Коррекция ошибок в ридах

Алгоритмы в биоинформатике

Мелешко Дмитрий
meleshko.dmitrii@gmail.com

Что было в прошлом модуле

- Сравнение двух последовательностей: расстояния, глобальное и локальное выравнивания, штрафы за гэпы, эффективное использование памяти
- Поиск специфичных участков генома при помощи HMM
- Сравнение многих последовательностей между собой и одной последовательности со многими
- Выравнивание на референсный геном (BWT, BWA)
- Перестройки в геноме, синтенные

Что будет в этом модуле

- Секвенирование! NGS данные. Артефакты и важная информация.
- Сборка генома из коротких прочтений.
- Сборка многих геномов. Метагеном, гаплотипы и связанные задачи.
- Эволюция и ее параметры. Зачем нужны вероятностные модели?
- Вторичная структура РНК

В этой лекции

- Методы секвенирования
- Секвенирование как случайный процесс
- Ошибки секвенирования
- Способы отбрасывать риды с ошибками
- Способы коррекции ошибок

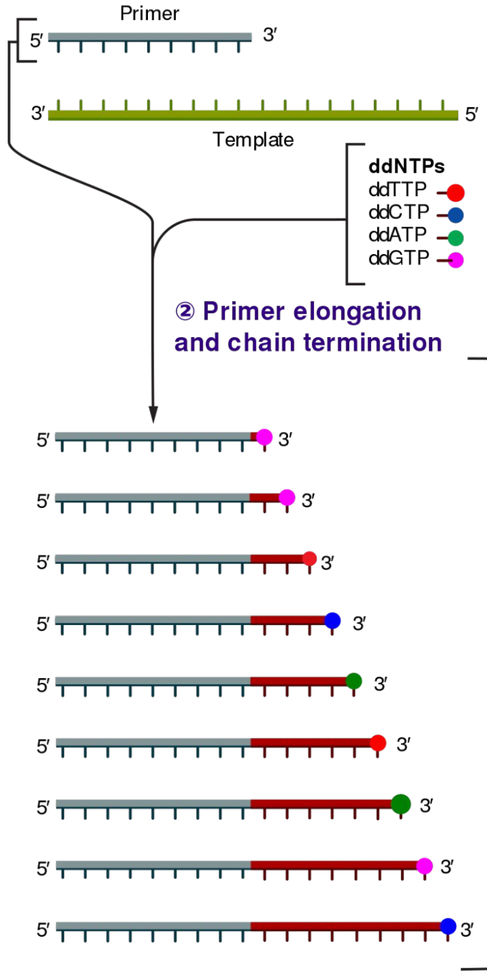
Технологии секвенирования

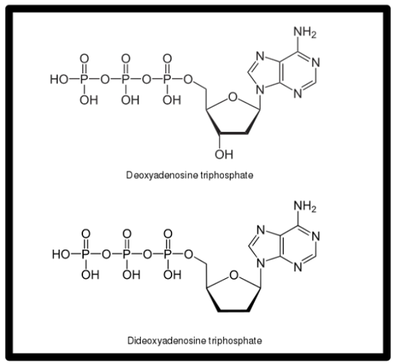
Технологии секвенирования

- Sanger
- Illumina/MGI
- Nanopore
- PacBio
- 10X Genomics/stLFR

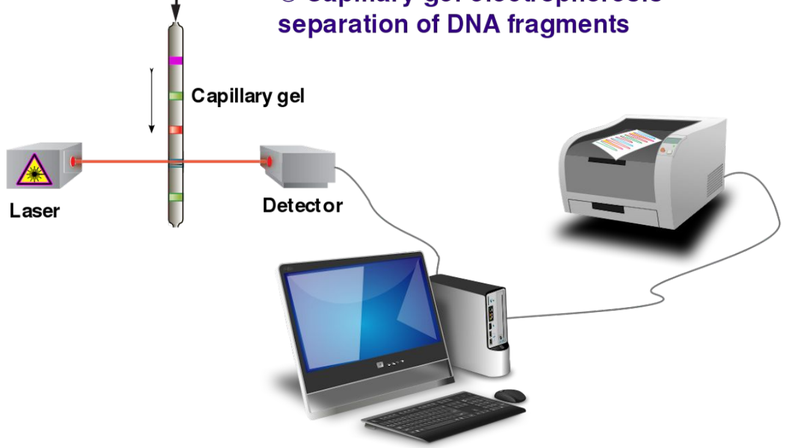
Технологии: Sanger

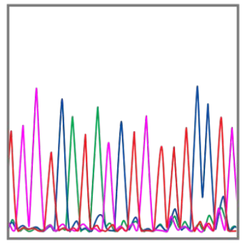
① Reaction mixture
- Primer and DNA template
- DNA polymerase
- ddNTPs with flourochromes
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)





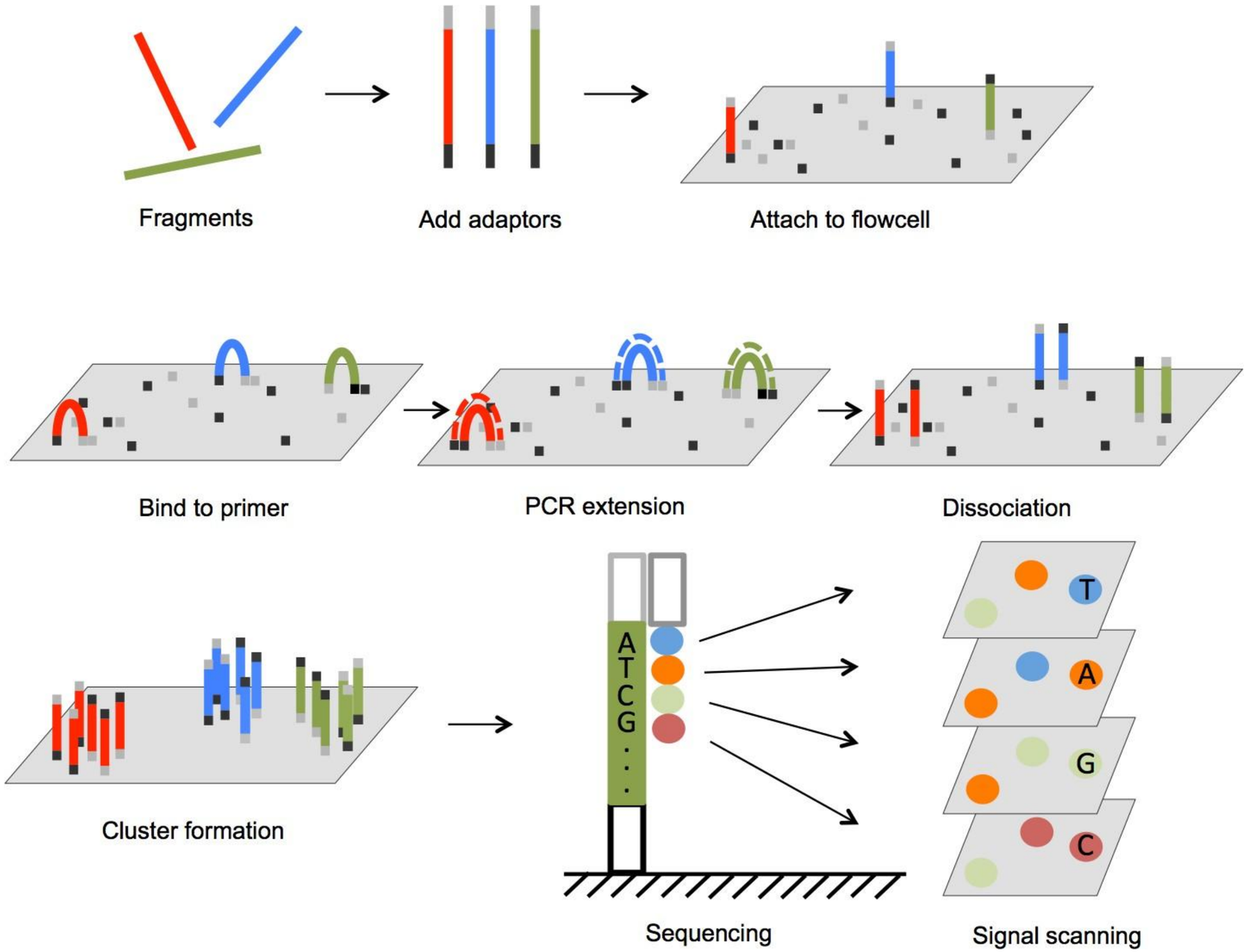
③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments



