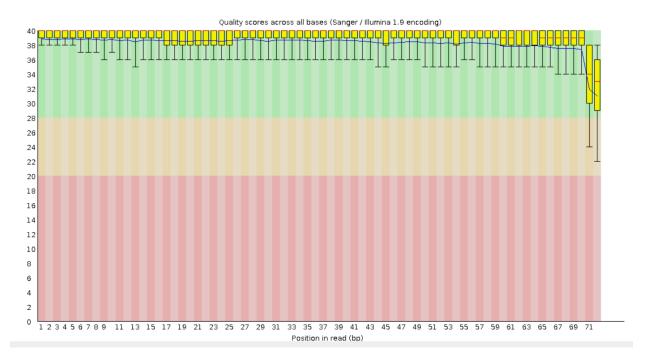
Analiza danych wysokoprzepustowych – sprawozdanie 1

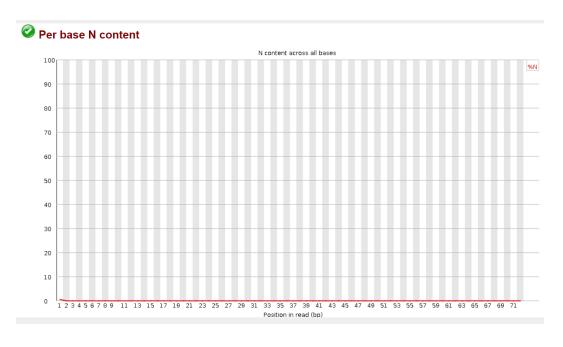
Praca wykonana na 2 plikach fastą zawierających wyniki sekwencjonowania krótkich RNA z genomu świni.

1. Wygenerowanie raportu FastQC, który określa jakość uzyskanych odczytów:

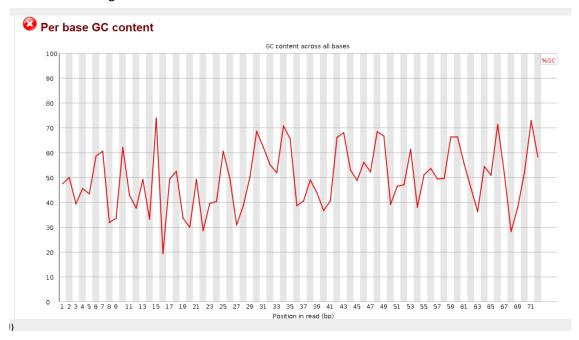
marcelb@pandora:~> /home/tools/FastQC/fastqc /home/lab1/JW10s_001.fastq -o ./
marcelb@pandora:~> /home/tools/FastQC/fastqc /home/lab1/JW10s_002.fastq -o ./



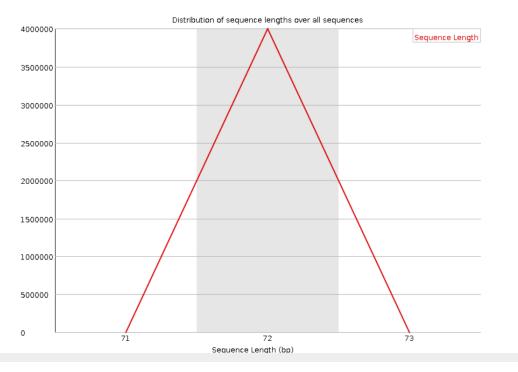
Powyższy wykres pokazuje średnią jakość odczytu względem pozycji. Widać, że jakość odczytów jest wysoka, z wyjątkiem pozycji 70 i 71, co normalne na końcach odczytów.



Na tym wykresie przedstawiono ilość wywołań N w trakcie sekwencjonowania. N jest wstawiane kiedy nie da się poprawnie odczytać któregoś z 4 rodzajów nuklotydów. Wykes pokazuje więc na przestrzeni wszystkich sekwencji w których pozycjach wstawiano N. Widać, że było to niezwykle rzadkie o ile w ogóle obecne.



Powyżej ukazano zawartość nukleotydów GC w odczytach. Wyświetlone jest ostrzeżenie ponieważ rozkład powinien być zbliżony do normalnego.



