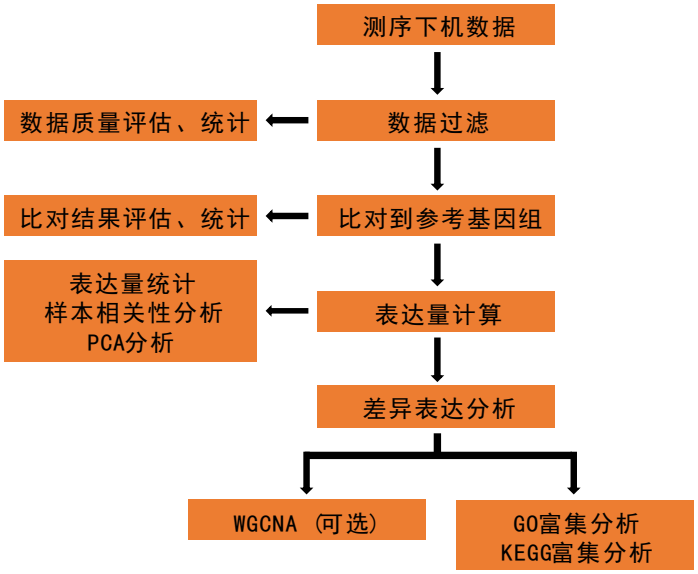
转录组分析流程

Written by 王鹏飞

Email: wangpf0608@126.com

一 分析流程图



二 分析流程及结果

1 取样、mRNA 提取、建库及测序

参考公司报告。

2 数据过滤

使用 fastp[1]（v0.20.0）对 raw data 进行过滤得到 clean data。统计过滤前后 total bases、total reads、Q30、Q20、GC content 以及有效数据比率（data_stat.csv/txt），同时使用 FastQC（v0.11.9）对过滤前后的数据进行质量评估（QC/sample_fastqc.html）。

3 比对到参考基因组

使用 HISAT2[2]（v2.1.0）将 clean reads 比对到参考基因组上，得到 SAM（Sequence Alignment/Map）格式文件，然后使用 SAMtools 对比对结果（SAM 文件）按照染色体和位置进行排序并转换为 BAM（Binary Alignment/Map）格式文件[3]，可以将 BAM 文件导入 IGV（Integrative Genomics Viewer）[4]对比对结果进行可视化。HISAT2 可以使用更少资源的同时具有更快的速度，HISAT2 比对时，对于非链特异性文库使用默认参数，链特异性文库需要指定文库类型（first 使用--rna-strandness RF，second 使用--rna-strandness FR）。比对完成后，我们对比对结果进行评估，统计比对率和唯一比对率。

4 表达量计算

根据比对结果（BAM 文件），我们使用 R（v4.0.2）软件的扩展包 Rsubread[5]（v2.2.6）中的 featureCounts 函数计算每个基因的表达量（read count）并进行归一化处理（normalization），得到 TPM（Transcripts Per Kilobase of exon model per Million mapped reads）和 TMM（trimmed mean of M value）表达矩阵。

5 差异表达分析

根据基因表达矩阵（read count）文件，在有生物学重复的情况下，使用 R（v4.0.2）软件的扩展包 DESeq2[6]（v1.28.1）进行差异表达分析，在没有生物学重复的情况下，则使用 R 扩展包 edgeR[7]（v3.30.3）进行差异表达分析，并推荐测生物学重复，也不算太贵。对于 log2FoldChange 绝对值大于 1，并且 padj 小于 0.05 的基因则认为是差异表达基因（阈值需根据实际情况做出调整）。

6 功能富集分析

根据筛选出的差异表达基因，我们使用 R（v4.0.2）软件的扩展包 clusterProfiler[8]（v3.16.1）依据超几何分布检验来完成 GO 和 KEGG 富集分析（Over-representation analysis），设置参数 pvalueCutoff 和 qvalueCutoff 为 0.05 筛选显著富集的 GO/KEGG term。在绘图时，如果 GO 或 KEGG 的 term 太多（一般是 GO），建议取前 10 或 15 个 term（GO 中 CC、BP 和 MF 各选 10 或 15 各）进行绘图，如果相关 term 不在前 10 或 15 个内，也可以手动添加。

7 WGCNA

加权基因共表达网络分析（WGCNA，Weighted correlation network analysis）可以

用来鉴定样本间高度协同变化的基因集（模块），同时可以根据模块特征值（eigengene）将模块与外部性状信息相关联，以此鉴定与性状相关的模块并进一步挖掘关键基因[9,10]。进行 WGCNA 至少需要 15 个样本，最好是 20 个及以上。在这里我们筛选差异表达基因使用 R（v4.0.2）软件的扩展包 WGCNA[10]（v1.69）进行基因模块的构建以及模块-样本、模块-形状的关联（其中各步骤参数均需根据实际情况决定）。

参考文献

1 Shifu Chen, Yanqing Zhou, Yaru Chen, Jia Gu. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17).

2 Daehwan Kim, Joseph M. Paggi, Chanhee Park, Christopher Bennett, Steven L. Salzberg. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype[J]. Nature Biotechnology: The Science and Business of Biotechnology, 2019, 37(8).

3 Li Heng, Handsaker Bob, Wysoker Alec, Fennell Tim, Ruan Jue, Homer Nils, Marth Gabor, Abecasis Goncalo, Durbin Richard. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.[J]. Bioinformatics (Oxford, England), 2009, 25(16).

4 Robinson James T, Thorvaldsdóttir Helga, Winckler Wendy, Guttman Mitchell, Lander Eric S, Getz Gad, Mesirov Jill P. Integrative genomics viewer.[J]. Nature biotechnology, 2011, 29(1).

5 Liao Yang, Smyth Gordon K, Shi Wei. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads[J]. Narnia, 2019, 47(8).

6 Michael I Love, Wolfgang Huber, Simon Anders. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014, 15(12).

7 Mark D. Robinson, Davis J. McCarthy, Gordon K. Smyth. edgeR : a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. Bioinformatics, 2010, 26(1).

8 Yu Guangchuang, Wang Li-Gen, Han Yanyan, He Qing-Yu. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters.[J]. Omics : a journal of integrative biology, 2012, 16(5).

9 Bin Zhang, Steve Horvath. A General Framework for Weighted Gene Co-

Expression Network Analysis[J]. Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology, 2005,4(1).

10 Peter Langfelder, Steve Horvath. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis[J]. BMC Bioinformatics, 2008, 9(2).