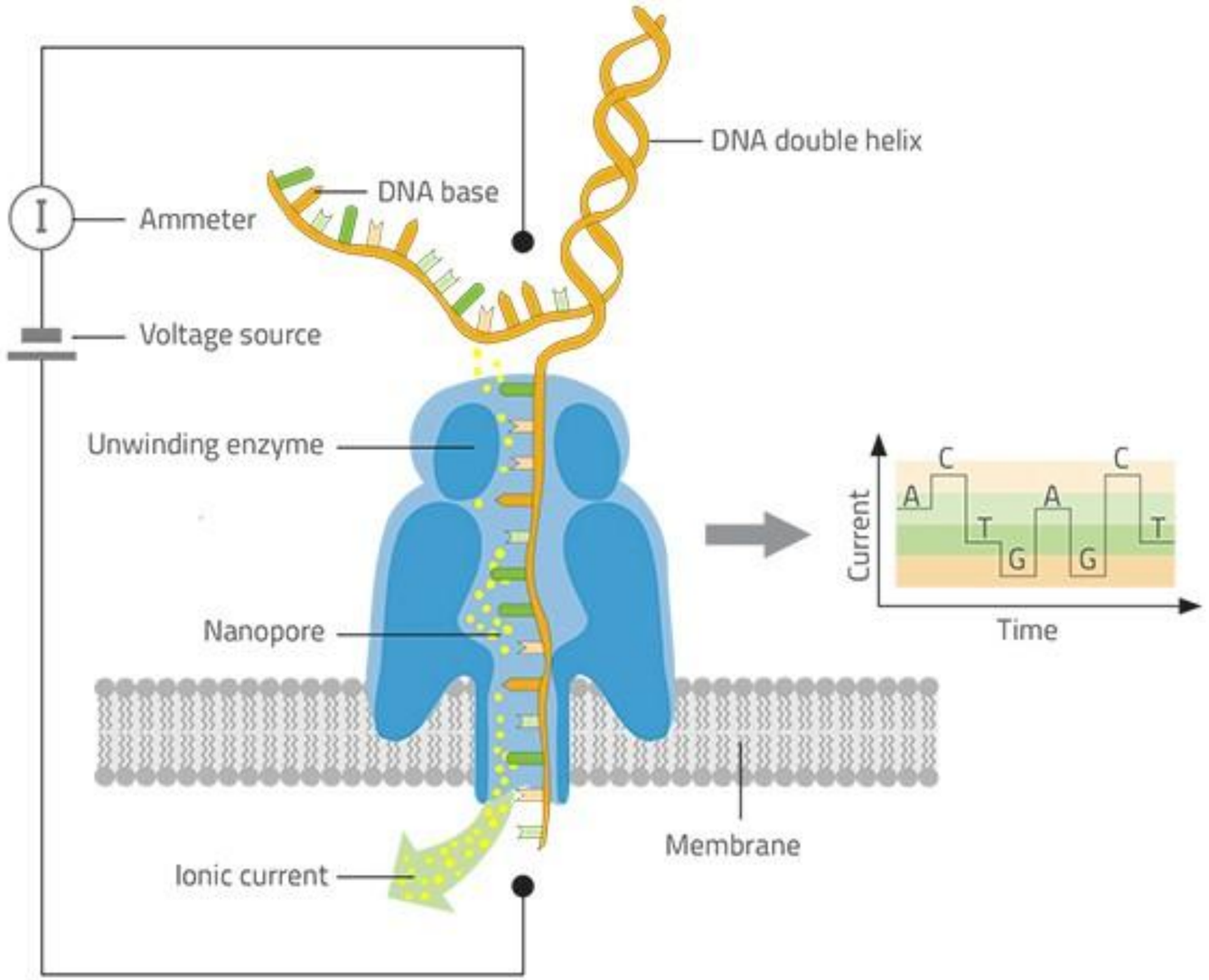


④ Laser detection of flourochromes and computational sequence analysis

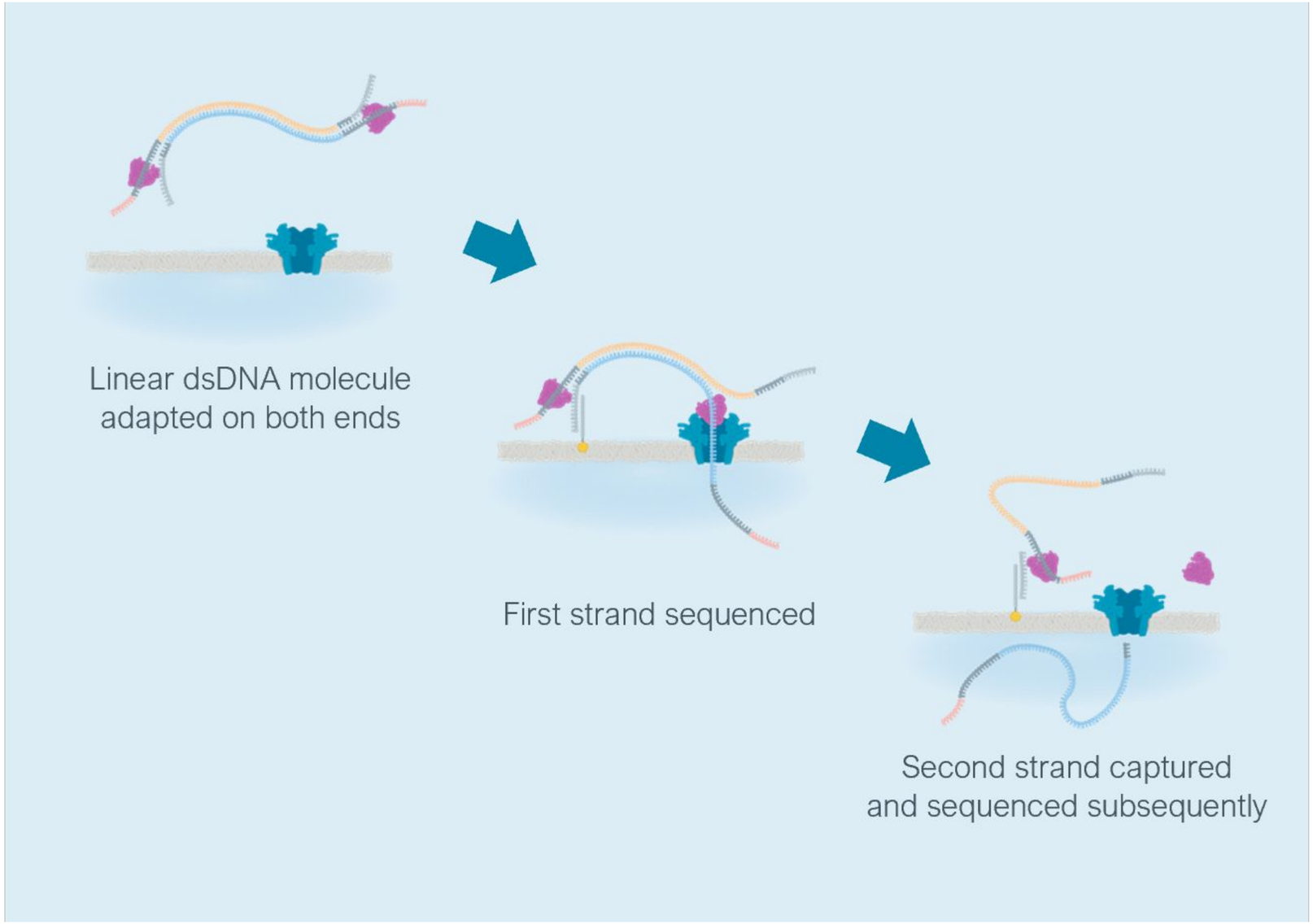
Технологии: Illumina



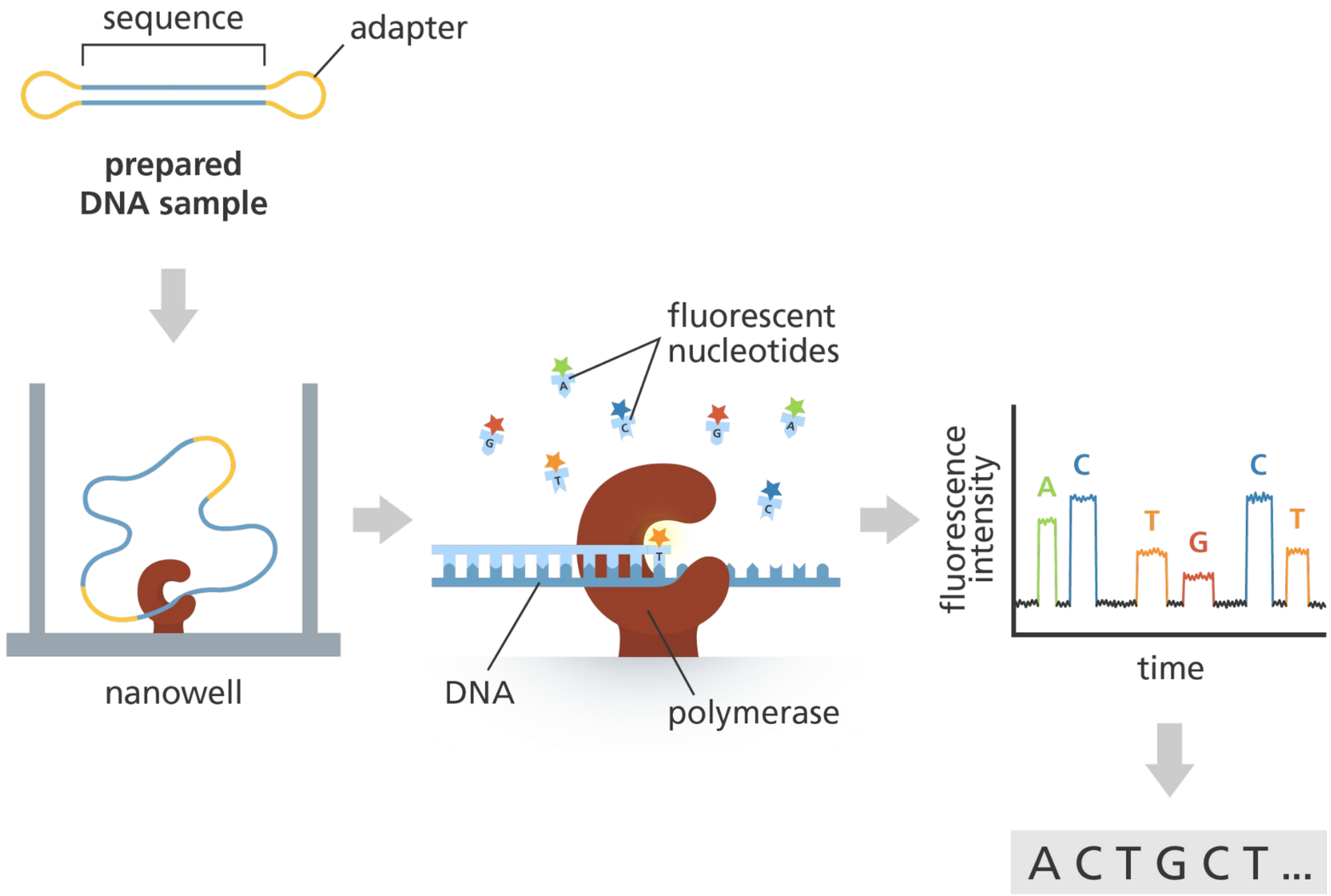
