

基生研ゲノムインフォマティックス・トレーニングコース2021
「NGS解析入門」

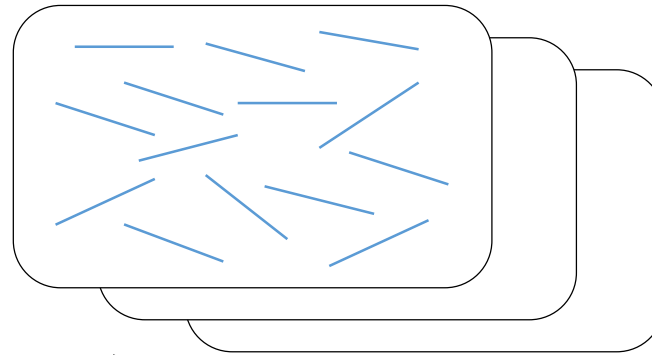
2021.8.25-2021.8.26

クオリティコントロールと NGS基本ツール

基礎生物学研究所
生物機能解析センター
山口勝司

NGSデータ処理の概要

シーケンスリード(DNA/RNA由来)

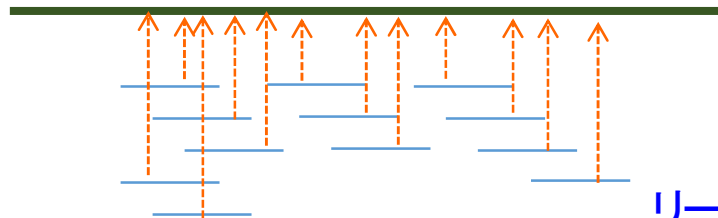


リファレンス配列あり

リファレンス配列なし

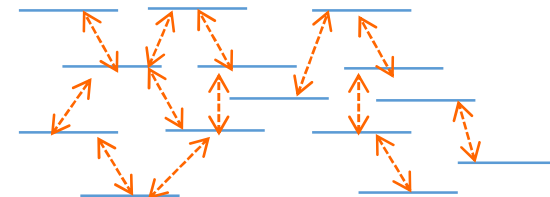
リファレンス配列へのマッピング

リファレンス配列

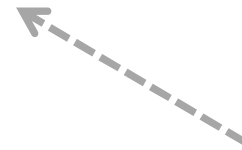


リード配列

デノボ・アセンブル



アセンブル配列



クオリティコントロール


- Fastqc
- Cutadapt(Pre-processing tools)

NGSデータ解析におけるクオリティーコントロールの重要性

- ・作製したライブラリーに問題はなかったか
 - アダプター配列ばかりではないか
 - コンタミ配列の有無
 - PCR増幅の適性度
 - 短いライブラリーほどクラスター増幅されやすい
 - GC率に偏りがあるものは増幅されにくい
- 検証する手段

- ・得られるdataのクオリティーは同一ではない
 - シーケンサーの調子 エアーかみ
 - 作製ライブラリーのサイズ分布
 - シーケンサー間の性能差
- 可能な範囲でクオリティーを揃える手段

シーケンスのクォリティーcheckツール FASTQC

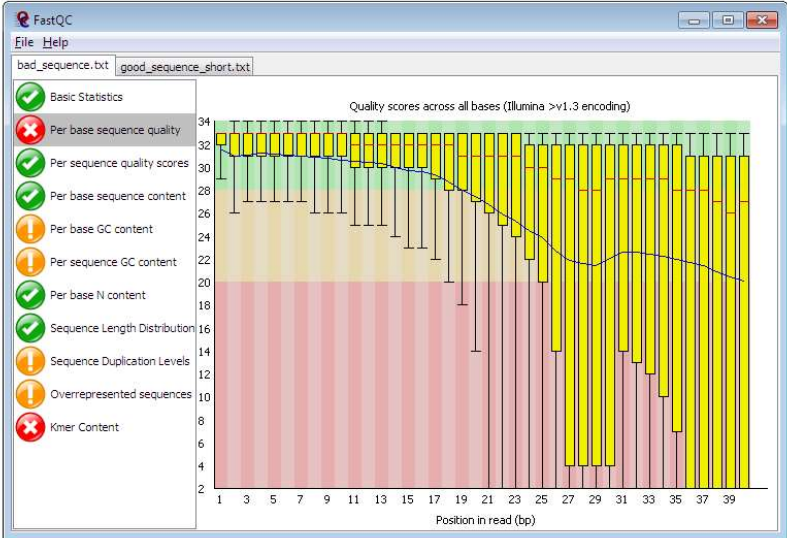
 Babraham Bioinformatics

About | People | Services | Projects | Training | Publications

FastQC

Function	A quality control tool for high throughput sequence data.
Language	Java
Requirements	A suitable Java Runtime Environment The Picard BAM/SAM Libraries (included in download)
Code Maturity	Stable. Mature code, but feedback is appreciated.
Code Released	Yes, under GPL v3 or later .
Initial Contact	Simon Andrews

[Download Now](#)



Documentation

A [copy of the FastQC](#) documentation is available for you to try before you buy (well download..).

Example Reports

- [Good Illumina Data](#)
- [Bad Illumina Data](#)
- [Adapter dimer contaminated run](#)
- [Small RNA with read-through adapter](#)
- [Reduced Representation BS-Seq](#)
- [PacBio](#)
- [454](#)

