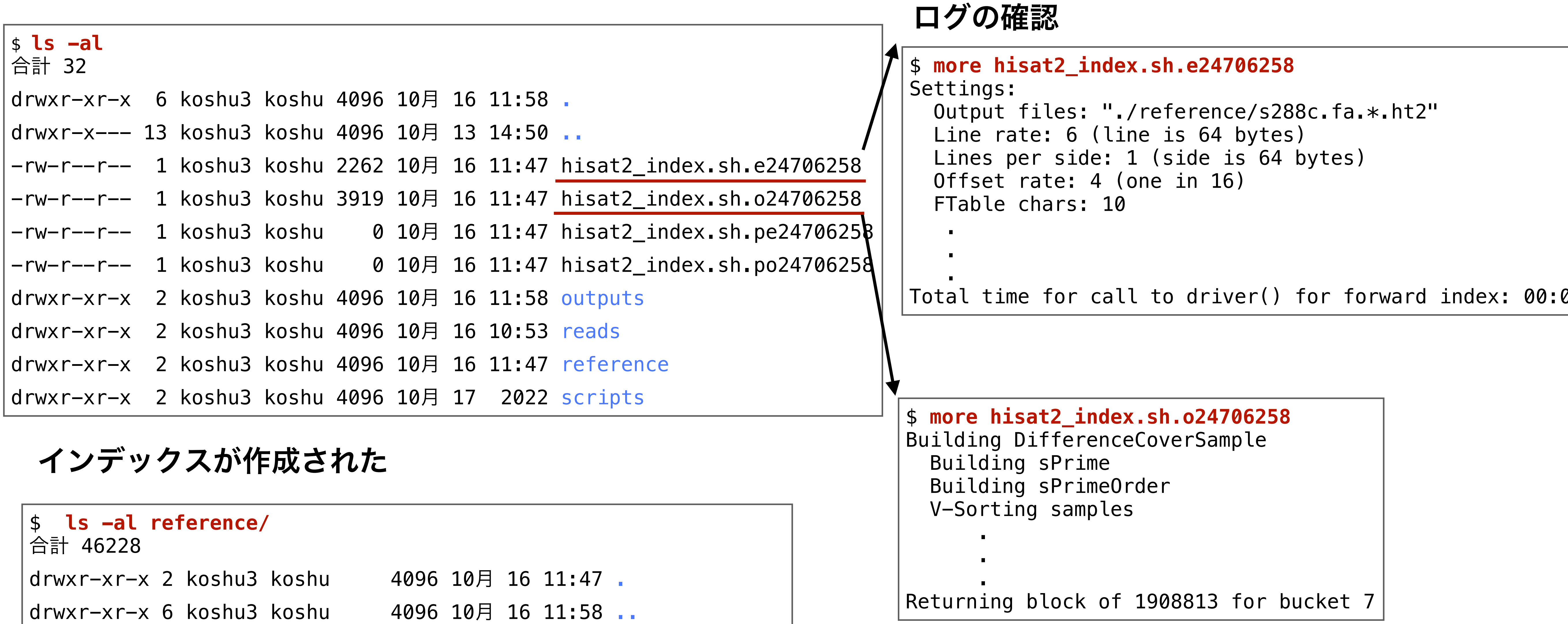
```
$ qstat
job-ID     prior   name       user   state submit/start at     queue         jclass slots ja-task-ID
------------------------------------------------------------------------------------------------------
  24704406 0.25025 QLOGIN     koshu3 r     10/16/2023 10:42:12 login.q@at138             1
  24706258 0.25023 hisat2_ind koshu3 r     10/16/2023 11:47:12 epyc.q@at147              2
```

実行
中

```
$ qstat
job-ID     prior   name       user   state submit/start at     queue         jclass slots ja-task-ID
----------------------------------------------------------------------------------------------------
  24704406 0.25026 QLOGIN     koshu3 r     10/16/2023 10:42:12 login.q@at138             1
```

ジョブが終了すると該当ジョブID が表示されなくなる。

マッピング用インデックスの作成　　　実行結果の確認



```
$ ls -al
合計 32
drwxr-xr-x  6 koshu3 koshu 4096 10月 16 11:58 .
drwxr-x--- 13 koshu3 koshu 4096 10月 13 14:50 ..
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu 2262 10月 16 11:47 hisat2_index.sh.e24706258
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu 3919 10月 16 11:47 hisat2_index.sh.o24706258
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu    0 10月 16 11:47 hisat2_index.sh.pe24706258
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu    0 10月 16 11:47 hisat2_index.sh.po24706258
drwxr-xr-x  2 koshu3 koshu 4096 10月 16 11:58 outputs
drwxr-xr-x  2 koshu3 koshu 4096 10月 16 10:53 reads
drwxr-xr-x  2 koshu3 koshu 4096 10月 16 11:47 reference
drwxr-xr-x  2 koshu3 koshu 4096 10月 17  2022 scripts
```

ログの確認

```
$ more hisat2_index.sh.e24706258
Settings:
  Output files: "./reference/s288c.fa.*.ht2"
  Line rate: 6 (line is 64 bytes)
  Lines per side: 1 (side is 64 bytes)
  Offset rate: 4 (one in 16)
  FTable chars: 10
   .
   .
   .
Total time for call to driver() for forward index: 00:0
```

```
$ more hisat2_index.sh.o24706258
Building DifferenceCoverSample
  Building sPrime
  Building sPrimeOrder
  V-Sorting samples
      .
      .
      .
Returning block of 1908813 for bucket 7
```

インデックスが作成された

```
$  ls -al reference/
合計 46228
drwxr-xr-x 2 koshu3 koshu     4096 10月 16 11:47 .
drwxr-xr-x 6 koshu3 koshu     4096 10月 16 11:58 ..
-rw-r--r-- 1 koshu3 koshu 12245035 10月 17  2022 s288c.fa
-rw-r--r-- 1 koshu3 koshu  8219756 10月 16 11:47 s288c.fa.1.ht2
-rw-r--r-- 1 koshu3 koshu  3017836 10月 16 11:47 s288c.fa.2.ht2
-rw-r--r-- 1 koshu3 koshu      152 10月 16 11:47 s288c.fa.3.ht2
-rw-r--r-- 1 koshu3 koshu  3017832 10月 16 11:47 s288c.fa.4.ht2
-rw-r--r-- 1 koshu3 koshu  5357645 10月 16 11:47 s288c.fa.5.ht2
-rw-r--r-- 1 koshu3 koshu  3071004 10月 16 11:47 s288c.fa.6.ht2
-rw-r--r-- 1 koshu3 koshu       12 10月 16 11:47 s288c.fa.7.ht2
-rw-r--r-- 1 koshu3 koshu        8 10月 16 11:47 s288c.fa.8.ht2
-rw-r--r-- 1 koshu3 koshu 12377219 10月 17  2022 s288c.gff
```