Технологии: Nanopore



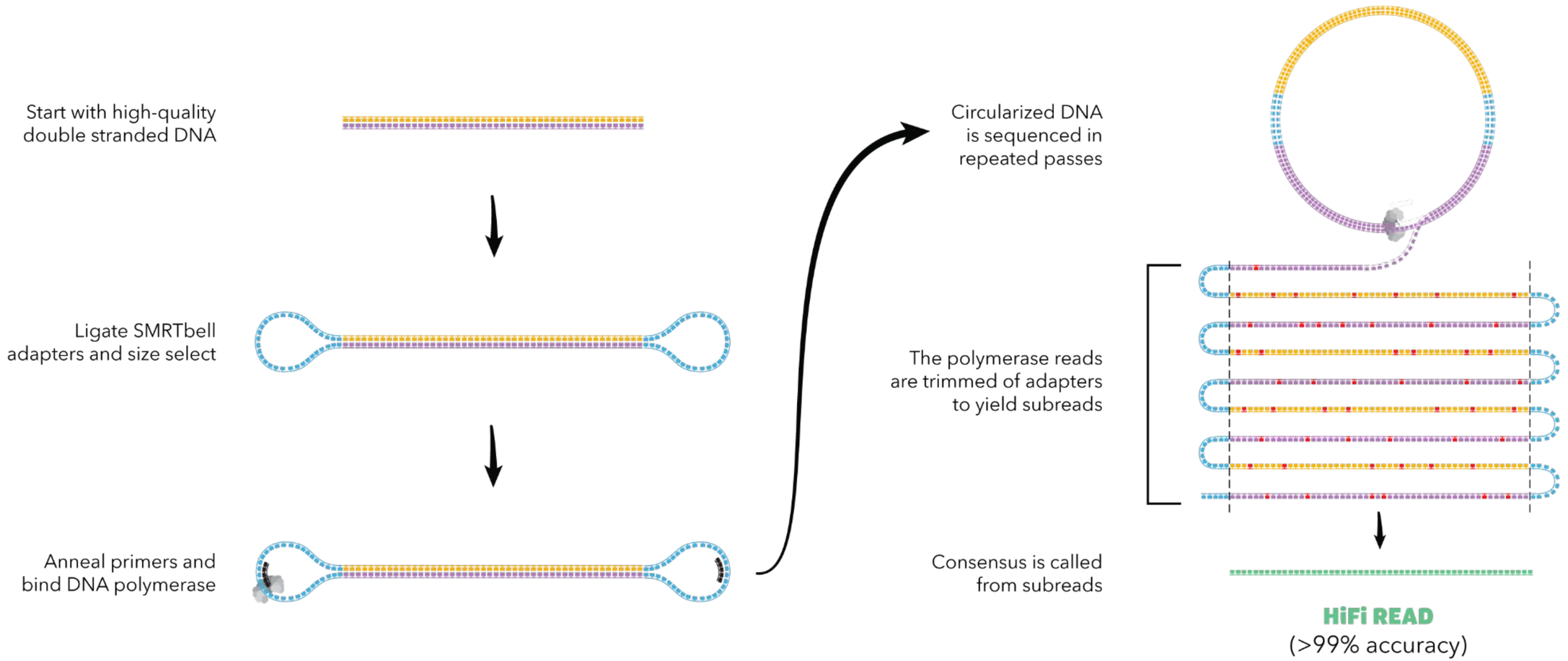
Технологии: Nanopore Duplex



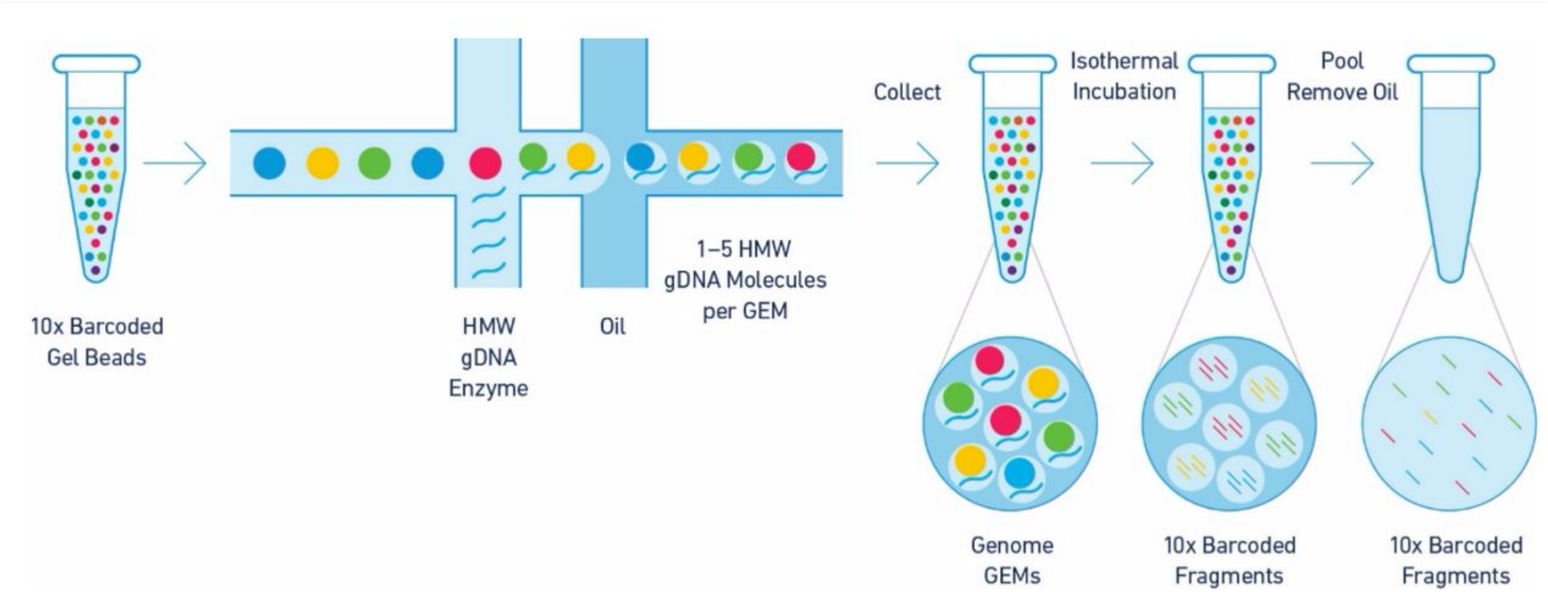
Технологии: PacBio



Технологии: PacBio Hi-Fi



Технологии: 10X Genomics



Что можно секвенировать?