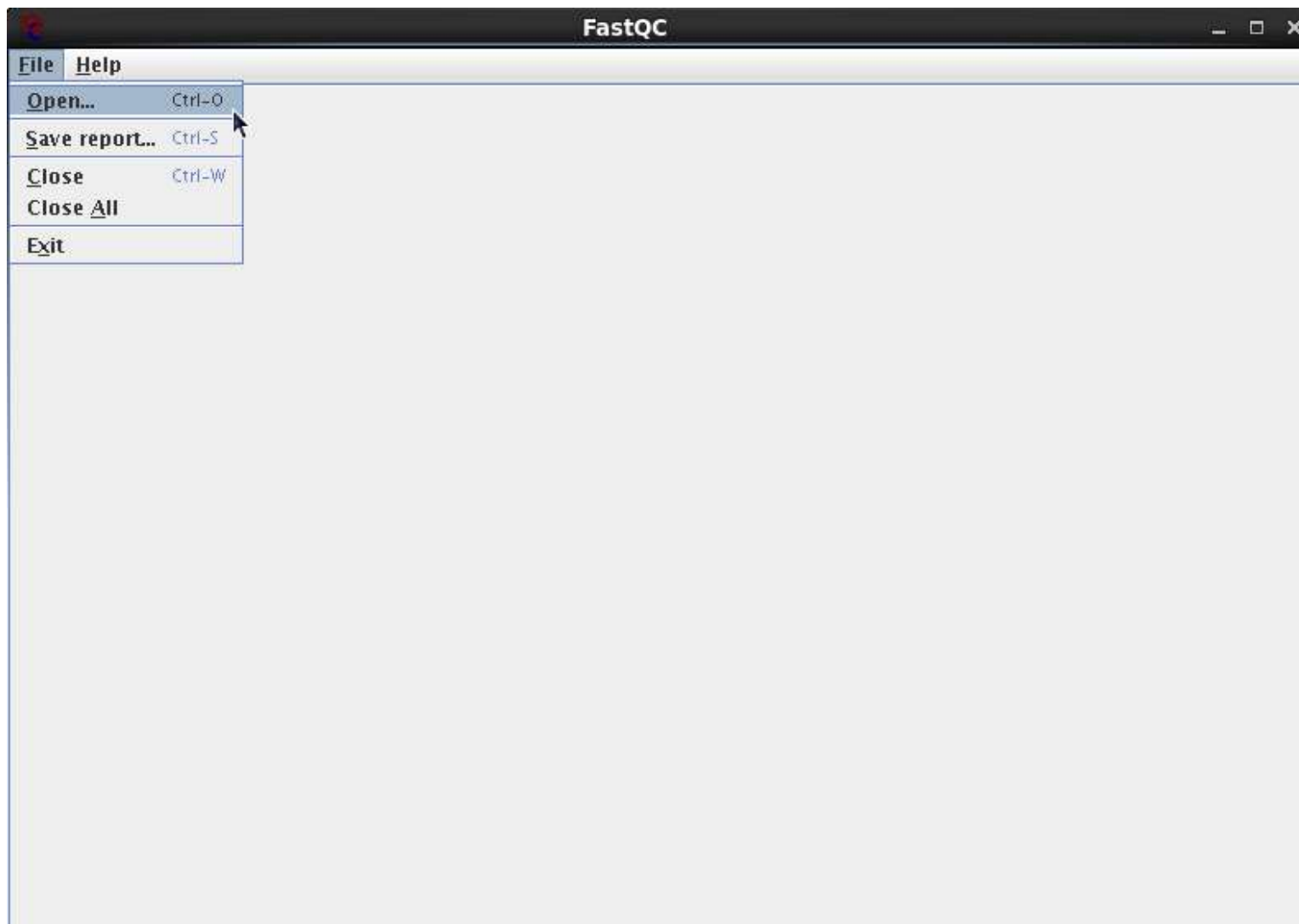
Version 0.11.9

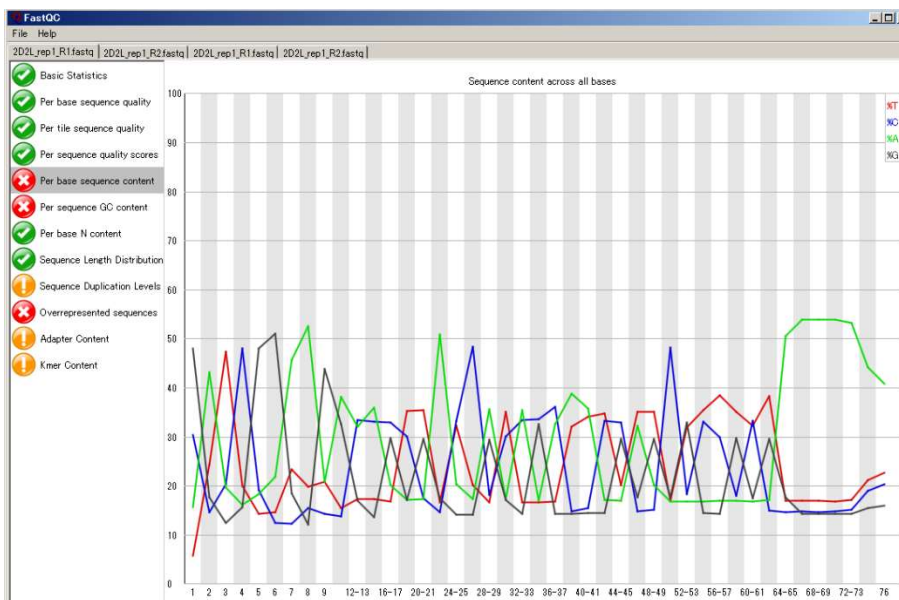
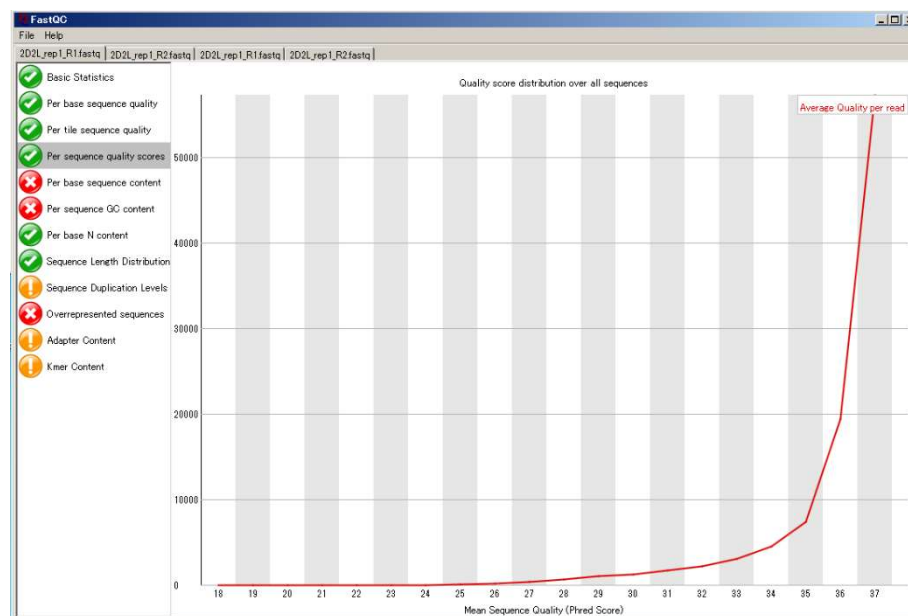
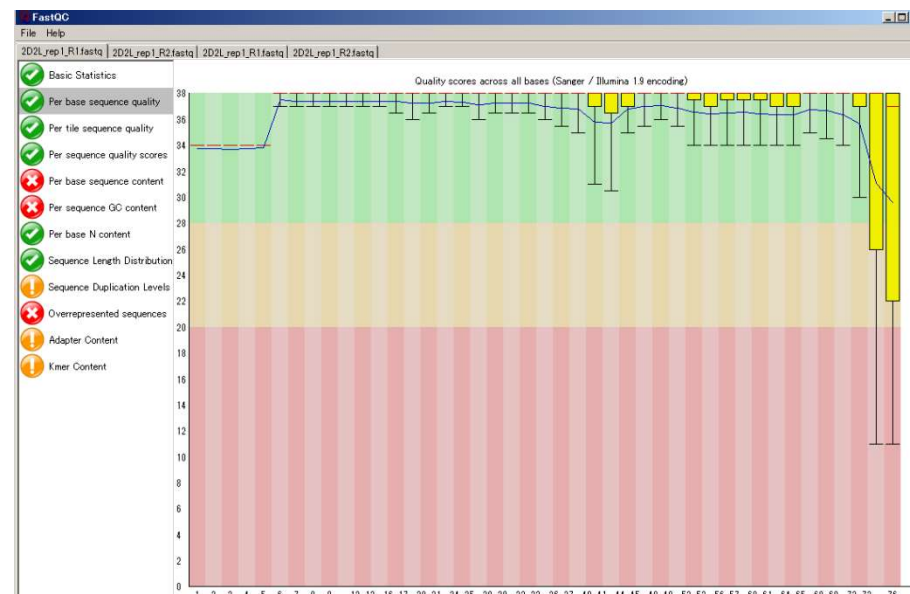
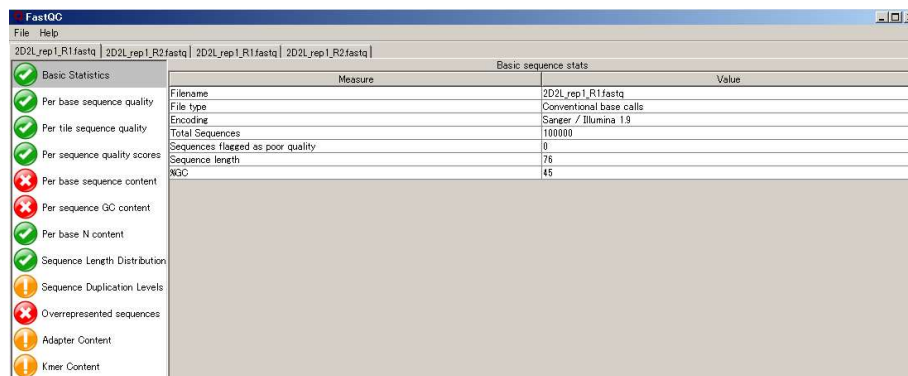
<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