事前実行した結果で確認

```
$ ls outputs/hisat2_index/
$ more outputs/hisat2_index/hisat2_index.sh.e24706258
$ more outputs/hisat2_index/hisat2_index.sh.o24706258
```

マッピング　　スクリプトの確認

```
$ more scripts/hisat2.sh
#$ -S /bin/bash
#$ -pe def_slot 4
#$ -cwd
#$ -t 1-2:1
#$ -l mem_req=8G,s_vmem=8G

conda activate pags_rnaseq

# Batch culture: SRR453566
# chemostat: SRR453569
ACESSIONS=(453566 453569)
no=`expr ${SGE_TASK_ID} - 1`

NUM=${ACESSIONS[${no}]}
PREFIX=SRR${NUM}

# read file
DIR=./reads/
QUERY1_1=${DIR}${PREFIX}"_1.fastq.gz"
QUERY1_2=${DIR}${PREFIX}"_2.fastq.gz"


hisat2 -p ${NSLOTS} -x reference/s288c.fa --dta \
       -1 ${QUERY1_1} -2 ${QUERY1_2} \
       -S ${PREFIX}.sam

# convert sam to bam
# sort by position
samtools sort -@ ${NSLOTS} ${PREFIX}.sam -o ${PREFIX}.sorted.bam
```

アレイジョブを
指定

アレイジョブ
のタスクID

—dta: reports alignments tailored
for transcript assemblers

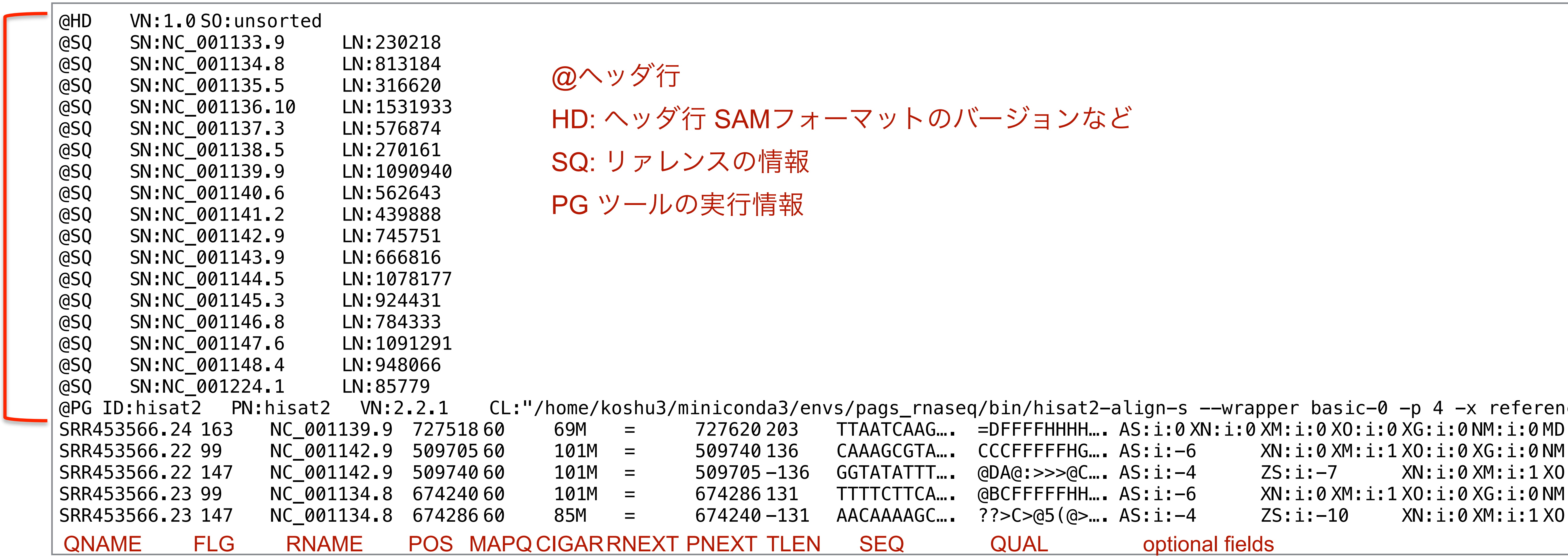
HISAT2 オプションの確認

```
$ hisat2 --help
HISAT2 version 2.2.1 by Daehwan Kim (infphilo@gmail.com, www.ccb.jhu.edu/people/infphilo)
Usage:
  hisat2 [options]* -x <ht2-idx> {-1 <m1> -2 <m2> | -U <r>} [-S <sam>]

  <ht2-idx>  Index filename prefix (minus trailing .X.ht2).
  <m1>       Files with #1 mates, paired with files in <m2>.
             Could be gzip'ed (extension: .gz) or bzip2'ed (extension: .bz2).
  <m2>       Files with #2 mates, paired with files in <m1>.
             Could be gzip'ed (extension: .gz) or bzip2'ed (extension: .bz2).
  <r>        Files with unpaired reads.
             Could be gzip'ed (extension: .gz) or bzip2'ed (extension: .bz2).
  <sam>      File for SAM output (default: stdout)

  <m1>, <m2>, <r> can be comma-separated lists (no whitespace) and can be
  specified many times.  E.g. '-U file1.fq,file2.fq -U file3.fq'.

Options (defaults in parentheses):

 Input:
  -q                 query input files are FASTQ .fq/.fastq (default)
  --qseq             query input files are in Illumina's qseq format
  -f                 query input files are (multi-)FASTA .fa/.mfa
  -r                 query input files are raw one-sequence-per-line
  -c                 <m1>, <m2>, <r> are sequences themselves, not files
  -s/--skip <int>    skip the first <int> reads/pairs in the input (none)
  -u/--upto <int>    stop after first <int> reads/pairs (no limit)
  -5/--trim5 <int>   trim <int> bases from 5'/left end of reads (0)
  -3/--trim3 <int>   trim <int> bases from 3'/right end of reads (0)
  --phred33          qualities are Phred+33 (default)
  --phred64          qualities are Phred+64
  --int-quals        qualities encoded as space-delimited integers

 Presets:                 Same as:
   --fast                 --no-repeat-index
   --sensitive            --bowtie2-dp 1 -k 30 --score-min L,0,-0.5
   --very-sensitive       --bowtie2-dp 2 -k 50 --score-min L,0,-1

 Alignment:
  --bowtie2-dp <int> use Bowtie2's dynamic programming alignment algorithm (0) - 0: no dynamic programming, 1: conditional
dynamic programming, and 2: unconditional dynamic programming (slowest)
  --n-ceil <func>    func for max # non-A/C/G/Ts permitted in aln (L,0,0.15)
  --ignore-quals     treat all quality values as 30 on Phred scale (off)
  --nofw             do not align forward (original) version of read (off)
  --norc             do not align reverse-complement version of read (off)
  --no-repeat-index  do not use repeat index
```