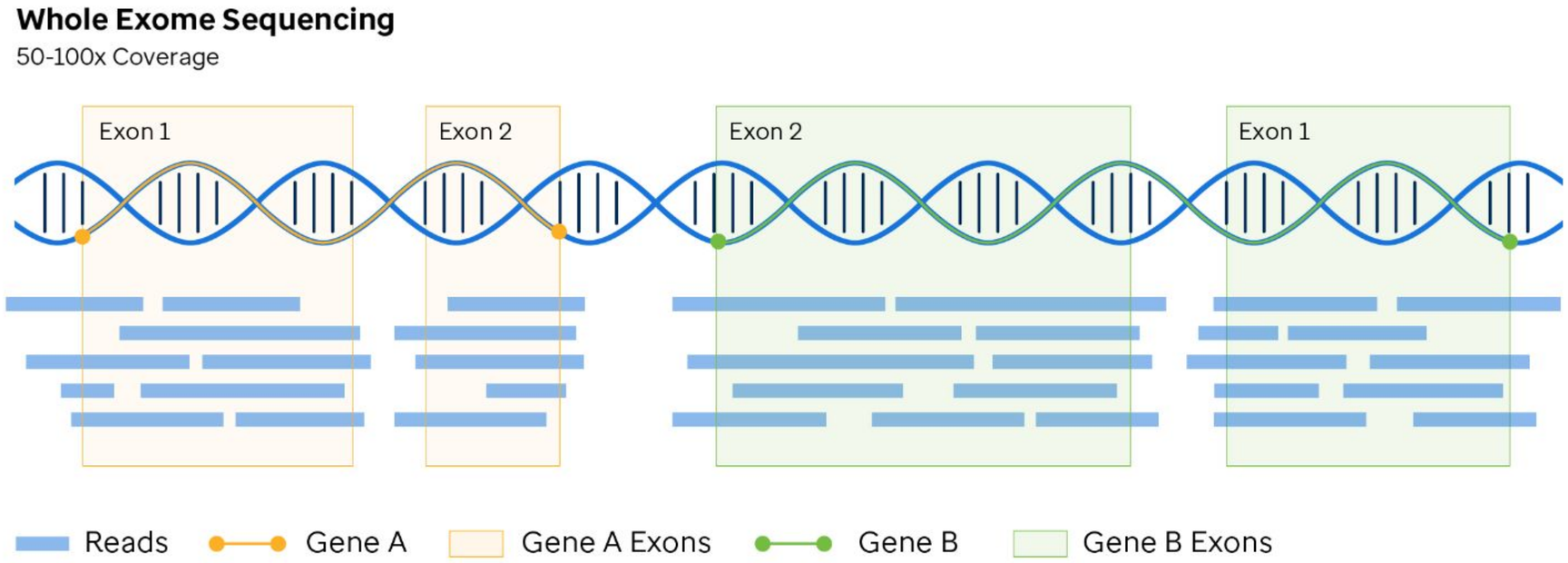
-

Что можно секвенировать?

- Whole Genome Sequencing

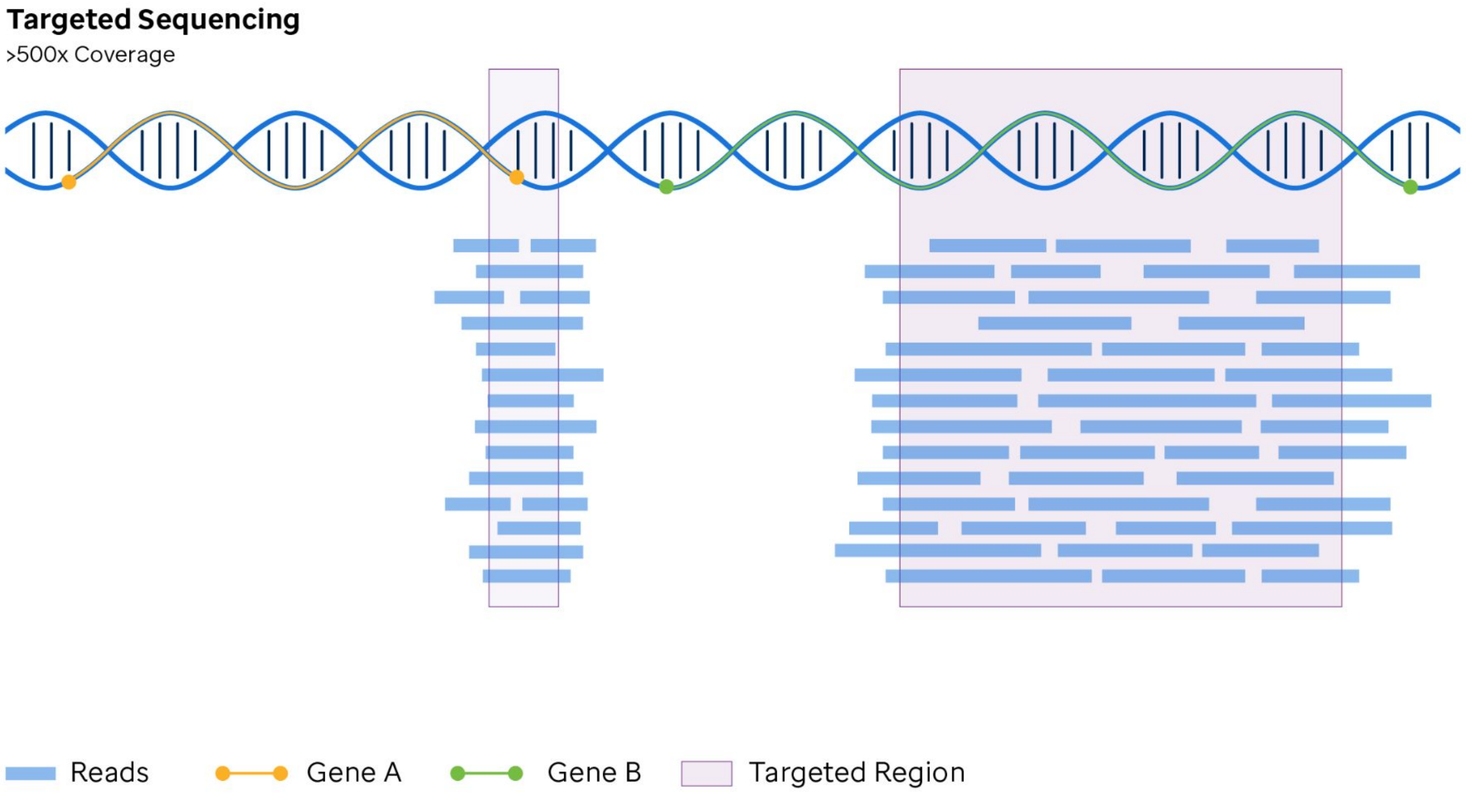
Что можно секвенировать?