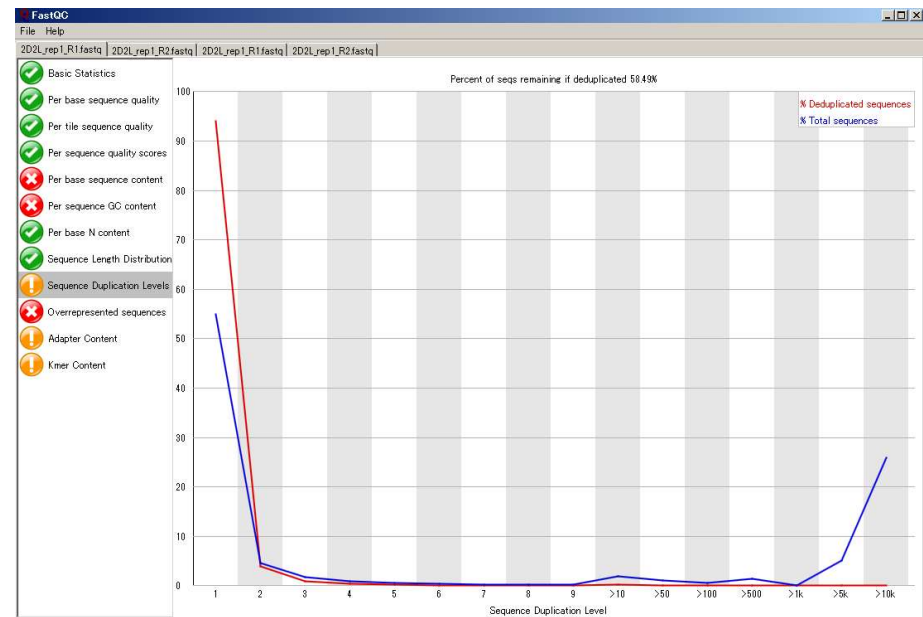
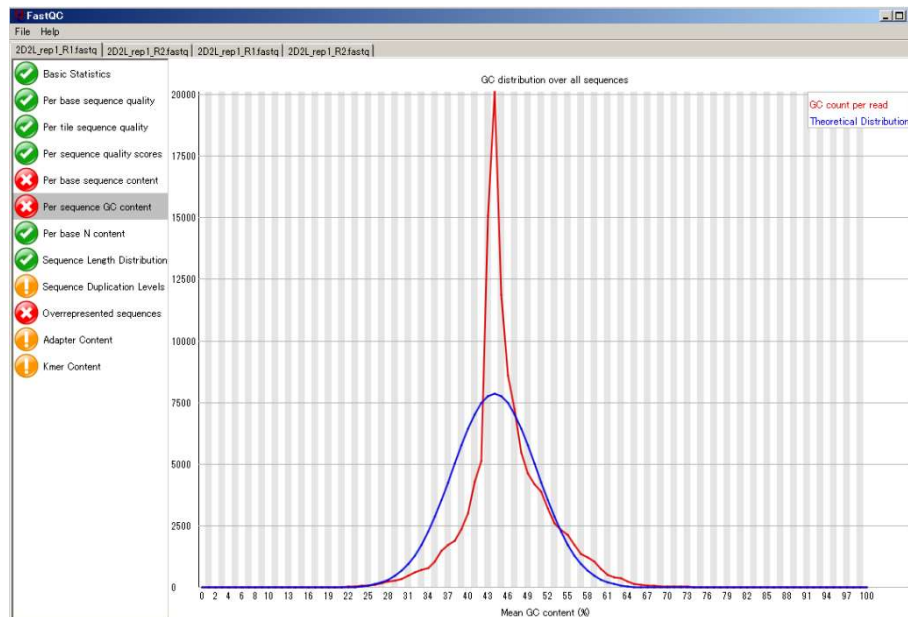
FASTQC使用法

GUI

java jdkを予めインストールしておく必要がある。







FastQC

File Help

2D2L_rep1_R1.fastq | 2D2L_rep1_R2.fastq | 2D2L_rep1_R1.fastq | 2D2L_rep1_R2.fastq

Basic Statistics

Per base sequence quality

Per tile sequence quality

Per sequence quality scores

Per base sequence content

Per sequence GC content

Per base N content

Sequence Length Distribution

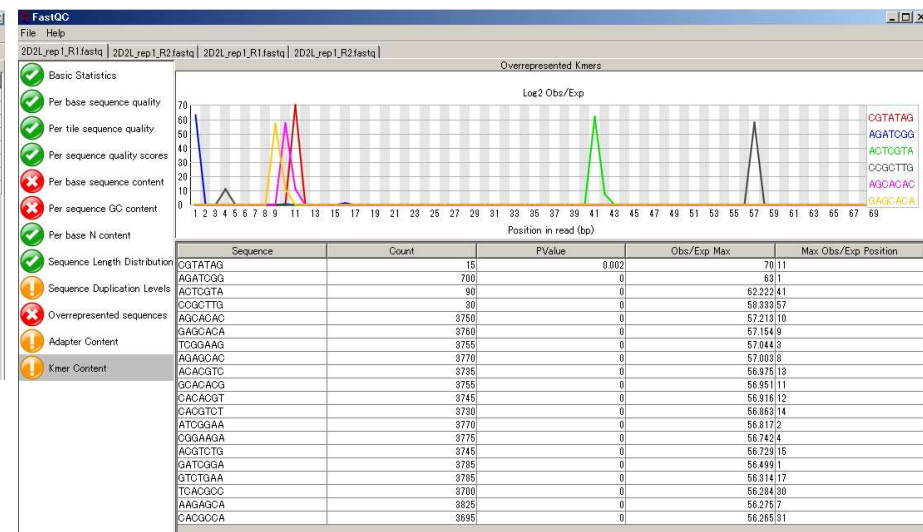
Sequence Duplication Levels

Overrepresented sequences

Adapter Content

Kmer Content

Sequence	Count	Percentage	Possible Source
GATGGGAAGAGCAGCTCTGAACTCC...	25945	0.100%	TruSeq Adapter, Index 6 (100% over 50bp)
AGATGGGAAGAGCAGCTCTGAACTCC...	5147	0.021%	TruSeq Adapter, Index 6 (100% over 48bp)
GATGGGAAGAGCAGCTCTGAACTCC...	794	0.003%	TruSeq Adapter, Index 6 (98% over 50bp)
GATGGGAAGAGCAGCTCTGAACTCC...	617	0.003%	TruSeq Adapter, Index 6 (98% over 50bp)
GATGGGAAGAGCAGCTCTGAACTCC...	242	0.001%	TruSeq Adapter, Index 6 (98% over 50bp)
AGATGGGAAGAGCAGCTCTGAACTCC...	172	0.001%	TruSeq Adapter, Index 6 (97% over 48bp)
GATGGGAAGAGCAGCTCTGAACTCC...	111	0.000%	TruSeq Adapter, Index 6 (98% over 50bp)
AGATGGGAAGAGCAGCTCTGAACTCC...	102	0.000%	TruSeq Adapter, Index 6 (97% over 48bp)