samtools sort オプションの確認

```
$ samtools sort --help
sort: unrecognized option '--help'
Usage: samtools sort [options...] [in.bam]
Options:
  -l INT     Set compression level, from 0 (uncompressed) to 9 (best)
  -u         Output uncompressed data (equivalent to -l 0)
  -m INT     Set maximum memory per thread; suffix K/M/G recognized [768M]
  -M         Use minimiser for clustering unaligned/unplaced reads
  -K INT     Kmer size to use for minimiser [20]
  -n         Sort by read name (not compatible with samtools index command)
  -t TAG     Sort by value of TAG. Uses position as secondary index (or read name if -n is set)
  -o FILE    Write final output to FILE rather than standard output
  -T PREFIX  Write temporary files to PREFIX.nnnn.bam
      --no-PG
               Do not add a PG line
      --template-coordinate
               Sort by template-coordinate
      --input-fmt-option OPT[=VAL]
               Specify a single input file format option in the form
               of OPTION or OPTION=VALUE
  -O, --output-fmt FORMAT[,OPT[=VAL]]...
               Specify output format (SAM, BAM, CRAM)
      --output-fmt-option OPT[=VAL]
               Specify a single output file format option in the form
               of OPTION or OPTION=VALUE
      --reference FILE
               Reference sequence FASTA FILE [null]
  -@, --threads INT
               Number of additional threads to use [0]
      --write-index
               Automatically index the output files [off]
      --verbosity INT
               Set level of verbosity
```

SAM フォーマット/ BAM フォーマット



```
@HD    VN:1.0 SO:unsorted
@SQ    SN:NC_001133.9     LN:230218
@SQ    SN:NC_001134.8     LN:813184
@SQ    SN:NC_001135.5     LN:316620
@SQ    SN:NC_001136.10    LN:1531933
@SQ    SN:NC_001137.3     LN:576874
@SQ    SN:NC_001138.5     LN:270161
@SQ    SN:NC_001139.9     LN:1090940
@SQ    SN:NC_001140.6     LN:562643
@SQ    SN:NC_001141.2     LN:439888
@SQ    SN:NC_001142.9     LN:745751
@SQ    SN:NC_001143.9     LN:666816
@SQ    SN:NC_001144.5     LN:1078177
@SQ    SN:NC_001145.3     LN:924431
@SQ    SN:NC_001146.8     LN:784333
@SQ    SN:NC_001147.6     LN:1091291
@SQ    SN:NC_001148.4     LN:948066
@SQ    SN:NC_001224.1     LN:85779
@PG ID:hisat2   PN:hisat2   VN:2.2.1    CL:"/home/koshu3/miniconda3/envs/pags_rnaseq/bin/hisat2-align-s --wrapper basic-0 -p 4 -x referen
SRR453566.24 163    NC_001139.9  727518 60    69M    =     727620 203    TTAATCAAG….  =DFFFFHHHH…. AS:i:0 XN:i:0 XM:i:0 XO:i:0 XG:i:0 NM:i:0 MD
SRR453566.22 99     NC_001142.9  509705 60    101M   =     509740 136    CAAAGCGTA….  CCCFFFFFHG…. AS:i:-6       XN:i:0 XM:i:1 XO:i:0 XG:i:0 NM
SRR453566.22 147    NC_001142.9  509740 60    101M   =     509705 -136   GGTATATTT….  @DA@:>>>@C…. AS:i:-4       ZS:i:-7       XN:i:0 XM:i:1 XO
SRR453566.23 99     NC_001134.8  674240 60    101M   =     674286 131    TTTTCTTCA….  @BCFFFFFHH…. AS:i:-6       XN:i:0 XM:i:1 XO:i:0 XG:i:0 NM
SRR453566.23 147    NC_001134.8  674286 60    85M    =     674240 -131   AACAAAAGC….  ??>C>@5(@>…. AS:i:-4       ZS:i:-10      XN:i:0 XM:i:1 XO
```

QNAME FLG RNAME POS MAPQ CIGAR RNEXT PNEXT TLEN SEQ QUAL optional fields

@ヘッダ行

HD: ヘッダ行 SAMフォーマットのバージョンなど

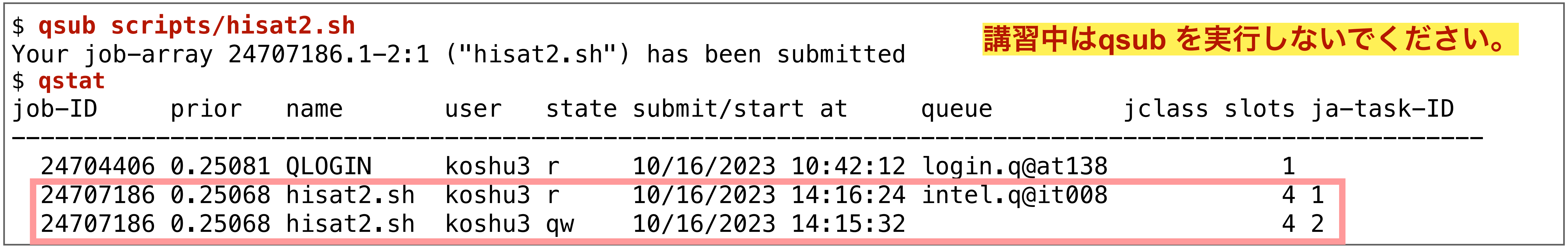
SQ: リァレンスの情報

PG ツールの実行情報

QNAME	リード名
FLG	アラインメント情報。参考 https://broadinstitute.github.io/picard/explain-flags.html
RNAME	マップされたリファレンス名
POS	マップポジション
MAPQ	マッピングスコア
CIGAR	マッピングの状況 ex) M アライメントマッチ I リファレンスにインサーションあり など
RNEXT	ペアエンドの場合、ペアのリード名（=: QNAME）。
PNEXT	ペアエンドの場合、ペアのマップされた開始位置。
TLEN	ペアエンドのリード間の距離。
SEQ	FASTQ の塩基配列データ
QUAL	FASTQ のクオリティデータ。