- Whole Exome Sequencing



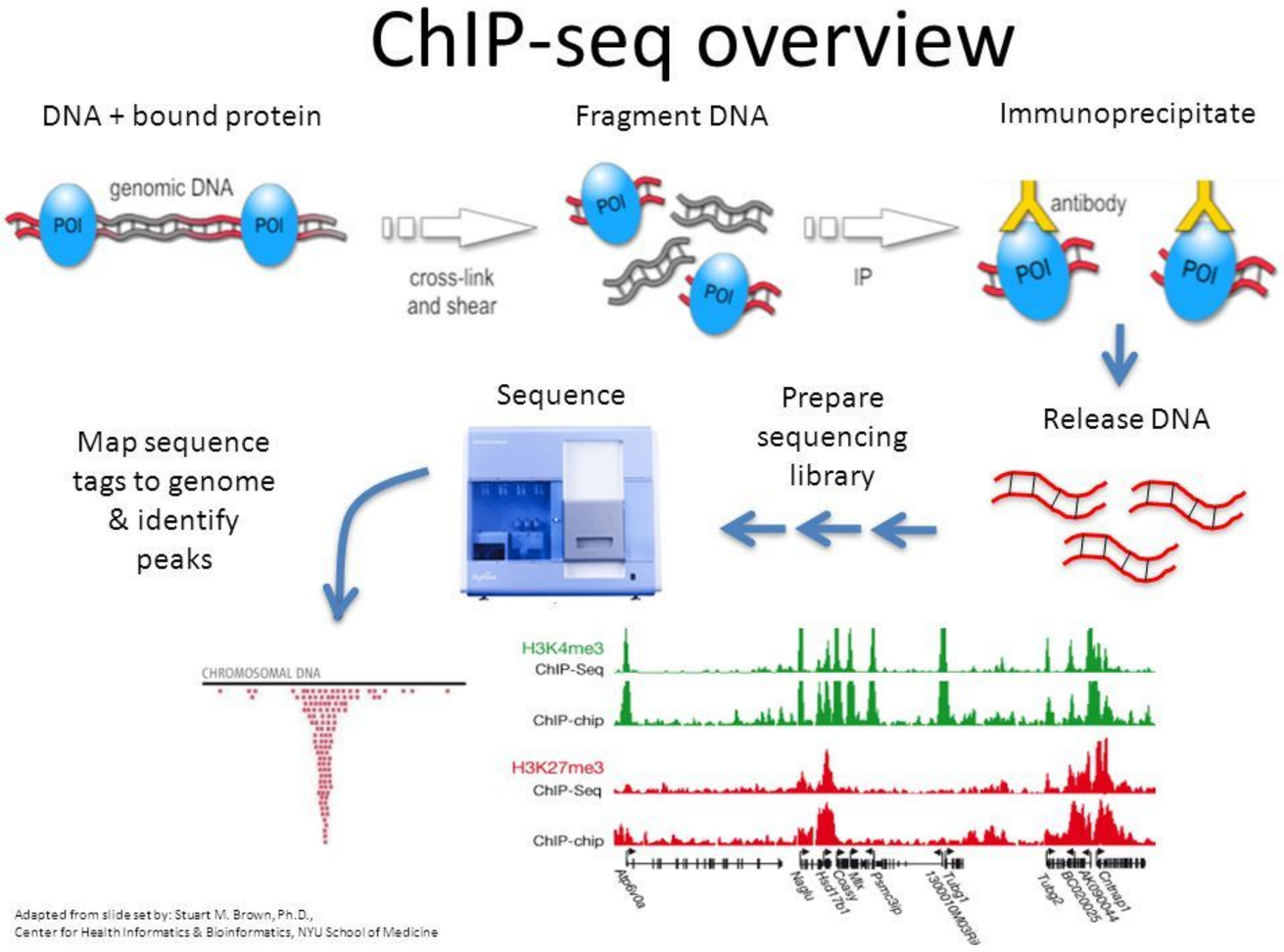
Что можно секвенировать?

- Targeted Sequencing



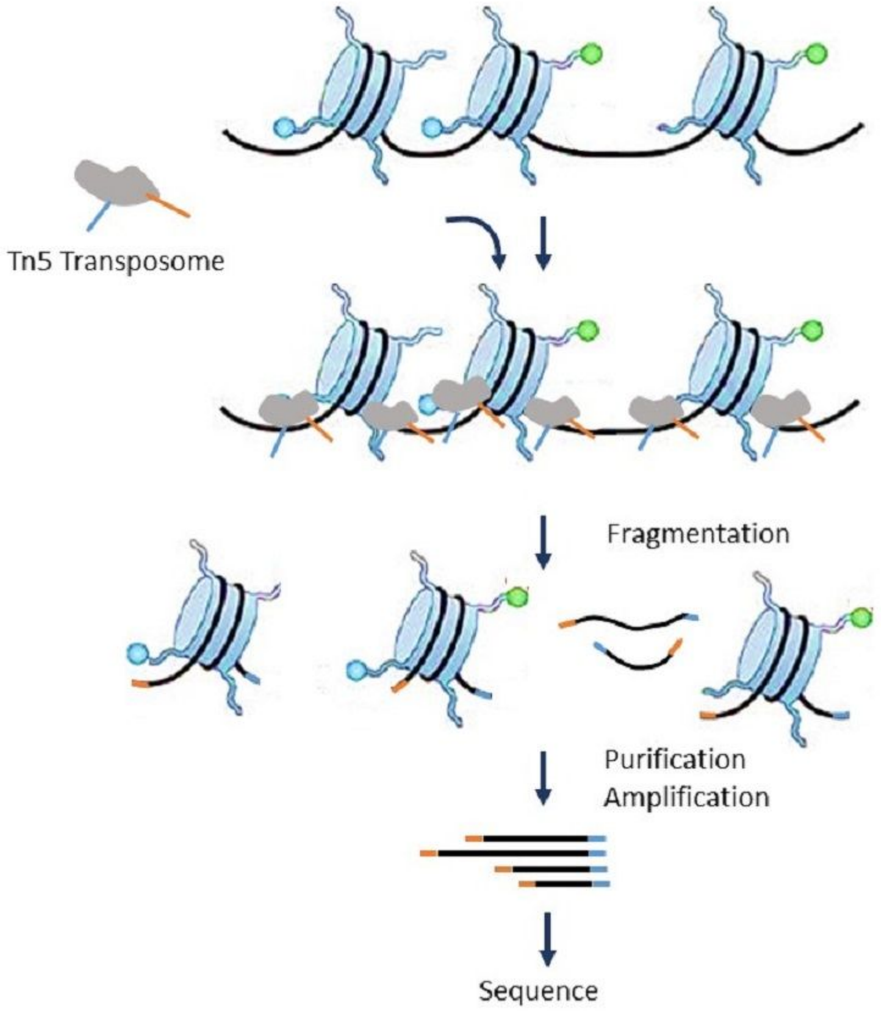
Что можно секвенировать?

- ChIP-Seq



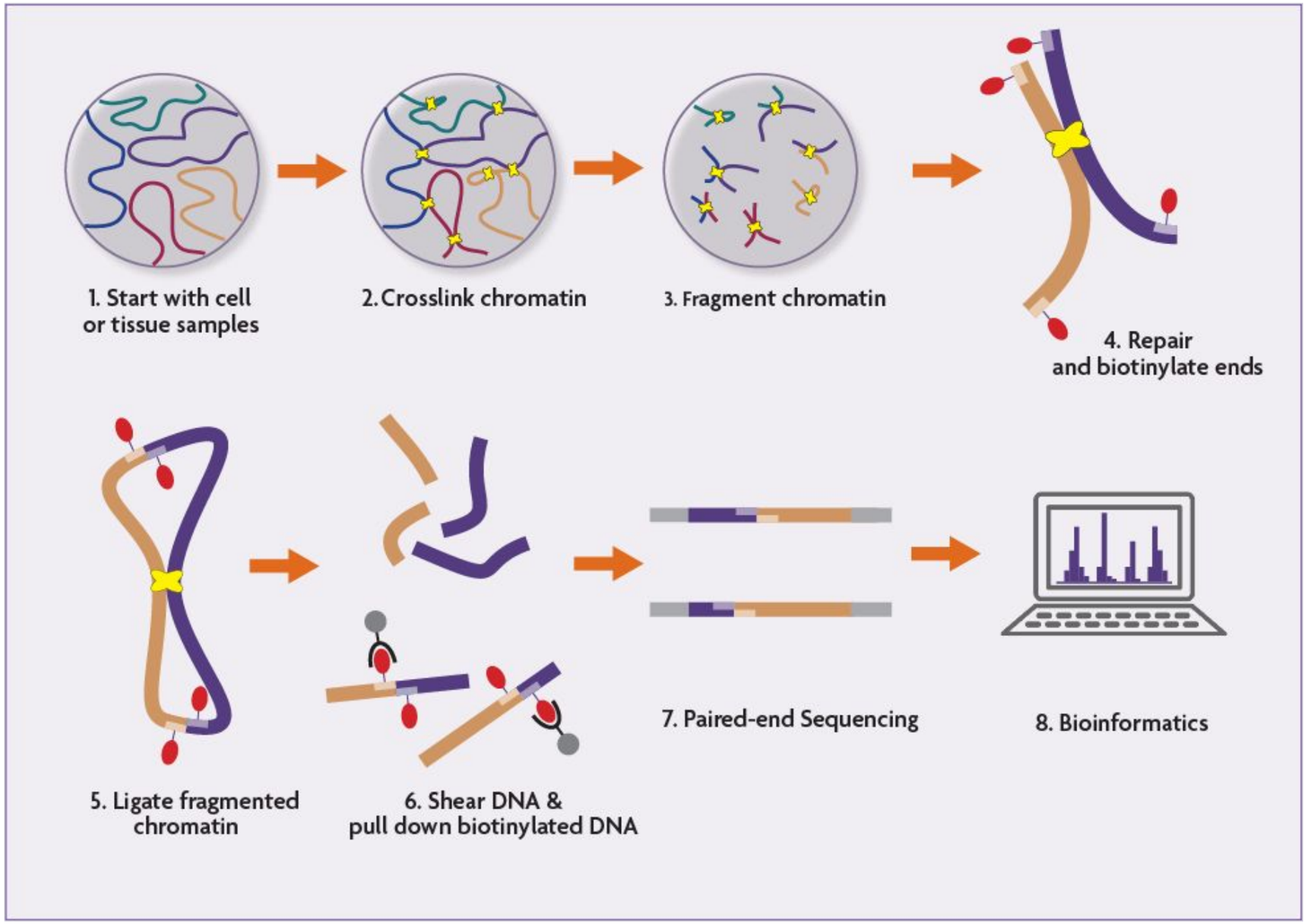
Что можно секвенировать?