CUI (コマンドユーザーインターフェース)なら

```
$ fastqc -h
```

```
FastQC - A high throughput sequence QC analysis tool
```

```
SYNOPSIS
```

```
fastqc seqfile1 seqfile2 .. seqfileN
```

```
fastqc [-o output dir] [--(no)extract] [-f fastq|bam|sam]  
      [-c contaminant file] seqfile1 .. seqfileN
```

gzファイルなら
--extract
の記載

実習 1 FASTQC

Local環境(ご自身のパソコン)で実行します

実習用ディレクトリ `~/gitc /data/5_ngs` に移動して 中を見る

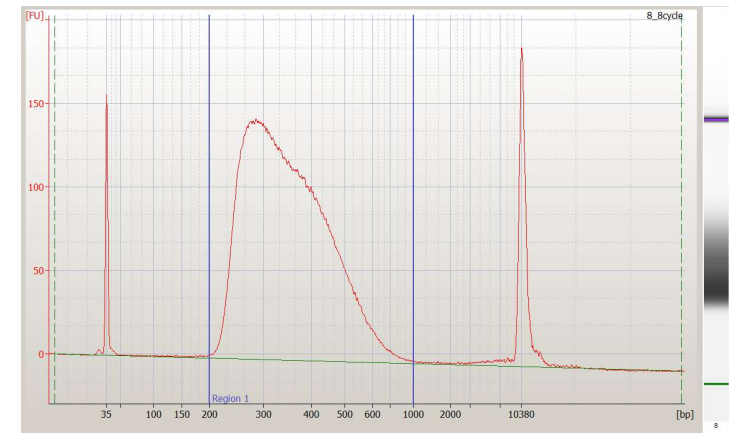
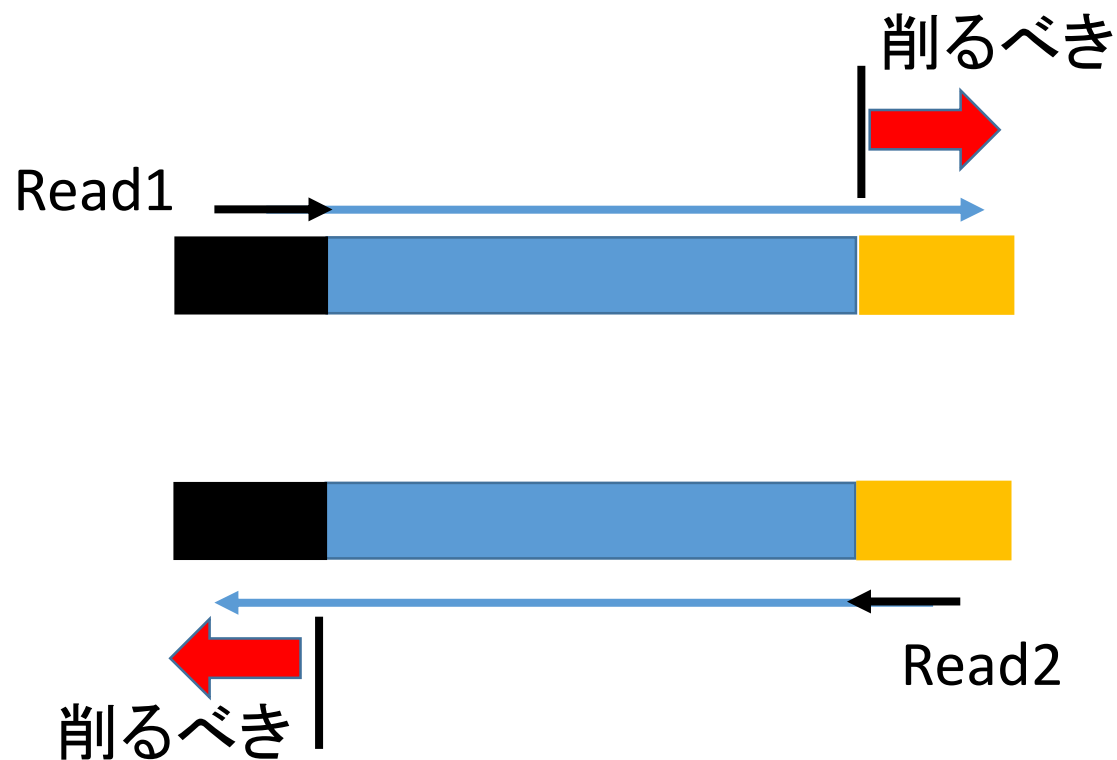
- read結果 `2D2L_rep1_R1.fastq`

のファイルがあることを確認

これをFASTQCに読み込ませて、クオリティーを確認しよう

NGSデータのPre-processingの必要性

- ・余計な配列(アダプター配列)がリファレンス配列へのmappingに影響
- ・余計な配列(アダプター配列)がゲノム配列と誤認されうる

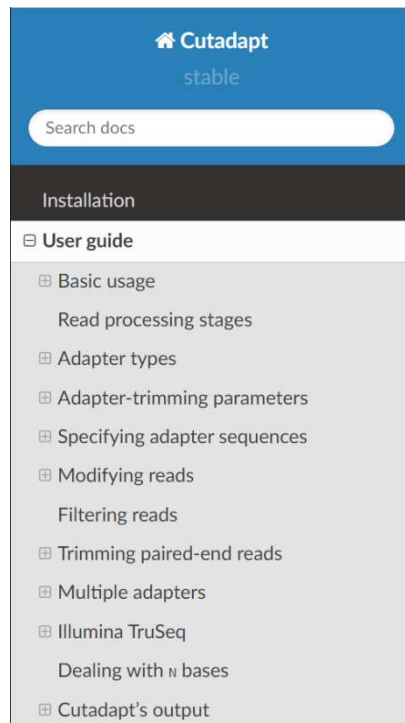


通常イルミナRNA-Seqライブラリーは200baseくらいの長さから存在するうち両端にアダプター63baseずつすなわち75base程度しかinsert配列がないライブラリーが存在する。

Pre-processing tools

- Cutadapt
 - Trimmomatic
 - fastp
 - etc
- adapter配列を除去
 - 一定クオリティー以下の部位を除去
 - 任意の配列部位を除去

生データを処理することで、アダプター配列を除去し、一定のクオリティーを確保したデータとなる



Docs » User guide

[Edit on GitHub](#)

User guide

Basic usage

To trim a 3' adapter, the basic command-line for Cutadapt is:

```
cutadapt -a AACCGGTT -o output.fastq input.fastq
```

The sequence of the adapter is given with the `-a` option. You need to replace `AACCGGTT` with the correct adapter sequence. Reads are read from the input file `input.fastq` and are written to the output file `output.fastq`.

Compressed in- and output files are also supported:

```
cutadapt -a AACCGGTT -o output.fastq.gz input.fastq.gz
```

Paired end readに対応
(ver. 1.8以降)

片方のreadが非常に
短くしか残らない場合、
pair read両方とも除去する。

<https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/guide.html>

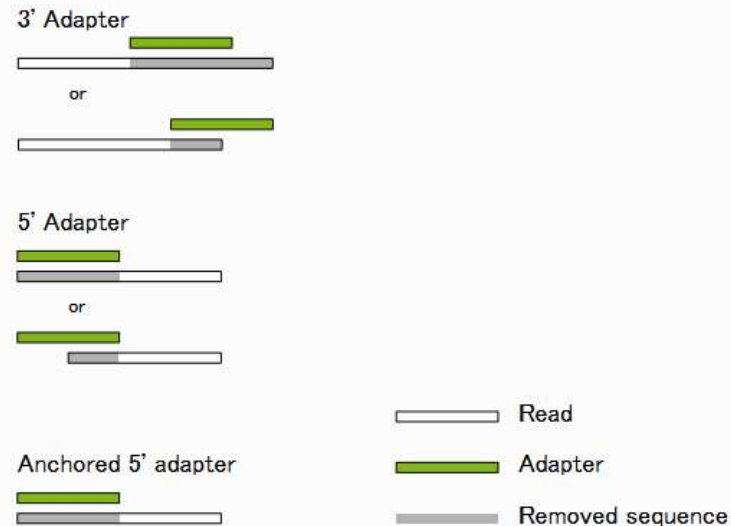
Cutadapt

Removing adapters

Cutadapt supports trimming of multiple types of adapters:

Adapter type	Command-line option
3' adapter	<code>-a ADAPTER</code>
5' adapter	<code>-g ADAPTER</code>
Anchored 3' adapter	<code>-a ADAPTER\$</code>
Anchored 5' adapter	<code>-g ^ADAPTER</code>
5' or 3' (both possible)	<code>-b ADAPTER</code>

Here is an illustration of the allowed adapter locations relative to the read and depending on the adapter type:



Cutしたいアダプター配列の
位置関係など詳細に指定可能

fastqファイルはgz圧縮してあってもよい
fastaファイルも可

最新versionではもっと、細かい条件の
指定が可能

```
$ cutadapt -h
cutadapt version 3.4
```

用いられるバージョンが確認できる

Copyright (C) 2010-2021 Marcel Martin <marcel.martin@scilifelab.se>

cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads.

Usage:

```
cutadapt -a ADAPTER [options] [-o output.fastq] input.fastq
```

For paired-end reads:

```
cutadapt -a ADAPT1 -A ADAPT2 [options] -o out1.fastq -p out2.fastq in1.fastq in2.fastq
```

その他、有用なパラメータ

-j --cores	使うCPU core数 defaultは1 0を指定しておくで自動検出
-q --quality-cutoff	クオリティーcutoffするQV値を指定
-m --minimum-length	指定する長さ以下にcutされたものはreadそのものを削除
-O --overlap	指定する配列とのオーバーラップを最小何baseとするか

crude_fastqフォルダーに生シーケンス配列
trim_fastqフォルダーにcutadaptにかけた配列
を用意してあります

Single readの場合

```
$ cutadapt ¥  
-a AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC ¥  
-o hoge_read1.cut.fastq ¥  
hoge_read1.fastq
```

Paired end readの場合

```
$ cutadapt ¥  
-a AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC ¥  
-A AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATC ¥  
-o hoge_read1.cut.fastq ¥  
-p hoge_read2.cut.fastq ¥  
hoge_read1.fastq ¥  
hoge_read2.fastq
```


実習 2 cutadapt

実習用ディレクトリ `~/gitc/data/5_ngs` に移動して `ls` で中を見る

```
$ cd ~/gitc/data/5_ngs
$ ls
```

- read結果 2D2L_rep1_R1.fastq

adapterがどの程度残っているか概算してみる

```
$ cat 2D2L_rep1_R1.fastq|grep 'AGATCGGAAGAGCAC'|wc
$ cat 2D2L_rep1_R1.fastq|wc
```

実際にcutadaptにかけて見よう

```
$ cutadapt ¥
-a AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC ¥
-o 2D2L_rep1_R1.fastq.cut.fastq ¥
2D2L_rep1_R1.fastq
```

発展) 圧縮されたQV値

fastqファイルに記載されるQV値は、近年のシーケンサーではストレージ容量削減の為、圧縮効率の良い圧縮されたqv値が用いられている。

この場合、quality valueの階調数が減らされているので、それを考慮して-q値を指定すべき。

圧縮されたQV値で表記されたfastq

```
@E00441:177:HHNWCCXY:6:1101:13433:25464 1:N:0:GTGTATTA
AATGTGCGTTTGTGTTGGGATAGGACATTTGTCAGCTACGCGCCGGCTCTCTGTGAAGTAATTGGTTGAATGAATAAA
+
AAFFFFJJJFF-AFAF7A<<FJJF<AFJJJJJ7<FJJJJF-7F-7FJJFJ-A-FFAFJF-FFJJA-FJAFJJ<AAFA
```

-	12	A	32
7	22	F	37
<	27	J	41

数が限定されている
-q 31と28を比較しても
同じことになる



Illumina White paper
Reducing Whole-Genome Data Storage Footprintより

NGS基本ツール

- Seqkit
- Bowtie2
- SAMtools

SeqKitを使って見よう

fasta/fastqに関する様々な操作が可能なツール



RESEARCH ARTICLE

SeqKit: A Cross-Platform and Ultrafast Toolkit for FASTA/Q File Manipulation

Wei Shen¹, Shuai Le¹, Yan Li^{2*}, Fuquan Hu^{1*}

1 Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, 30# Gaotanyan St., Shapingba District, Chongqing, China, **2** Medical Research Center, Southwest hospital, Third Military Medical University, 29# Gaotanyan St., Shapingba District, Chongqing, China

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0163962>

SeqKitで出来ること、類似ツールとの比較

Features comparison

Categories	Features	seqkit	fasta_utilities	fastx_toolkit	pyfaidx	seqmagick	seqtk
Formats support	Multi-line FASTA	Yes	Yes	--	Yes	Yes	Yes
	FASTQ	Yes	Yes	Yes	--	Yes	Yes
	Multi-line FASTQ	Yes	Yes	--	--	Yes	Yes
	Validating sequences	Yes	--	Yes	Yes	--	--
Functions	Supporting RNA	Yes	Yes	--	--	Yes	Yes
	Searching by motifs	Yes	Yes	--	--	Yes	--
	Sampling	Yes	--	--	--	Yes	Yes
	Extracting sub-sequence	Yes	Yes	--	Yes	Yes	Yes
	Removing duplicates	Yes	--	--	--	Partly	--
	Splitting	Yes	Yes	--	Partly	--	--
	Splitting by seq	Yes	--	Yes	Yes	--	--
	Shuffling	Yes	--	--	--	--	--
	Sorting	Yes	Yes	--	--	Yes	--
	Locating motifs	Yes	--	--	--	--	--
	Common sequences	Yes	--	--	--	--	--
	Cleaning bases	Yes	Yes	Yes	Yes	--	--
	Transcription	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	Translation	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	--
	Filtering by size	Yes	Yes	--	Yes	Yes	--
	Renaming header	Yes	Yes	--	--	Yes	Yes
Other features	Cross-platform	Yes	Partly	Partly	Yes	Yes	Yes
	Reading STDIN	Yes	Yes	Yes	--	Yes	Yes
	Reading gzipped file	Yes	Yes	--	--	Yes	Yes
	Writing gzip file	Yes	--	--	--	Yes	--

<https://bioinf.shenwei.me/seqkit/>

類似のツールと比較して、
より多くのコマンドが利用でき、
高速である。

gz圧縮にも対応している。

最新はv0.14.0

```
$ seqkit
SeqKit -- a cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation
```