Na tym wykresie widać rozkład długości odczytów. Wszystkie odczyty są o długości 72 z odchyleniem standardowym równym 1 (zdarzają się odczyty 71 lub 73).

2. Odcinanie adapterów, które służą tylko do przygotowania biblioteki i należy je usunąć:

Aby znaleźć sekwencje adapterową, możemy skorzystać z sekcji Overrepresented sequences w raporcie FastQC i z faktu, że takie adaptery zaczynają się od *TGGAATTC*... Wyszukana sekwencja adaptorowa:

Overrepresented sequences

Sequence	Count	Percentage	Possible Source
GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT <mark>TGGAATTCTCGGGTGCCAA</mark> GGAACTCCAGTCACCATGGCA	413444	10.3361	RNA PCR Primer, Index 34 (100% over 40bp)
${\tt GTTTCCGTAGTGGTGGTTATCACGTTCGCCT} {\tt TGGAATTCTCGGGTGCCAA} {\tt GGAACTCCAGTCACCATGGC}$	339620	8.490499999999999	RNA PCR Primer, Index 34 (100% over 39bp)
${\tt TACCCTGTAGAACCGAATTTGT} \underline{{\tt TGGAATTCTCGGGTGCCAA}} {\tt GGAACTCCAGTCACCATGGCATCTCGTATGC}$	297227	7.4306750000000001	RNA PCR Primer, Index 34 (100% over 50bp)
${\tt TTTCTGTGATGAATCAAACTAGCTCACTATGAACTAACAATGAAAAGATATGAACACCTGAGATGGAATTCT}$	239387	5.984674999999999	No Hit
${\tt TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT} {\tt TGGAATTCTCGGGTGCCAA} {\tt GGAACTCCAGTCACCATGGCATCTCGTATGC}$	136551	3.41377500000000002	RNA PCR Primer, Index 34 (100% over 50bp)
${\tt GCATTGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT} {\tt TGGAATTCTCGGGTGCCAA} {\tt GGAACTCCAGTCACCATGGCAT}$	80447	2.011175	RNA PCR Primer, Index 34 (100% over 41bp)
${\tt GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCC} \\ {\tt TGGAATTCTCGGGTGCCAA} \\ {\tt GGAACTCCAGTCACCATGGCAT} \\$	66641	1.666025	RNA PCR Primer, Index 34 (100% over 41bp)
${\tt GCATGGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT} {\tt TGGAATTCTCGGGTGCCAA} {\tt GGAACTCCAGTCACCATGGCAA} {\tt GGAACTCCAGTCACCATGGCAAA} {\tt GGAACTCCAGTCACCATGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA$	58851	1.471275	RNA PCR Primer, Index 34 (100% over 40bp)
${\sf TGAGATGAAGCACTGTAGCT} \\ \underline{{\sf TGGAATTCTCGGGTGCCAA}} \\ \underline{{\sf GGAACTCCAGTCACCATGGCATCTCGTATGCCG}}$	47035	1.175875	RNA PCR Primer, Index 34 (100% over 52bp)

Wycięcie adapterów:

fastx_clipper -i /home/lab1/JW10s_001.fastq -a 'TGGAATTCTCGGGTGCCAA' -v -o ./clip

Clipping Adapter: TGGAATTCTCGGGTGCCAA

Min. Length: 5

Input: 4000000 reads. Output: 3960248 reads.

discarded 1269 too-short reads. discarded 13381 adapter-only reads.

discarded 25102 N reads.

marcelb@pandora:~>

fastx clipper -i /home/lab1/JW10s 002.fastq -a 'TGGAATTCTCGGGTGCCAA' -v -o ./clip2

Clipping Adapter: TGGAATTCTCGGGTGCCAA

Min. Length: 5

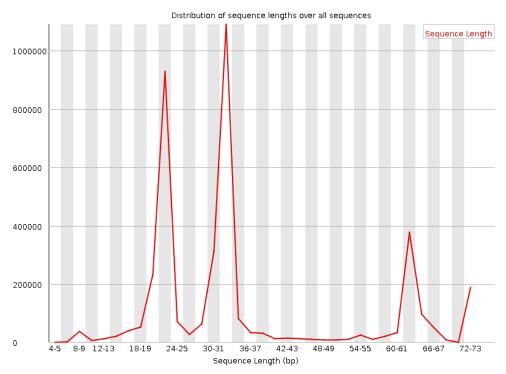
Input: 1772208 reads. Output: 1754537 reads.

discarded 528 too-short reads. discarded 5998 adapter-only reads.

discarded 11145 N reads.