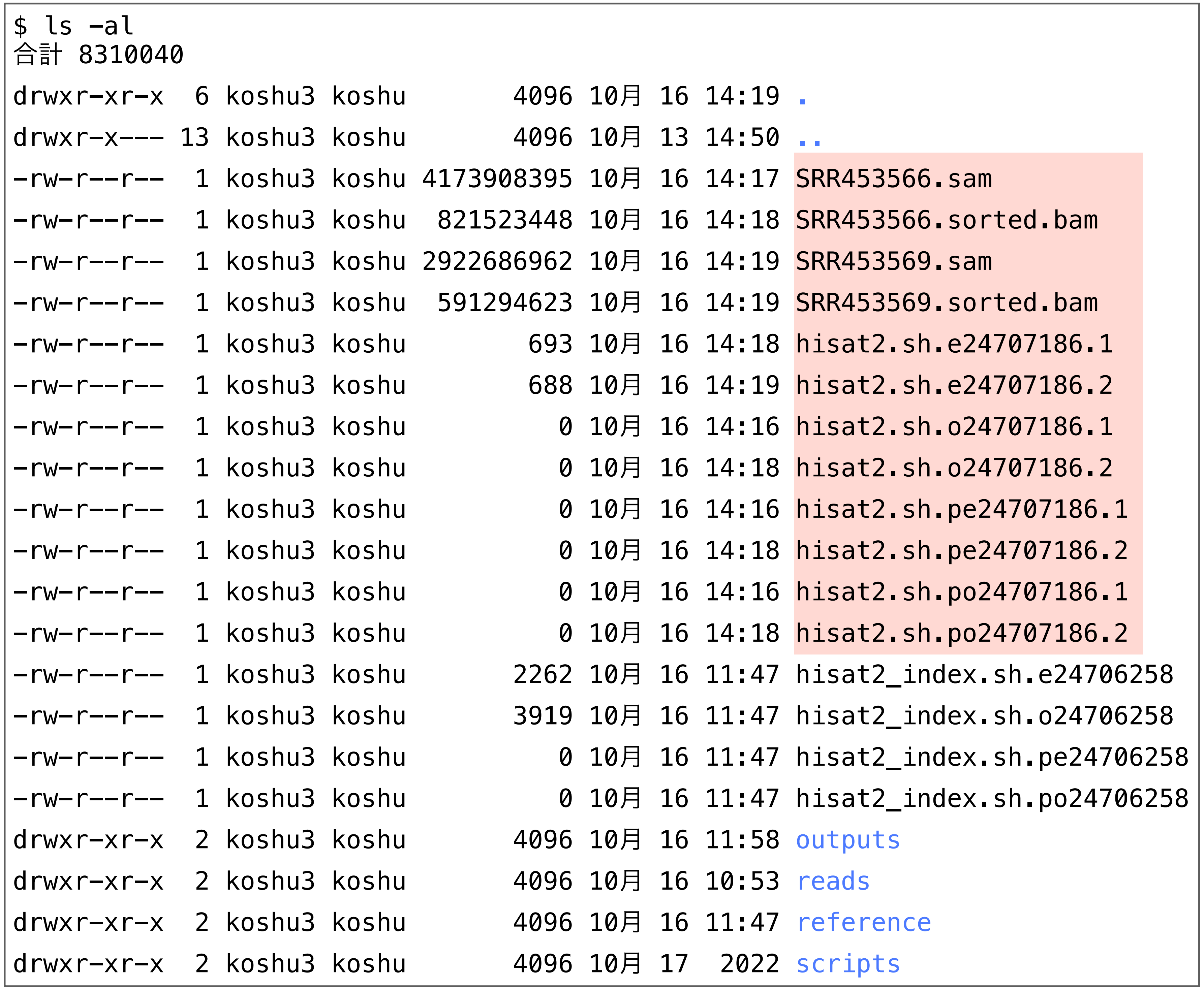
BAM は SAM をバイナリ形式にしたファイル

マッピング　　　　　　　　　　実行



```
$ qsub scripts/hisat2.sh
Your job-array 24707186.1-2:1 ("hisat2.sh") has been submitted
$ qstat
job-ID     prior   name       user   state submit/start at     queue         jclass slots ja-task-ID
-----------------------------------------------------------------------------------------------------
  24704406 0.25081 QLOGIN     koshu3 r     10/16/2023 10:42:12 login.q@at138              1
  24707186 0.25068 hisat2.sh  koshu3 r     10/16/2023 14:16:24 intel.q@it008              4 1
  24707186 0.25068 hisat2.sh  koshu3 qw    10/16/2023 14:15:32                            4 2
```

講習中はqsub を実行しないでください。



```
$ ls -al
合計 8310040
drwxr-xr-x  6 koshu3 koshu       4096 10月 16 14:19 .
drwxr-x--- 13 koshu3 koshu       4096 10月 13 14:50 ..
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu 4173908395 10月 16 14:17 SRR453566.sam
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu  821523448 10月 16 14:18 SRR453566.sorted.bam
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu 2922686962 10月 16 14:19 SRR453569.sam
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu  591294623 10月 16 14:19 SRR453569.sorted.bam
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu        693 10月 16 14:18 hisat2.sh.e24707186.1
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu        688 10月 16 14:19 hisat2.sh.e24707186.2
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:16 hisat2.sh.o24707186.1
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:18 hisat2.sh.o24707186.2
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:16 hisat2.sh.pe24707186.1
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:18 hisat2.sh.pe24707186.2
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:16 hisat2.sh.po24707186.1
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:18 hisat2.sh.po24707186.2
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu       2262 10月 16 11:47 hisat2_index.sh.e24706258
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu       3919 10月 16 11:47 hisat2_index.sh.o24706258
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 11:47 hisat2_index.sh.pe24706258
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 11:47 hisat2_index.sh.po24706258
drwxr-xr-x  2 koshu3 koshu       4096 10月 16 11:58 outputs
drwxr-xr-x  2 koshu3 koshu       4096 10月 16 10:53 reads
drwxr-xr-x  2 koshu3 koshu       4096 10月 16 11:47 reference
drwxr-xr-x  2 koshu3 koshu       4096 10月 17  2022 scripts
```

事前実行した結果で確認

$ ls -al outputs/hisat2/

マッピング　実行結果　　ログの確認

```
$ more hisat2.sh.e24707186.1
5725730 reads; of these:
  5725730 (100.00%) were paired; of these:
    1222756 (21.36%) aligned concordantly 0 times
    4258780 (74.38%) aligned concordantly exactly 1 time
    244194 (4.26%) aligned concordantly >1 times
    ----
    1222756 pairs aligned concordantly 0 times; of these:
      128491 (10.51%) aligned discordantly 1 time
    ----
    1094265 pairs aligned 0 times concordantly or discordantly; of these:
      2188530 mates make up the pairs; of these:
        1470694 (67.20%) aligned 0 times
        662896 (30.29%) aligned exactly 1 time
        54940 (2.51%) aligned >1 times
87.16% overall alignment rate
[bam_sort_core] merging from 1 files and 4 in-memory blocks...
```