Version: 0.16.1

Author: Wei Shen <shenwei356@gmail.com>

Documents : <http://bioinf.shenwei.me/seqkit>

Source code: <https://github.com/shenwei356/seqkit>

Please cite: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962>

Usage:

```
seqkit [command]
```

Available Commands:

amplicon	retrieve amplicon (or specific region around it) via primer(s)
bam	monitoring and online histograms of BAM record features
common	find common sequences of multiple files by id/name/sequence
concat	concatenate sequences with same ID from multiple files
convert	convert FASTQ quality encoding between Sanger, Solexa and Illumina
duplicate	duplicate sequences N times
faidx	create FASTA index file and extract subsequence
fish	look for short sequences in larger sequences using local alignment
fq2fa	convert FASTQ to FASTA
fx2tab	convert FASTA/Q to tabular format (with length/GC content/GC skew)
genautocomplete	generate shell autocompletion script (bash zsh fish powershell)
grep	search sequences by ID/name/sequence/sequence motifs, mismatch allowed
head	print first N FASTA/Q records
head-genome	print sequences of the first genome with common prefixes in name
help	Help about any command
locate	locate subsequences/motifs, mismatch allowed
mutate	edit sequence (point mutation, insertion, deletion)
pair	match up paired-end reads from two fastq files
range	print FASTA/Q records in a range (start:end)
rename	rename duplicated IDs
replace	replace name/sequence by regular expression
restart	reset start position for circular genome
rmdup	remove duplicated sequences by id/name/sequence
sample	sample sequences by number or proportion
sana	sanitize broken single line fastq files
scat	real time recursive concatenation and streaming of fastx files
seq	transform sequences (reverse, complement, extract ID...)
shuffle	shuffle sequences
sliding	sliding sequences, circular genome supported
sort	sort sequences by id/name/sequence/length
split	split sequences into files by id/seq region/size/parts (mainly for FASTA)
split2	split sequences into files by size/parts (FASTA, PE/SE FASTQ)
stats	simple statistics of FASTA/Q files
subseq	get subsequences by region/gtf/bed, including flanking sequences
tab2fx	convert tabular format to FASTA/Q format
translate	translate DNA/RNA to protein sequence (supporting ambiguous bases)
version	print version information and check for update
watch	monitoring and online histograms of sequence features

seqkitと打つとサブコマンドリストが出る
サブコマンドリストまで打って-hで、
その使い方や説明

Seqkitコマンド例

fastq/fastqファイルのstatisticsを見る

```
$ seqkit stats hoge.fastq
```

fastqファイルからfastaファイルに変換する

```
$ seqkit fq2fa hoge.fastq > hoge.fasta
```

fastq/fastqファイルを複数のファイルに分割する

```
seqkit split -p 2 hoge.fastq
```

fastq/fastqファイルから一部のsamplingする

-nで指定する数は厳密なsampling数とは合致しないので注意

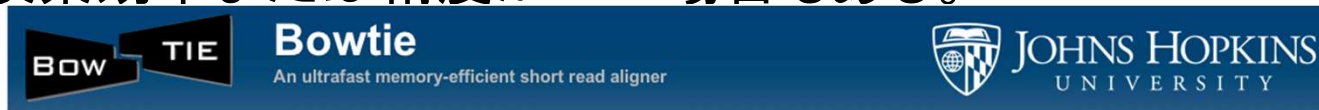
```
$seqkit sample -n 100 hoge.fastq > hoge_100.fastq
```

fastq/fastqファイルのread順番をシャッフルする

```
$ seqkit shuffle hoge.fastq > shf_hoge.fastq
```

Bowtieを使って見よう

- Burrows-Wheeler 変換に基づくインデックスを利用したショートリードのマッピングプログラム
- BowtieとBowtie2がある。後者はギャップを考慮した検索を行い、感度がより高い。また、検索の方針が単純化されて分かりやすくなるなど、多くの点で改良されている。
- シーケンスのリード長が長い(50bp以上)時はBowtie2の方が一般に検索効率がよく、精度も高い。リード長が短い(50bp未満)時はBowtieの方が検索効率または精度がいい場合もある。



Bowtie is an ultrafast, memory-efficient short read aligner. It aligns short DNA sequences (reads) to the human genome at a rate of over 25 million 35-bp reads per hour. Bowtie indexes the genome with a Burrows-Wheeler index to keep its memory footprint small: typically about 2.2 GB for the human genome (2.9 GB for paired-end).



<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>



Bowtie 2 is an ultrafast and memory-efficient tool for aligning sequencing reads to long reference sequences. It is particularly good at aligning reads of about 50 up to 100s or 1,000s of characters, and particularly good at aligning to relatively long (e.g. mammalian) genomes. Bowtie 2 indexes the genome with an FM Index to keep its memory footprint small: for the human genome, its memory footprint is typically around 3.2 GB. Bowtie 2 supports gapped, local, and paired-end alignment modes.

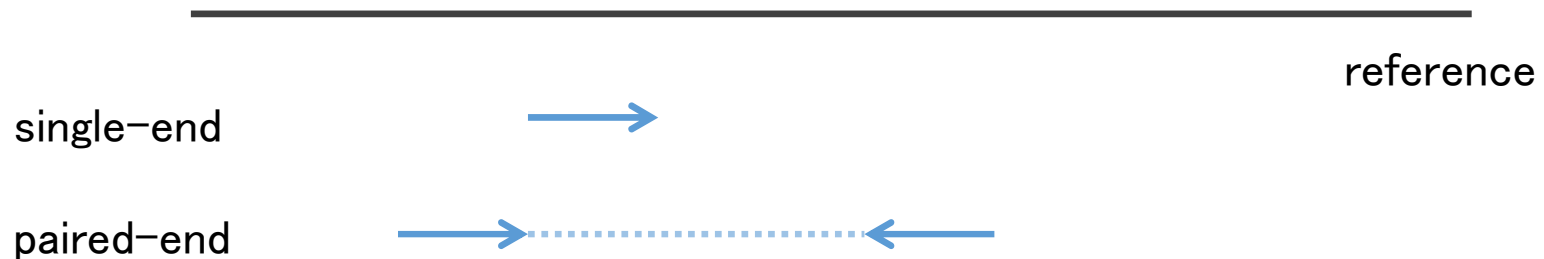


<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/manual.shtml>

リファレンス配列へのマッピング

Bowtie, BWA, SOAP など

- 長大なリファレンス配列に、大量の短いリード配列を若干のミスマッチを許して照合する
- リファレンス配列に対して、あらかじめ全文検索インデックスを作成することにより高速に検索を行う
- paired-end read に対応。



インデックスとは



辞書における
インデックスタブ

- 索引、目次、見出し
- ファイルのどの辺りに何が書いてあるかの指標
- インデックスを作成すると別ファイルができるのは、分厚い本の「別冊目次」ができるイメージ
- 欲しい情報を探すのにファイル(本)を先頭から総ナメして探さなくてもよい

NGSリファレンス配列のインデックスを作成 bowtie2-build

bowtie2-build リファレンス配列ファイル インデックス名

- 実行すると、インデックスとして、
 - ✓ インデックス名.n.bt2 (n=1-4)
 - ✓ インデックス名.rev.m.bt2 (m=1-2)の、計6つのファイルが作成される
- 配列ファイルはカンマで区切って複数を指定可能

実習 4 bowtie2-build

実習用ディレクトリ `~/gitc/data/5_ngs` に移動して `ls` で中を見る

```
$ cd  
~/gitc/data/5_ngs  
$ ls
```

- リファレンス用ゲノムデータ(FASTA形式) `ecoli_genome.fa`
- bowtie2用インデックスの作成(インデックス名: `eco`)

```
$ bowtie2-build ecoli_genome.fa eco
```

- インデックスから元の配列データを再構築

```
$ bowtie2-inspect eco | less
```

NGSマッピングの実行 bowtie2

- マッピングの実行

- ✓ single-end read の場合

```
bowtie2 -x インデックス名 -U リードファイル -S 出力ファイル
```

- ✓ paired-end read の場合

```
bowtie2 -x インデックス名 -1 リードファイル1  
-2 リードファイル2 -S 出力ファイル
```

(実際は改行せずに1行で打つ)