Następnie sprawdzono raporty fastQC po odcięciu adapterów. Główna i porządana zmiana nastąpiła w sekcji Sequence Length Distribution:

Sequence Length Distribution



Jest to porządana zmiana, ponieważ po odcięciu adapterów nie oczekujemy już, że nasze odczyty mają długości ok. 72 bp, gdyż są to krótsze RNA, które były sekwencjonowane i które są przedmiotem naszego zainteresowania. Np. widoczne są miRNA, siRNA i piRNA, które osiągają długości nieco ponad 20 nukleotydów. Widać również nieco dłuższe fragmenty, które mogą być fragmentami tRNA lub snRNA.

3. Filtrowanie odczytów

```
marcelb@pandora:~> fastq_quality_filter -i ./clip -q 30 -p 80 -o./clip_filtered -v
Quality cut-off: 30
Minimum percentage: 80
Input: 3960248 reads.
Output: 3811404 reads.
discarded 148844 (3%) low-quality reads.
```

```
marcelb@pandora:~> fastq_quality_filter -i ./clip2 -q 30 -p 80 -o./clip2_filtered -v Quality cut-off: 30
Minimum percentage: 80
Input: 1754537 reads.
Output: 1680287 reads.
discarded 74250 (4%) low-quality reads.
marcelb@pandora:~> |
```

4. Łączenie plików

marcelb@pandora:~> cat clip_filtered clip2_filtered > clip_filtered_merged

5. Łączenie tych samych sekwencji za pomocą narzędzia FastQ Collapser

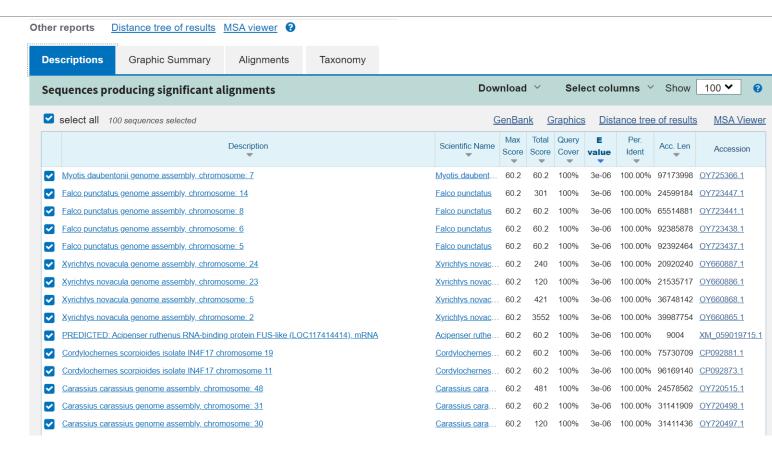
```
marcelb@pandora:~> fastx_collapser -i ./clip_filtered_merged -v -o ./filtered_merged_collapsed
Input: 5491691 sequences (representing 5491691 reads)
Output: 205712 sequences (representing 5491691 reads)
```