事前実行した結果で確認

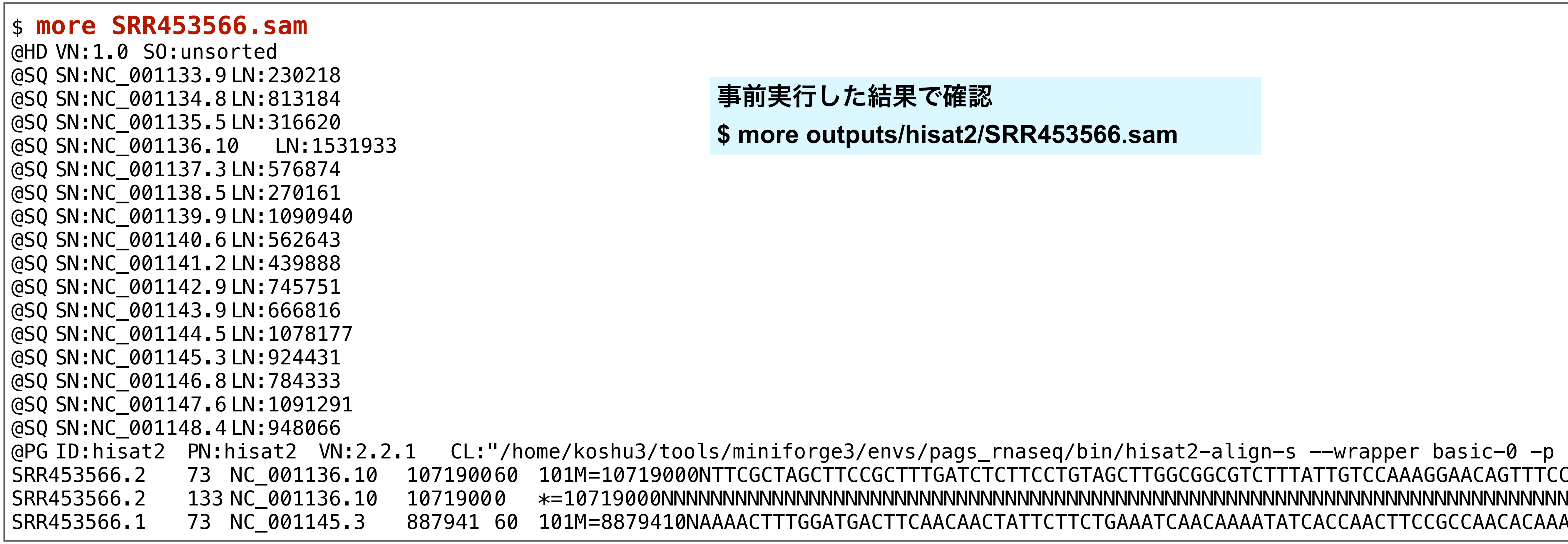
$ more outputs/hisat2/hisat2.sh.e16626062.1

```
$ more hisat2.sh.e24707186.2
4032514 reads; of these:
  4032514 (100.00%) were paired; of these:
    975045 (24.18%) aligned concordantly 0 times
    2882289 (71.48%) aligned concordantly exactly 1 time
    175180 (4.34%) aligned concordantly >1 times
    ----
    975045 pairs aligned concordantly 0 times; of these:
      89479 (9.18%) aligned discordantly 1 time
    ----
    885566 pairs aligned 0 times concordantly or discordantly; of these:
      1771132 mates make up the pairs; of these:
        1274482 (71.96%) aligned 0 times
        459285 (25.93%) aligned exactly 1 time
        37365 (2.11%) aligned >1 times
84.20% overall alignment rate
[bam_sort_core] merging from 0 files and 4 in-memory blocks...
```

事前実行した結果で確認

$ more outputs/hisat2/hisat2.sh.e16626062.2

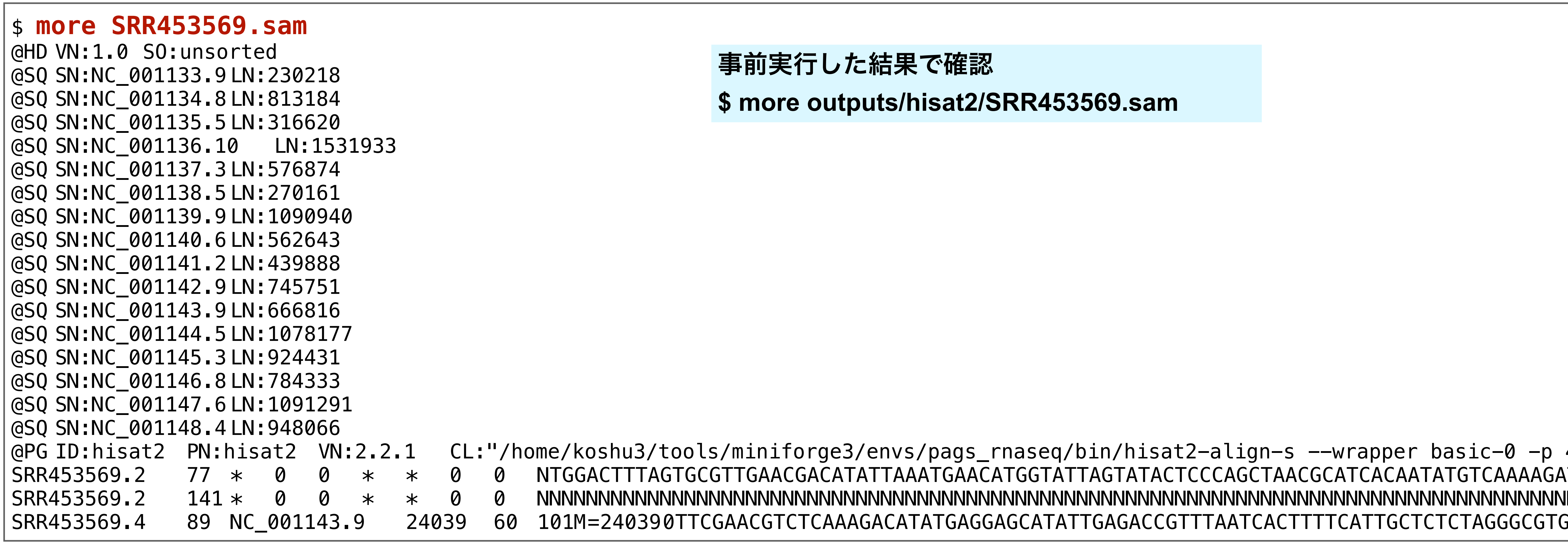
マッピング　実行結果　アライメントファイル (sam)の確認



```
$ more SRR453566.sam
@HD VN:1.0  SO:unsorted
@SQ SN:NC_001133.9 LN:230218
@SQ SN:NC_001134.8 LN:813184
@SQ SN:NC_001135.5 LN:316620
@SQ SN:NC_001136.10    LN:1531933
@SQ SN:NC_001137.3 LN:576874
@SQ SN:NC_001138.5 LN:270161
@SQ SN:NC_001139.9 LN:1090940
@SQ SN:NC_001140.6 LN:562643
@SQ SN:NC_001141.2 LN:439888
@SQ SN:NC_001142.9 LN:745751
@SQ SN:NC_001143.9 LN:666816
@SQ SN:NC_001144.5 LN:1078177
@SQ SN:NC_001145.3 LN:924431
@SQ SN:NC_001146.8 LN:784333
@SQ SN:NC_001147.6 LN:1091291
@SQ SN:NC_001148.4 LN:948066
@PG ID:hisat2  PN:hisat2  VN:2.2.1   CL:"/home/koshu3/tools/miniforge3/envs/pags_rnaseq/bin/hisat2-align-s --wrapper basic-0 -p
SRR453566.2    73  NC_001136.10   107190060  101M=10719000NTTCGCTAGCTTCCGCTTTGATCTCTTCCTGTAGCTTGGCGGCGTCTTTATTGTCCAAAGGAACAGTTTCC
SRR453566.2    133 NC_001136.10   10719000   *=10719000NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
SRR453566.1    73  NC_001145.3    887941 60  101M=8879410NAAAACTTTGGATGACTTCAACAACTATTCTTCTGAAATCAACAAAATATCACCAACTTCCGCCAACACAAA
```