- ATAC sequencing



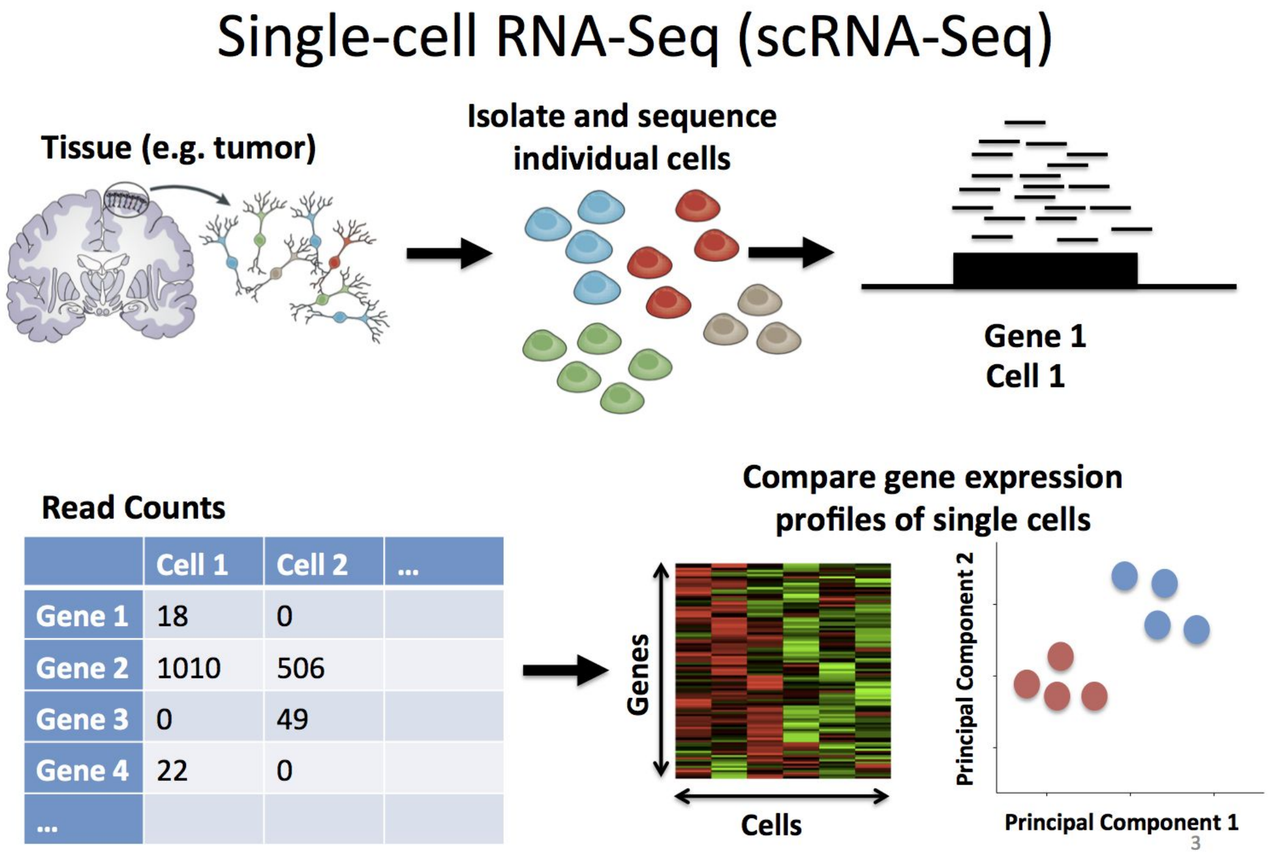
Что можно секвенировать?

- Hi-C



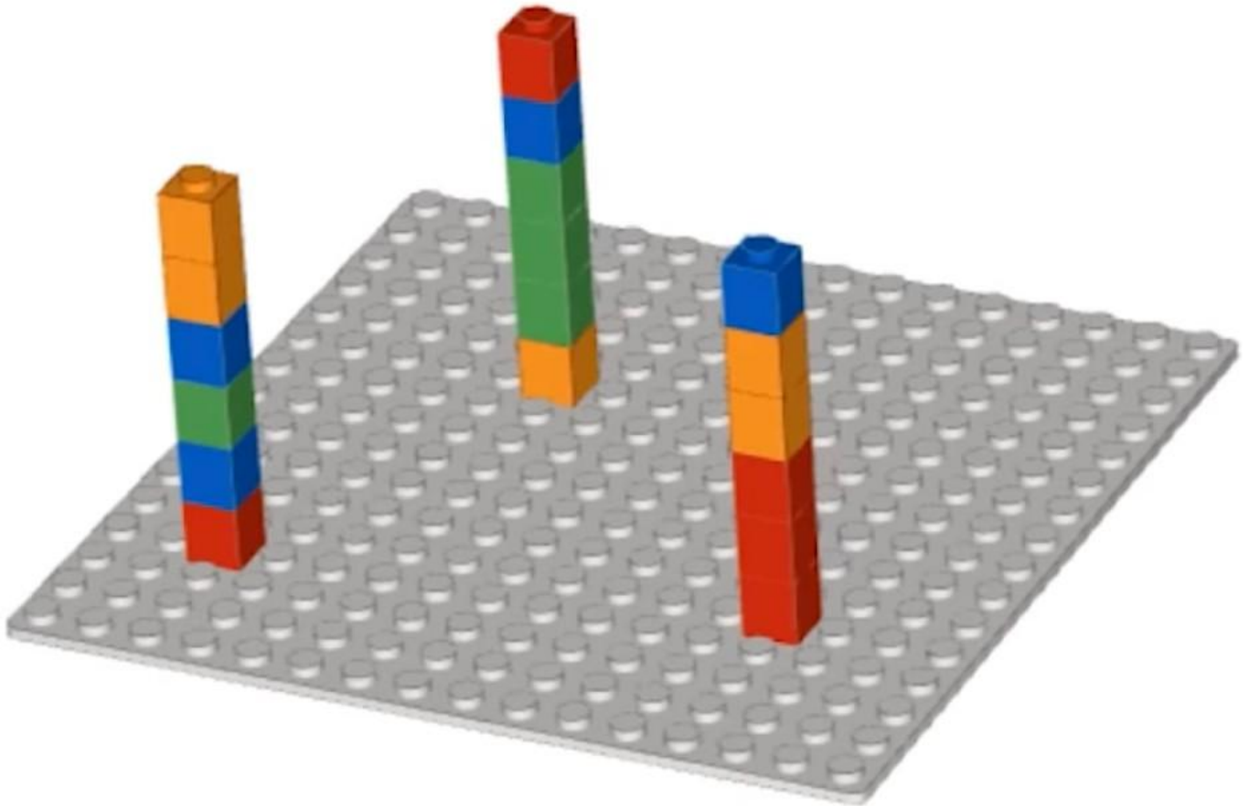
Что можно секвенировать?

- Single-Cell Sequencing

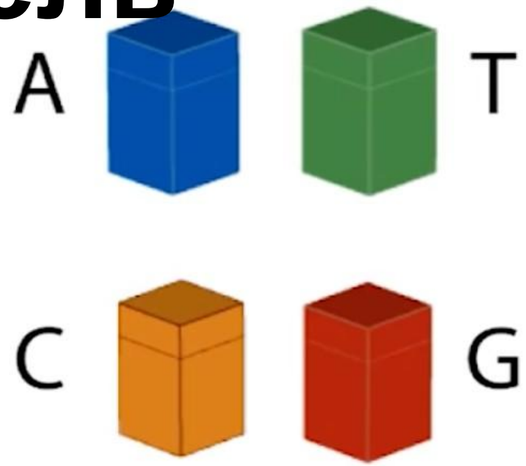


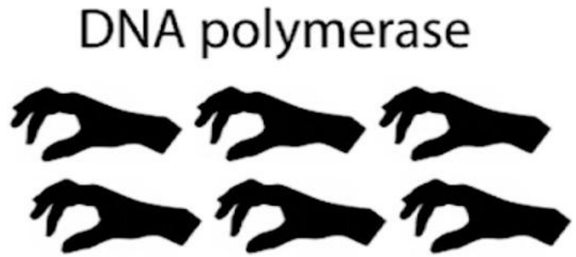
	Cell 1	Cell 2	...
Gene 1	18	0	
Gene 2	1010	506	
Gene 3	0	49	
Gene 4	22	0	
...			