- リードファイルはカンマ区切りで複数を指定可能

実習 5 bowtie2

- リード配列 (FASTQ 形式, single-end read)
ecoli.fastq

リファレンス配列のインデックス名 (実習4で作ったもの)
eco

- bowtie2の実行

```
$ bowtie2 -x eco -U ecoli.fastq -S eco_bowtie2.sam
```

マッピング結果: SAMフォーマットファイル

```
$ less -S eco_bowtie2.sam
```

```
@HD VN:1.3 SO:coordinate
@SQ SN:ref LN:45
r001 163 chr1 7 30 8M2I4M1D3M = 37 39 TTAGATAAAGGATACTG *
r002 0 chr1 9 30 3S6M1P1I4M * 0 0 AAAAGATAAGGATA *
r003 0 chr1 9 30 5H6M * 0 0 AGCTAA * NM:i:1
r004 0 chr1 16 30 6M14N5M * 0 0 ATAGCTTCAGC *
r003 16 chr1 29 30 6H5M * 0 0 TAGGC * NM:i:0
r001 83 chr1 37 30 M = 7 -39 CAGCGCCAT *
```

テンプレート名

フラグ

マップ結果

アライメント
(CIGAR)

対となるリード
の位置情報

リードの配列

オプション

Bowtie2: その他のオプション

- -h ヘルプを表示する
- -a 全てのアライメントを表示する
- -p 整数 指定した数のCPUコアを使って実行する
- -f リードがFASTA形式のファイルである

- 他、Bowtie2 マニュアル詳細

<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/manual.shtml>

Samtoolsを使って見よう

Samtools

HomeDownloadWorkflowsDocumentationSupport


Samtools

SAM<->BAM等の変換、データのソート、検索付け、
特定readの抽出、統計情報収集などができる

Samtools is a suite of programs for interacting with high-throughput sequencing data. It consists of three separate repositories:

Samtools	Reading/writing/editing/indexing/viewing SAM/BAM/CRAM format
BCFtools	Reading/writing BCF2/VCF/gVCF files and calling/filtering/summarising SNP and short indel sequence variants
HTSlib	A C library for reading/writing high-throughput sequencing data


Samtools and BCFtools both use HTSlib internally, but these source packages contain their own copies of htslib so they can be built independently.



Download

Source code releases can be downloaded from [GitHub](#) or [Sourceforge](#):


Source release details



Workflows


We have described some standard workflows using Samtools:

- WGS/WES Mapping to Variant Calls
- Using CRAM within Samtools



Documentation

- Manuals
- HowTos
- Specifications
- Duplicate Marking
- Zlib Benchmarks
- CRAM Benchmarks
- Publications



Support

- Mailing Lists
- HTSlib issues
- BCFtools issues
- Samtools issues

<http://www.htslib.org/>

現行の最新はv1.13

バージョンによってオプションの与え方が変わっているコマンドに注意

NGSデータを扱うための最も基盤となるツール

Samtoolsの起動

```
$ samtools
```

```
samtools
Program: samtools (Tools for alignments in the SAM format)
Version: 1.11 (using htslib 1.11)

Usage:  samtools <command> [options]

Commands:
  -- Indexing
    dict          create a sequence dictionary file
    faidx         index/extract FASTA
    fqidx         index/extract FASTQ
    index         index alignment
  -- Editing
    calmd         recalculate MD/NM tags and '=' bases
    fixmate       fix mate information
    reheader      replace BAM header
    targetcut     cut fosmid regions (for fosmid pool only)
    addreplacerg  adds or replaces RG tags
    markdup       mark duplicates
    ampliconclip  clip oligos from the end of reads
  -- File operations
    collate       shuffle and group alignments by name
    cat           concatenate BAMs
    merge         merge sorted alignments
    mpileup       multi-way pileup
    sort          sort alignment file
    split         splits a file by read group
    quickcheck    quickly check if SAM/BAM/CRAM file appears intact
    fastq         converts a BAM to a FASTQ
    fasta         converts a BAM to a FASTA
  -- Statistics
    bedcov        read depth per BED region
    coverage      alignment depth and percent coverage
    depth         compute the depth
    flagstat      simple stats
    idxstats      BAM index stats
    phase         phase heterozygotes
    stats         generate stats (former bamcheck)
    ampliconstats generate amplicon specific stats
  -- Viewing
    flags         explain BAM flags
    tview         text alignment viewer
    view          SAM<->BAM<->CRAM conversion
    depad         convert padded BAM to unpadded BAM
```

オプション/引数
なしで起動すると
Samtools の基本的な
使い方が表示される

実習しながら
進めます

Samtools の起動: コマンド簡易マニュアル

基本的な使い方: `$ samtools command options`

`$ samtools view`

Usage: `samtools view [options] <in.bam>|<in.sam>|<in.cram> [region ...]`

Options:

```
-b          output BAM
-C          output CRAM (requires -T)
-l          use fast BAM compression (implies -b)
-u          uncompressed BAM output (implies -b)
-h          include header in SAM output
-H          print SAM header only (no alignments)
-c          print only the count of matching records
-o FILE     output file name [stdout]
-U FILE     output reads not selected by filters to FILE [null]
-t FILE     FILE listing reference names and lengths (see long help) [null]
-L FILE     only include reads overlapping this BED FILE [null]
-r STR      only include reads in read group STR [null]
-R FILE     only include reads with read group listed in FILE [null]
-q INT      only include reads with mapping quality >= INT [0]
-l STR      only include reads in library STR [null]
-m INT      only include reads with number of CIGAR operations consuming
             query sequence >= INT [0]
-f INT      only include reads with all of the FLAGS in INT present [0]
-F INT      only include reads with none of the FLAGS in INT present [0]
-G INT      only EXCLUDE reads with all of the FLAGS in INT present [0]
-s FLOAT    subsample reads (given INT.FRAC option value, 0.FRAC is the
             fraction of templates/read pairs to keep; INT part sets seed)
```

:
:

- コマンドを付けてオプション無しで実行するとそのコマンドのマニュアルが表示される
- 詳細は <http://www.htslib.org/doc/samtools.html> を参照のこと

SAM/BAM変換

`samtools view options...`

- SAMファイルからBAMファイルの作成

```
$ samtools view -bS eco_bowtie2.sam -o eco_bowtie2.bam
```

- BAMをSAMに変換して less コマンドで表示

```
$ samtools view eco_bowtie2.bam | less
```

- BAMファイルを less で読もうとすると...?

```
$ less eco_bowtie2.bam
```

- SAMファイルに比べてBAMファイルのサイズは？

```
$ ls -l eco_bowtie2.*
```

Samtoolsによるsort

samtools sort *options...*

```
$ samtools sort
```

```
Usage: samtools sort [options...] [in.bam]
```

```
Options:
```

```
-l INT      Set compression level, from 0 (uncompressed) to 9 (best)
-m INT      Set maximum memory per thread; suffix K/M/G recognized [768M]
-n          Sort by read name
-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
  --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]
```

マッピングデータをリファレンス配列上の位置順に並び替える

これをしないとindexを付けられない

BAM ファイルのソート

samtools sort *options...*

```
$ samtools sort eco_bowtie2.bam -o  
eco_bowtie2_sorted.bam
```

- samからの直接変換も可能（v1.3以降）

```
$ samtools sort eco_bowtie2.sam -o  
eco_bowtie2_sorted.bam
```

- ソートされたBAMファイルをSAMに変換してlessで表示

```
$ samtools view eco_bowtie2_sorted.bam | less
```

- 元のSAMファイルの表示と比較してみよう

```
$ less eco_bowtie2.sam
```

BAMファイルにインデックスを付ける

`samtools index options...`

- 先にソートされている必要がある
- インデックスは .bai という拡張子付きの別ファイルで生成される。
- 「bamファイル名.bai」が作成されたのを ls コマンドで確認

```
$ samtools index eco_bowtie2_sorted.bam
```

```
$ ls eco_bowtie2_sorted*
```