事前実行した結果で確認

$ more outputs/hisat2/SRR453566.sam



```
$ more SRR453569.sam
@HD VN:1.0  SO:unsorted
@SQ SN:NC_001133.9 LN:230218
@SQ SN:NC_001134.8 LN:813184
@SQ SN:NC_001135.5 LN:316620
@SQ SN:NC_001136.10    LN:1531933
@SQ SN:NC_001137.3 LN:576874
@SQ SN:NC_001138.5 LN:270161
@SQ SN:NC_001139.9 LN:1090940
@SQ SN:NC_001140.6 LN:562643
@SQ SN:NC_001141.2 LN:439888
@SQ SN:NC_001142.9 LN:745751
@SQ SN:NC_001143.9 LN:666816
@SQ SN:NC_001144.5 LN:1078177
@SQ SN:NC_001145.3 LN:924431
@SQ SN:NC_001146.8 LN:784333
@SQ SN:NC_001147.6 LN:1091291
@SQ SN:NC_001148.4 LN:948066
@PG ID:hisat2  PN:hisat2  VN:2.2.1   CL:"/home/koshu3/tools/miniforge3/envs/pags_rnaseq/bin/hisat2-align-s --wrapper basic-0 -p
SRR453569.2    77  *   0   0   *   *   0   0   NTGGACTTTAGTGCGTTGAACGACATATTAAATGAACATGGTATTAGTATACTCCCAGCTAACGCATCACAATATGTCAAAAGA
SRR453569.2    141 *   0   0   *   *   0   0   NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
SRR453569.4    89  NC_001143.9    24039   60  101M=240390TTCGAACGTCTCAAAGACATATGAGGAGCATATTGAGACCGTTTAATCACTTTTCATTGCTCTCTAGGGCGTG
```