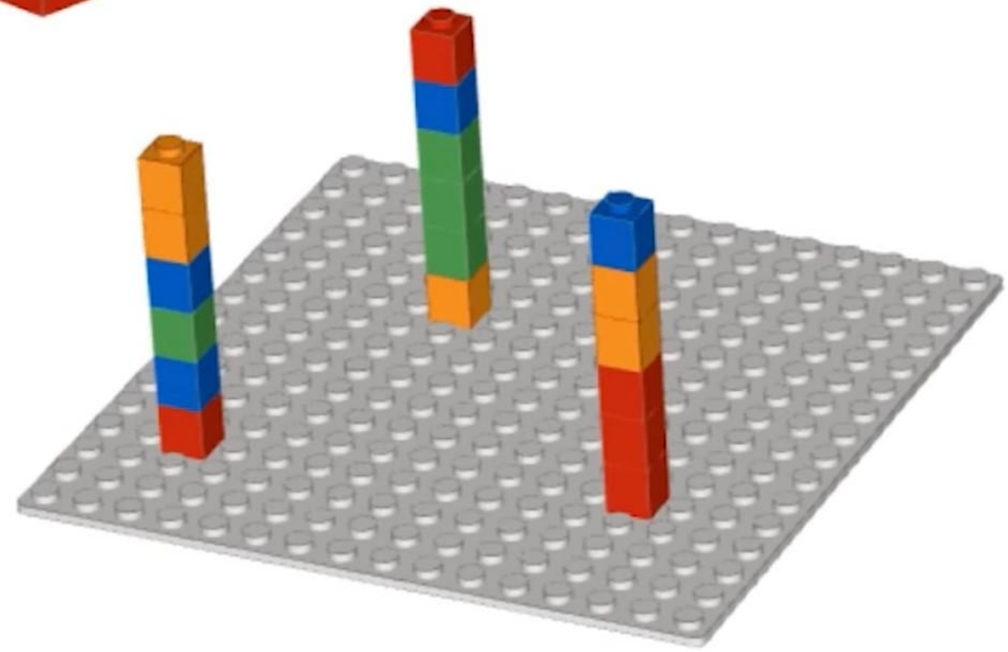
Illumina, модель



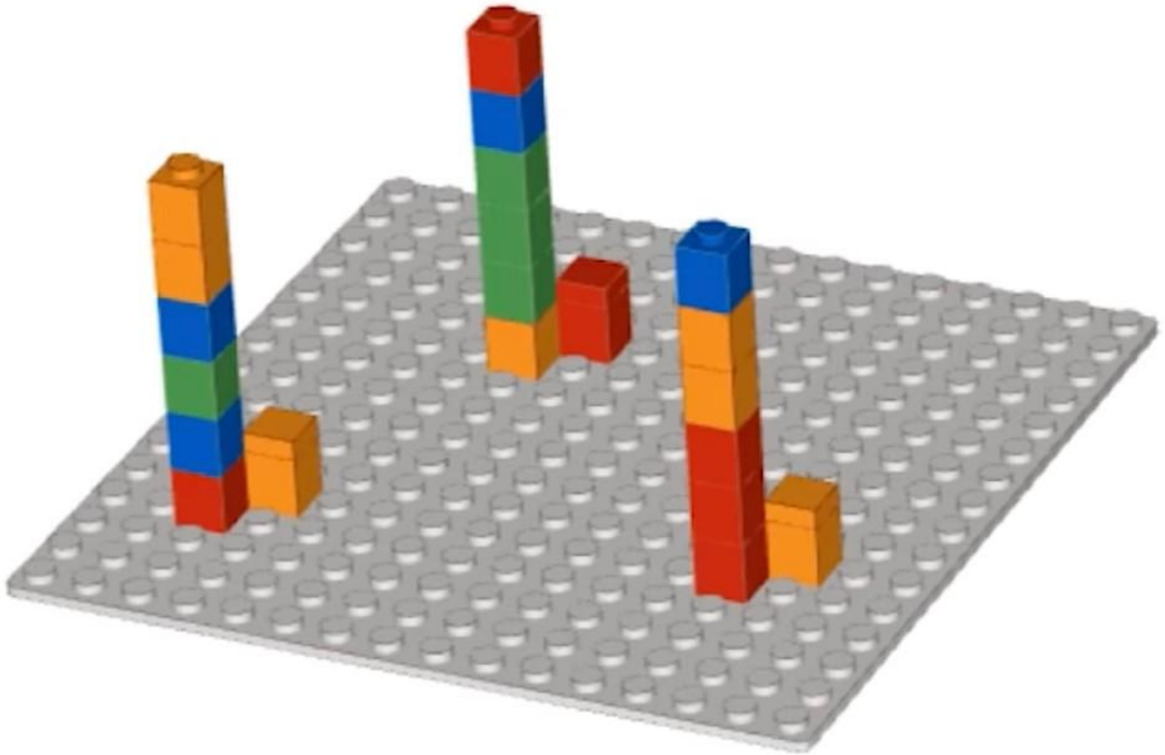
Illumina, модель



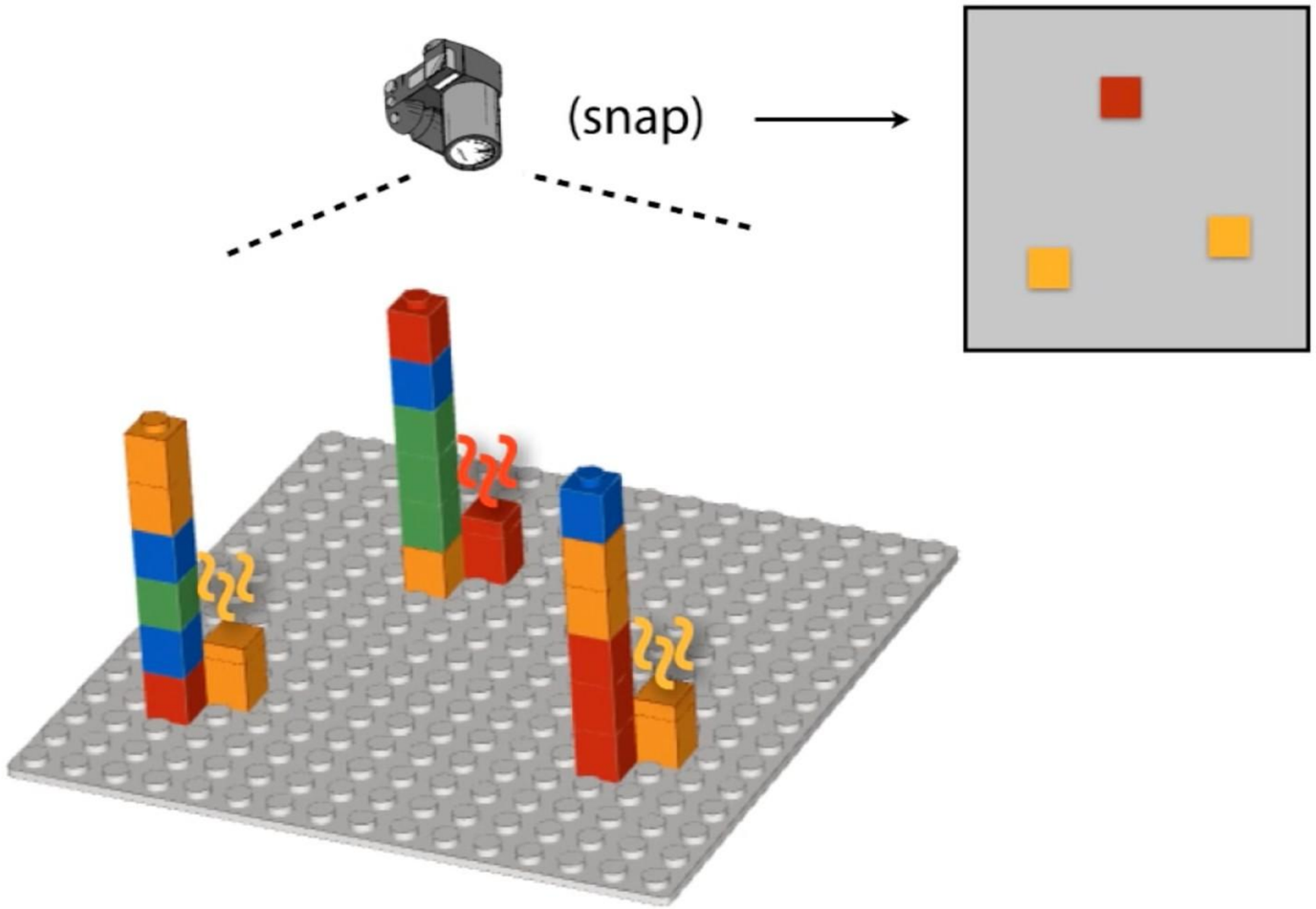