6. Przeszukiwanie BLAST 3 najbardziej licznych sekwencji

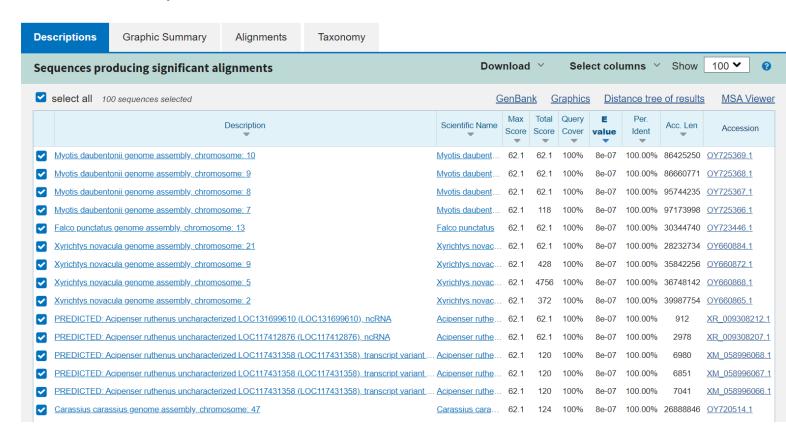
```
marcelb@pandora:~> head filtered_merged_collapsed
>1-598816
GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT
>2-493868
GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTCGCCT
>3-436915
TACCCTGTAGAACCGAATTTGT
>4-338190
TTTCTGTGATGAATCAAACTAGCTCACTATGAACTAACAATGAAAAGATATGAACACCTGAGA
>5-195780
TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT
```

a) Wszystkie organizmy:

Sekwencja 1 – najliczniejsza:



Sekwencja 2:



Widać, że jest mnóstwo wyników, w których mamy 100% pokrycia ze 100% identycznością przy bardzo niskich wartościach e-value. Oznacza to, że spośród wykrytych w komórkach Świni krótkich RNA, 2 najczęstsze obecne są w wielu innych organizmach (wyniki to całe genomy lub chromosomy) i mogą to być mocno uniwersalne sekwencje RNA. Organizmy w których znaleziono te 2 sekwencje mocno się nakładają – zbliżone wyniki.

Sekwencja 3:

Nie znaleziono wyników. Przy zmianie parametrów na 'Somewhat similar sequences' uzyskujemy poniższe wyniki:

~	PREDICTED: Bos taurus homeobox D4 (HOXD4), transcript variant X2, mRNA	Bos taurus	44.1	44.1	100%	0.14	100.00%	5015	XM_010801892.4
~	PREDICTED: Bos taurus homeobox D4 (HOXD4), transcript variant X1, mRNA	Bos taurus	44.1	44.1	100%	0.14	100.00%	5018	XM_010801891.4
~	Conger conger genome assembly, chromosome: 17	Conger conger	44.1	44.1	100%	0.14	100.00%	40826945	OY741330.1
~	Conger conger genome assembly, chromosome: 3	Conger conger	44.1	44.1	100%	0.14	100.00%	83289512	OY741316.1
~	Conger conger genome assembly, chromosome: 14	Conger conger	44.1	44.1	100%	0.14	100.00%	47674658	OY741327.1
~	Chelon labrosus genome assembly, chromosome: 10	Chelon labrosus	44.1	44.1	100%	0.14	100.00%	30637012	OY741298.1
~	Chelon labrosus genome assembly, chromosome: 5	Chelon labrosus	44.1	44.1	100%	0.14	100.00%	31571676	OY741293.1
~	Eutrigla gurnardus genome assembly, chromosome: 12	Eutrigla gurnard	44.1	44.1	100%	0.14	100.00%	28466340	OY741275.1
~	Eutrigla gurnardus genome assembly, chromosome: 8	Eutrigla gurnard	44.1	44.1	100%	0.14	100.00%	30675866	OY741271.1
~	Raja brachyura genome assembly, chromosome: 7	Raja brachyura	44.1	44.1	100%	0.14	100.00%	95332520	OY740787.1
~	Fringilla coelebs genome assembly, chromosome: 7	Fringilla coelebs	44.1	44.1	100%	0.14	100.00%	38678189	OY740731.1

Graphics Distance tree of results

62.1 62.1 100% 2e-09 100.00% 182046 CT009664.17

Max Total Query E Per.