事前実行した結果で確認

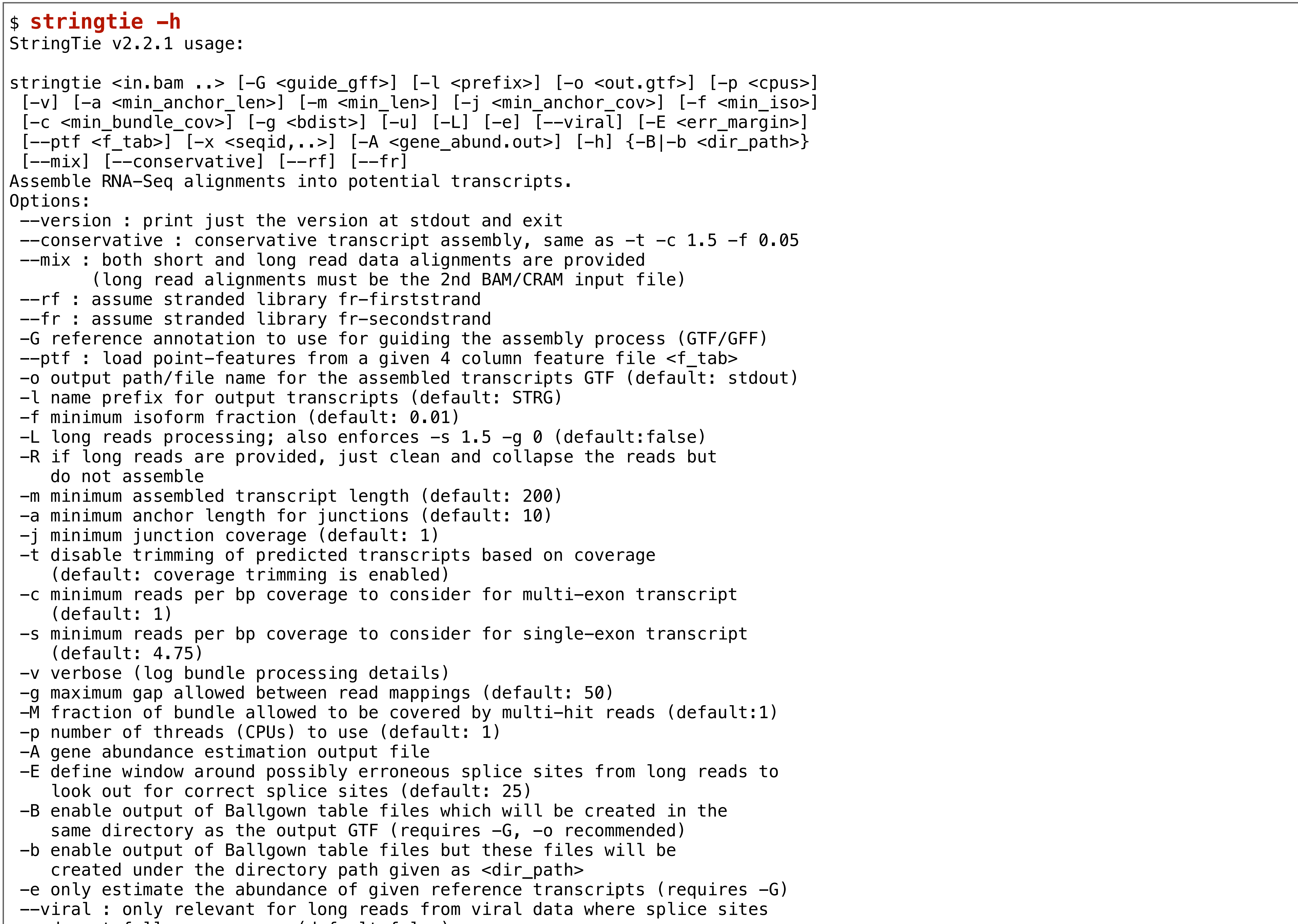
$ more outputs/hisat2/SRR453569.sam

発現量の算出

```
$ more scripts/stringtie.sh
#$ -S /bin/bash
#$ -pe def_slot 4
#$ -cwd
#$ -l mem_req=8G,s_vmem=8G

conda activate pags_rnaseq

ACESSIONS=(453566 453569)
for NUM in ${ACESSIONS[@]}
do
  PREFIX=SRR${NUM}
  BAM=${PREFIX}".sorted.bam"
  stringtie -e -B -p ${NSLOTS} \
         -G reference/s288c.gff \
         -o ballgown/$PREFIX/${PREFIX}.out.gtf \
         -A ${PREFIX}.gene_abund.tab \
         $BAM
done
```

```
-e only estimate the abundance of given reference transcripts (requires -G)
-B enable output of Ballgown table files which will be created in the
    same directory as the output GTF (requires -G, -o recommended)
-p number of threads (CPUs) to use (default: 1)
-G reference annotation to use for guiding the assembly process (GTF/GFF)
-o output path/file name for the assembled transcripts GTF (default: stdout)
-A gene abundance estimation output file
```

発現量の算出



```
$ stringtie -h
StringTie v2.2.1 usage:

stringtie <in.bam ..> [-G <guide_gff>] [-l <prefix>] [-o <out.gtf>] [-p <cpus>]
 [-v] [-a <min_anchor_len>] [-m <min_len>] [-j <min_anchor_cov>] [-f <min_iso>]
 [-c <min_bundle_cov>] [-g <bdist>] [-u] [-L] [-e] [--viral] [-E <err_margin>]
 [--ptf <f_tab>] [-x <seqid,..>] [-A <gene_abund.out>] [-h] {-B|-b <dir_path>}
 [--mix] [--conservative] [--rf] [--fr]
Assemble RNA-Seq alignments into potential transcripts.
Options:
 --version : print just the version at stdout and exit
 --conservative : conservative transcript assembly, same as -t -c 1.5 -f 0.05
 --mix : both short and long read data alignments are provided
        (long read alignments must be the 2nd BAM/CRAM input file)
 --rf : assume stranded library fr-firststrand
 --fr : assume stranded library fr-secondstrand
 -G reference annotation to use for guiding the assembly process (GTF/GFF)
 --ptf : load point-features from a given 4 column feature file <f_tab>
 -o output path/file name for the assembled transcripts GTF (default: stdout)
 -l name prefix for output transcripts (default: STRG)
 -f minimum isoform fraction (default: 0.01)
 -L long reads processing; also enforces -s 1.5 -g 0 (default:false)
 -R if long reads are provided, just clean and collapse the reads but
    do not assemble
 -m minimum assembled transcript length (default: 200)
 -a minimum anchor length for junctions (default: 10)
 -j minimum junction coverage (default: 1)
 -t disable trimming of predicted transcripts based on coverage
    (default: coverage trimming is enabled)
 -c minimum reads per bp coverage to consider for multi-exon transcript
    (default: 1)
 -s minimum reads per bp coverage to consider for single-exon transcript
    (default: 4.75)
 -v verbose (log bundle processing details)
 -g maximum gap allowed between read mappings (default: 50)
 -M fraction of bundle allowed to be covered by multi-hit reads (default:1)
 -p number of threads (CPUs) to use (default: 1)
 -A gene abundance estimation output file
 -E define window around possibly erroneous splice sites from long reads to
    look out for correct splice sites (default: 25)
 -B enable output of Ballgown table files which will be created in the
    same directory as the output GTF (requires -G, -o recommended)
 -b enable output of Ballgown table files but these files will be
    created under the directory path given as <dir_path>
 -e only estimate the abundance of given reference transcripts (requires -G)
 --viral : only relevant for long reads from viral data where splice sites
    do not follow consensus (default:false)
```

発現量の算出

講習中はqsub を実行しないでください。

```
$ qsub scripts/stringtie.sh
Your job 24707314 ("stringtie.sh") has been submitted
```

```
$ 合計 8311004
drwxr-xr-x  7 koshu3 koshu       4096 10月 16 14:47 .
drwxr-x--- 13 koshu3 koshu       4096 10月 13 14:50 ..
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu     490409 10月 16 14:46 SRR453566.gene_abund.tab
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu 4173908395 10月 16 14:17 SRR453566.sam
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu  821523448 10月 16 14:18 SRR453566.sorted.bam
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu     491170 10月 16 14:47 SRR453569.gene_abund.tab
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu 2922686962 10月 16 14:19 SRR453569.sam
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu  591294623 10月 16 14:19 SRR453569.sorted.bam
drwxr-xr-x  4 koshu3 koshu       4096 10月 16 14:46 ballgown
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu        693 10月 16 14:18 hisat2.sh.e24707186.1
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu        688 10月 16 14:19 hisat2.sh.e24707186.2
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:16 hisat2.sh.o24707186.1
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:18 hisat2.sh.o24707186.2
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:16 hisat2.sh.pe24707186.1
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:18 hisat2.sh.pe24707186.2
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:16 hisat2.sh.po24707186.1
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:18 hisat2.sh.po24707186.2
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu       2262 10月 16 11:47 hisat2_index.sh.e24706258
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu       3919 10月 16 11:47 hisat2_index.sh.o24706258
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 11:47 hisat2_index.sh.pe24706258
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 11:47 hisat2_index.sh.po24706258
drwxr-xr-x  2 koshu3 koshu       4096 10月 16 11:58 outputs
drwxr-xr-x  2 koshu3 koshu       4096 10月 16 10:53 reads
drwxr-xr-x  2 koshu3 koshu       4096 10月 16 11:47 reference
drwxr-xr-x  2 koshu3 koshu       4096 10月 17  2022 scripts
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:46 stringtie.sh.e24707314
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:46 stringtie.sh.o24707314
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:46 stringtie.sh.pe24707314
-rw-r--r--  1 koshu3 koshu          0 10月 16 14:46 stringtie.sh.po24707314
```