ここから先はソート & インデックス付与したbamファイルを使う

ソート & インデックス付与したbamファイルを使って

指定した領域内のマッピング結果を表示

```
$ samtools view eco_bowtie2_sorted.bam chr:200-500
```



染色体名:開始位置 - 終了位置

マッピング統計情報収集 1

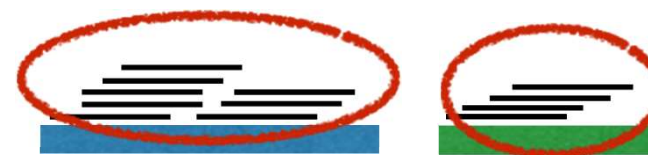
samtools idxstats *options...*

- 染色体毎にマップされたリード数を得る

```
$ samtools idxstats eco_bowtie2_sorted.bam
```

染色体名	染色体配列長	マップされた リード数	片側のみマップさ れたリード数
chr	4639675	326754	0
*	0	0	3364

マップされなかったリード数
染色体名が '*' として表示される



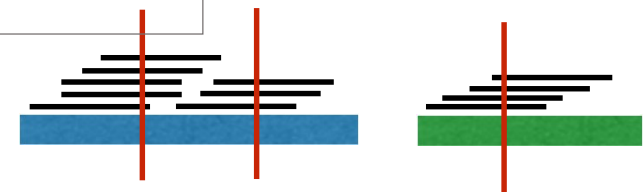
マッピング統計情報収集 2

samtools depth options...

- 深度(マップされた回数)の統計情報を得る

```
$ samtools depth eco_bowtie2_sorted.bam
```

染色体名	位置	深度(マップされた回数)
chr	2753929	1533
chr	2753930	1470
chr	2753931	1446
chr	2753932	1101
chr	2753933	922
chr	2753934	918



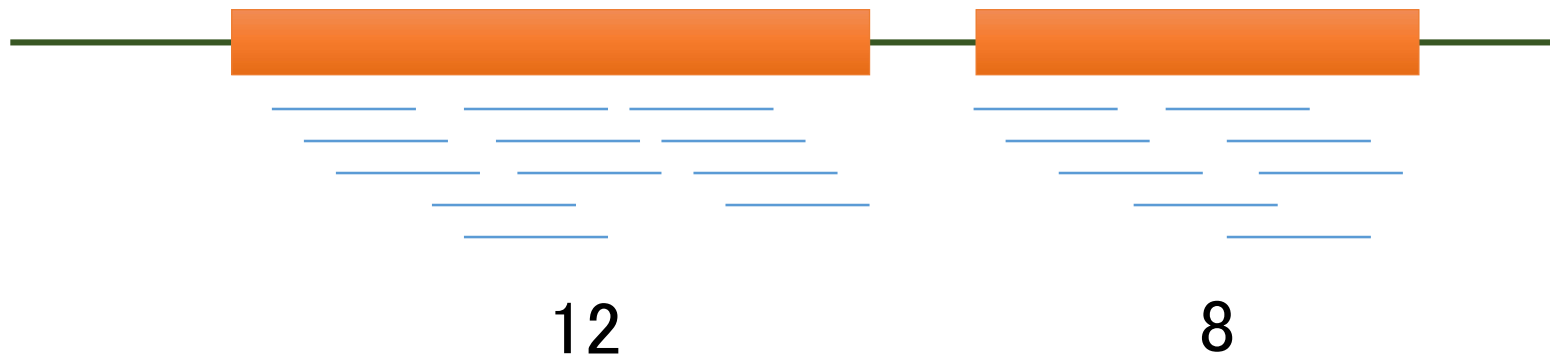
紹介したSamtools コマンドまとめ

samtools

view	リードを抽出, SAM/BAM変換
sort	ソート
index	.bamのインデックス作成
idxstats	染色体毎のマッピング状況
depth	位置毎のマッピング深度

RNA-Seq解析に向けて

- ゲノム上にマッピングされたリードを遺伝子領域ごとに集めて数をカウント



通常、カウントした数を遺伝子の長さ、およびマップされたリード全体の数で割って標準化する

RPKM (Read Per Kilobase per Million mapped reads)

FPKM (Fragment Per Kilobase per Million mapped reads)

統計解析を含めた内容は「RNA-seq入門」で

今回使ったツール・ファイルのまとめ

SeqKit

ゲノム(リファレンス)配列
FASTAファイル

```
>chr
AGCTTTTTCATTCIGACTGCAACGGCCAAATATGTCI
CTGIGTGGATTAAAAAGAGIGTCTGATACAGC
TTCTGAACIGTATACCTGCGGAGTAAATTTAAA
TTTTATTCACITAGGTCACATAATACITTTAACAA
TATAGGCATAGCGCACACAGTAAAAATTTACG
AGTACCAACATCCATGAACGCATTAGCACACC
```

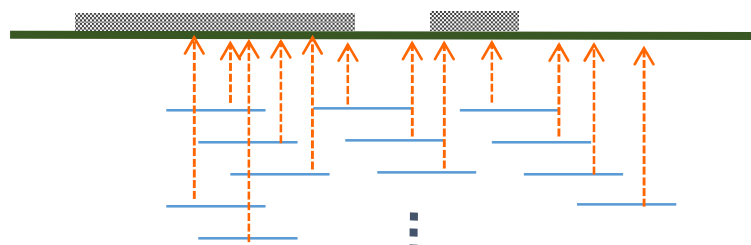
サンプルリード(ゲノム DNA/RNA)
FASTQファイル(配列+クオリティ)

```
@SRR1515276.1 HMI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3625:88631 length=51
ATCCGCTGGCGACCGACTATGTTCCGCGCAATACAGCTGGGCAAG
+SRR1515276.1 HMI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3625:88631 length=51
@@@AD-DDFF7DC?FFFFF@DFTI<DFAAAGAEFFBDC?>A?B>B::
@SRR1515276.2 HMI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3871:88513 length=51
CACCGTGTAGTACAGCATCTGCTACATCAGCAATCCAGTCTCCCC
+SRR1515276.2 HMI-ST808:151:D2D13ACXX:2:1207:3871:88513 length=51
CCCFDEDEHDFHLLTGHUUUGFHGGHGGGLUDGLJHGGGH
```

インデックス作成

bowtie2-build

リファレンス配列へのマッピング



bowtie2

遺伝子アノテーション GFF(GTF)ファイル

```
chr RefSeq start codon 190 192 1.000 + . gene_id "b0001"; transcript_id "b0001";
chr RefSeq CDS 190 252 1.000 + 0 gene_id "b0001"; transcript_id "b0001";
chr RefSeq stop_codon 253 255 1.000 + . gene_id "b0001"; transcript_id "b0001";
chr RefSeq exon 190 255 1.000 + . gene_id "b0001"; transcript>
```

遺伝子ごとの集計

RNA-seq入門にて

b0001	11
b0002	117
b0003	36

マッピング結果 SAM ファイル

```
@HD      VN:1.0      SO:unsorted
@SQ      SN:chr      IN:4639675
@PG      ID:bowtie2  FN:bowtie2  VN:2.2.4  CL:"/bio/bin/bowtie2-align
SRR1515276.40 0 chr 4423609 42 51M * 0 0 GGATTTCTCCTGCA
SRR1515276.158 16 chr 501700 42 51M * 0 0 ACCGACGAGTCAAG
SRR1515276.212 4 * 0 0 * * 0 0 GCGCGCTTCAGGCT
SRR1515276.319 0 chr 2922768 42 51M * 0 0 GCTTACGTTGATTAGG
SRR1515276.367 16 chr 2753873 42 51M * 0 0 GCGTTCGCTCGGAC
SRR1515276.411 0 chr 3440721 42 51M * 0 0 ACCGATATTTCTGA
SRR1515276.434 0 chr 4198737 42 51M * 0 0 GCGGTACGATCTGG
```

samtools

BAMファイル

並べ替え

検索

ゲノムブラウザへ