<u>GenBank</u>

Tym sposobem otrzymaliśmy wyniki ale z wysokim E-value, nie są one wiarygodne, choć patrząc np. na przewidywaną sekwencje pochodzącą z Bos Taurus – bydła domowego, jest ona sekwencją miRNA. Być może po głębszej analizie tym tropem możnaby dojść do jakiś wniosków.

b) Organizm Sus scrofa – dzik azjatycki

Pig DNA sequence from clone CH242-113D8 on chromosome 7, complete sequence

select all 3 sequences selected

		Description	Scientific Name		Score	Score	Cover	value •	Ident	Acc. Len	Access
		Sus scrofa DNA, contains BIRC6, YIPF4, NLRC4, SLC30A6 genes, clone: L442I04	Sus scrofa		60.2	60.2	100%	8e-09 1	00.00%	193453	LC14494
	$ lap{\square}$	Sus scrofa scrofa breed NS chromosome 12	Sus scrofa scrofa		60.2	60.2	100%	8e-09 1	00.00%	63073457	CP07156
		Sus scrofa scrofa breed NS chromosome 16	Sus scrofa scrofa		52.8	52.8	87%	1e-06 1	00.00%	81227385	CP07156
✓ select all 3 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MS							ISA View				
		Description	Scientific Name	Max Score		Query		Per.	Acc. L	en A	ccession
		PREDICTED: Sus scrofa actin related protein T3 (ACTRT3), mRNA	Sus scrofa	62.1	62.1	100%	2e-09	100.009	6 371	3 <u>XM_0</u>	03358668
		Sus scrofa scrofa breed NS chromosome 10	Sus scrofa scrofa	62.1	62.1	100%	2e-09	100.009	6 71502	313 <u>CP07</u>	<u>1561.1</u>

Sus scrofa

Dla obu pierwszych sekwencji znaleziono po 3 wyniki.

Dla 3 ponownie nie znaleziono i zmieniono kryteria wyszukiwania jak poprzednio:

select all 100 sequences selected	aces selected <u>GenBank</u> <u>Graphics</u>					ance tree	MSA Viewer	
Description	Scientific Name	Max Score		Query Cover	E value ▼	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Sus scrofa DNA, contains BIRC6, YIPF4, NLRC4, SLC30A6 genes, clone: L442I04	Sus scrofa	59.0	59.0	100%	1e-08	100.00%	193453	LC144946.1
Sus scrofa scrofa breed NS chromosome 12	Sus scrofa scrofa	59.0	4189	100%	1e-08	100.00%	63073457	CP071563.1
PREDICTED: Sus scrofa hes family bHLH transcription factor 7 (HES7), mRNA	Sus scrofa	54.5	54.5	100%	6e-07	96.88%	2508	XM_021067858.1
Sus scrofa scrofa breed NS chromosome 16	Sus scrofa scrofa	51.8	4864	100%	2e-06	100.00%	81227385	CP071567.1
Pig DNA sequence from clone CH242-277K20 on chromosome X, complete sequence	Sus scrofa	50.0	50.0	100%	7e-06	93.75%	186329	CU606856.13
Pig DNA sequence from clone CH242-38319 on chromosome 4, complete sequence	Sus scrofa	48.2	48.2	81%	2e-05	100.00%	197356	CU207284.5
Sus scrofa scrofa breed NS chromosome 10	Sus scrofa scrofa	46.4	4930	100%	9e-05	93.75%	71502813	CP071561.1
Sus scrofa scrofa breed NS chromosome 17	Sus scrofa scrofa	45.5	4602	100%	3e-04	90.62%	65056060	CP071568.1
Pig DNA sequence from clone CH242-187M17 on chromosome X, complete sequence	Sus scrofa	45.5	45.5	100%	3e-04	90.62%	89986	FP085570.5
Pig DNA sequence from clone CH242-228D7 on chromosome 2, complete sequence	Sus scrofa	45.5	72.0	84%	3e-04	96.30%	205791	FP101995.17
Sus scrofa scrofa breed NS chromosome 18	Sus scrofa scrofa	42.8	3247	100%	0.001	92.86%	57355364	CP071569.1

2 pierwsze sekwencje wydają się faktycznie być krótkimi RNA, natomiast 3 sekwencja budzi obawy. Być może jest to jakieś krótkie RNA lub fragment dłuższego, specyficznie występujący w komórkach świni.