事前実行した結果で確認

$ ls outputs/stringtie

```
$ ls ballgown/*
ballgown/SRR453566:
SRR453566.out.gtf  e2t.ctab  e_data.ctab
i2t.ctab  i_data.ctab  t_data.ctab

ballgown/SRR453569:
SRR453569.out.gtf  e2t.ctab  e_data.ctab
i2t.ctab  i_data.ctab  t_data.ctab
```

次のステップとして、R などを用いることで可視化などができる。

ballgown を使う場合は、このballgown ディレクトリを
そのまま入力データとして使用できる。

事前実行した結果で確認

$ ls outputs/stringtie/ballgown

結果ファイルの確認

SRR453566.gene_abund.tab ファイル

```
$ more SRR453566.gene_abund.tab
```

```
Gene ID          Gene Name  Reference     Strand  Start   End     Coverage    FPKM        TPM
gene-YAL068C     PAU8       NC_001133.9   -       1807    2169    1.011341    1.058091    1.143341
gene-YAL030W     SNC1       NC_001133.9   +       87286   87752   70.827682   74.101746   80.072098
gene-YAL029C     MYO4       NC_001133.9   -       87855   92270   35.674591   37.323677   40.330833
gene-YAL028W     FRT2       NC_001133.9   +       92900   94486   5.316950    5.562730    6.010918
gene-YAL027W     SAW1       NC_001133.9   +       94687   95472   24.430025   25.559322   27.618629
gene-YAL026C     DRS2       NC_001133.9   -       95630   99697   27.811796   29.097420   31.441788
gene-YNCA0001W HRA1         NC_001133.9   +       99305   99868   3.410652    3.568312    3.855810
gene-YAL025C     MAK16      NC_001133.9   -       100225  101145  146.168289  152.925034  165.246155
gene-YAL024C     LTE1       NC_001133.9   -       101565  105872  9.433844    9.869931    10.665148
gene-YAL023C     PMT2       NC_001133.9   -       106272  108551  185.183334  193.743591  209.353424
gene-YAL022C     FUN26      NC_001133.9   -       108877  110430  36.694981   38.391239   41.484402
gene-YAL021C     CCR4       NC_001133.9   -       110846  113359  35.354412   36.988697   39.968864
gene-YAL020C     ATS1       NC_001133.9   -       113614  114615  31.161676   32.602150   35.228893
gene-YAL019W     FUN30      NC_001133.9   +       114919  118314  30.554476   31.966883   34.542442
gene-YAL018C     LDS1       NC_001133.9   -       118564  119541  1.130879    1.183155    1.278481
gene-YAL017W     PSK1       NC_001133.9   +       120225  124295  18.278311   19.123240   20.663992
```

発現量のノーマライズ

FPKM: Fragments Per Kilobase of exon per Million reads mapped
TPM: Transcripts Per kilobase Milion

FPKMもTPMも以下の二つで補正するが、補正する順番が異なる。

(1) 総リード数での補正 (総リード数 100万)

(2) 遺伝子長での補正 (遺伝子長 1000b)

FPKM (1) -> (2)
TPM (2) -> (1)

Singularity を利用したスクリプト

```
$ more scripts/hisat2_singularity.sh
#$ -S /bin/bash
#$ -pe def_slot 4
#$ -cwd
#$ -t 1-2:1
#$ -l mem_req=8G,s_vmem=8G

conda activate pags_rnaseq

# Batch culture: SRR453566
# chemostat: SRR453569
ACESSIONS=(453566 453569)
no=`expr ${SGE_TASK_ID} - 1`

NUM=${ACESSIONS[${no}]}
PREFIX=SRR${NUM}

# read file
DIR=./reads/
QUERY1_1=${DIR}${PREFIX}"_1.fastq.gz"
QUERY1_2=${DIR}${PREFIX}"_2.fastq.gz"

singularity exec /usr/local/biotools/h/hisat2:2.2.1--h87f3376_4 \
 hisat2 -p ${NSLOTS} -x reference/s288c.fa --dta \
        -1 ${QUERY1_1} -2 ${QUERY1_2} \
        -S ${PREFIX}.sam

# convert sam to bam
# sort by position
singularity exec /usr/local/biotools/s/samtools:1.17--hd87286a_2 \
 samtools sort -@ ${NSLOTS} ${PREFIX}.sam -o ${PREFIX}.sorted.bam
```

おわり

GTF format とは

```
# stringtie -e -B -p 4 -G reference/s288c.gff -o ballgown/SRR453566/SRR453566.out.gtf -A SRR453566.gene_abund.tab SRR453566.sorted.bam
# StringTie version 2.2.1
NC_001133.9    StringTie    transcript    1807     21691000     -   .   gene_id "gene-YAL068C"; transcript_id "rna-NM_001180043.1"; ref_gene_name
NC_001133.9    StringTie    exon          1807     21691000     -   .   gene_id "gene-YAL068C"; transcript_id "rna-NM_001180043.1"; exon_number "
NC_001133.9    StringTie    transcript    87286    877521000    +   .   gene_id "gene-YAL030W"; transcript_id "rna-NM_001178175.1"; ref_gene_nam
NC_001133.9    StringTie    exon          87286    873871000    +   .   gene_id "gene-YAL030W"; transcript_id "rna-NM_001178175.1"; exon_number
NC_001133.9    StringTie    exon          87501    877521000    +   .   gene_id "gene-YAL030W"; transcript_id "rna-NM_001178175.1"; exon_number
```

タブ区切りフォーマット。値がない場合は、”.” が設定される。

1. seqname：染色体 or スキャフォールドの名前
2. source：アノテーションを生成したプログラムまたはデータソースの名前
3. feature：フィーチャータイプ（mRNA, gene, exon, CDS ….）
4. start：スタートポジション (1bp 〜)
5. end：エンドポジション (1bp 〜)
6. score：スコア
7. strand：+(forward)、-(reverse)または '.'
8. frame：翻訳フレーム（0, 1, 2）
9. attribute：追加情報。セミコロンで区切られたタグと値のペアのリスト。

GFF では、gene_id=XXXXX; の形式に対して、GTF では、gene_id “XXXXXX”; と記載していく。