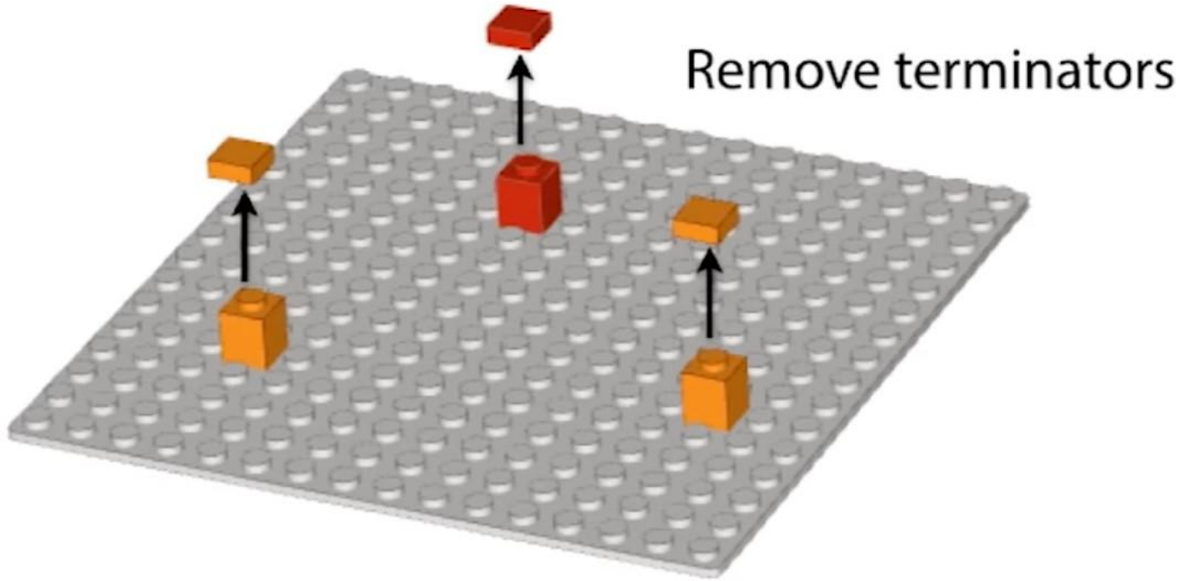
Illumina, модель



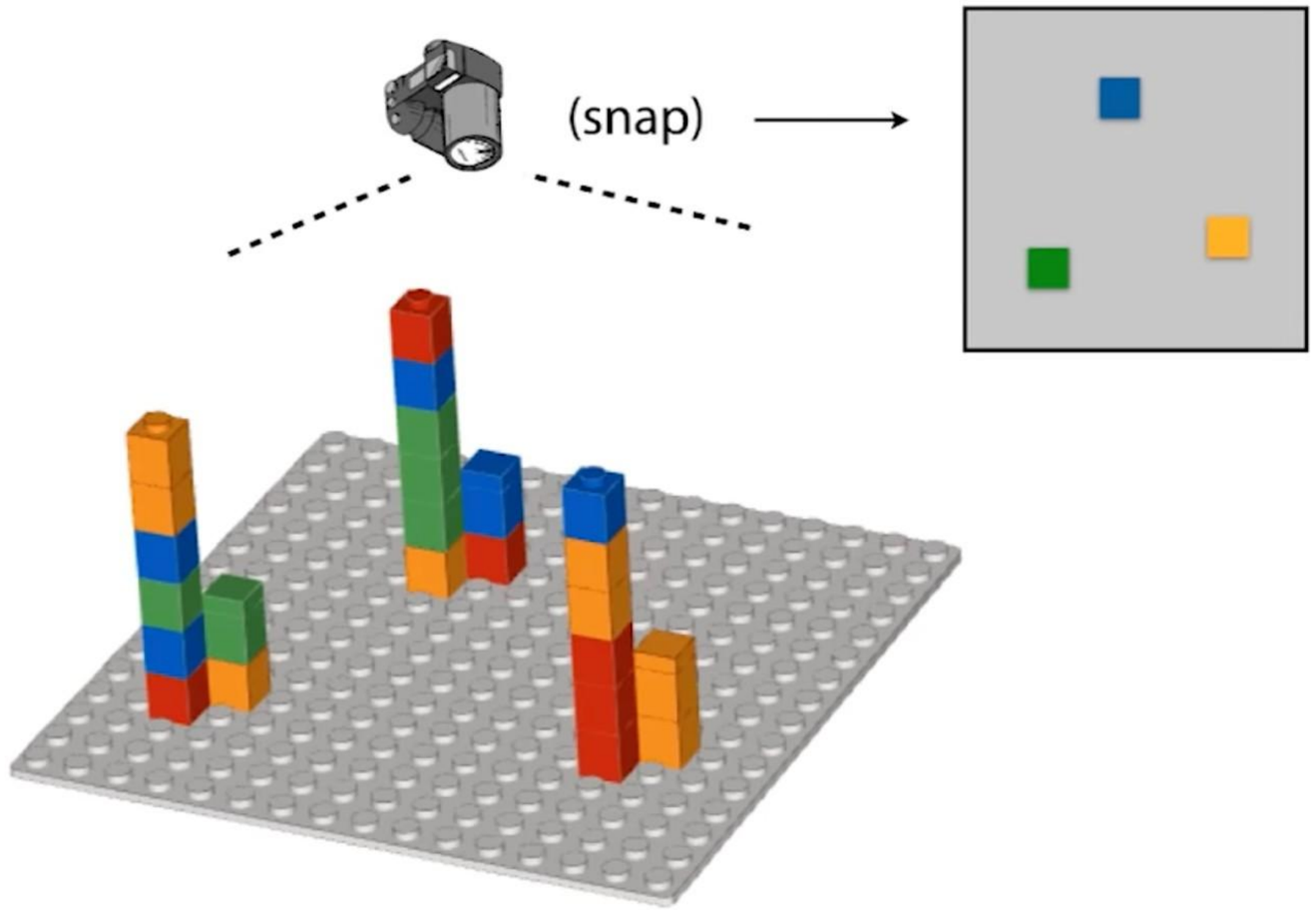
Illumina, модель



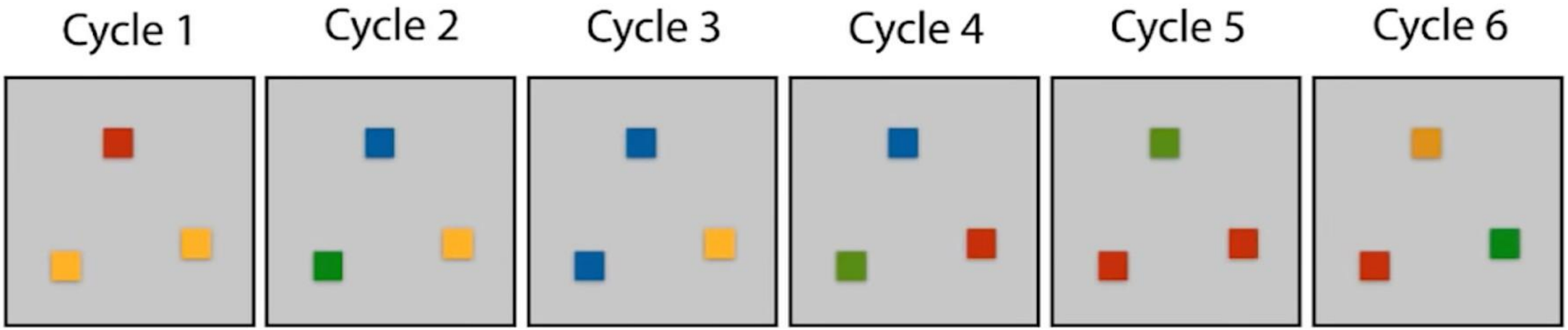
Illumina, модель



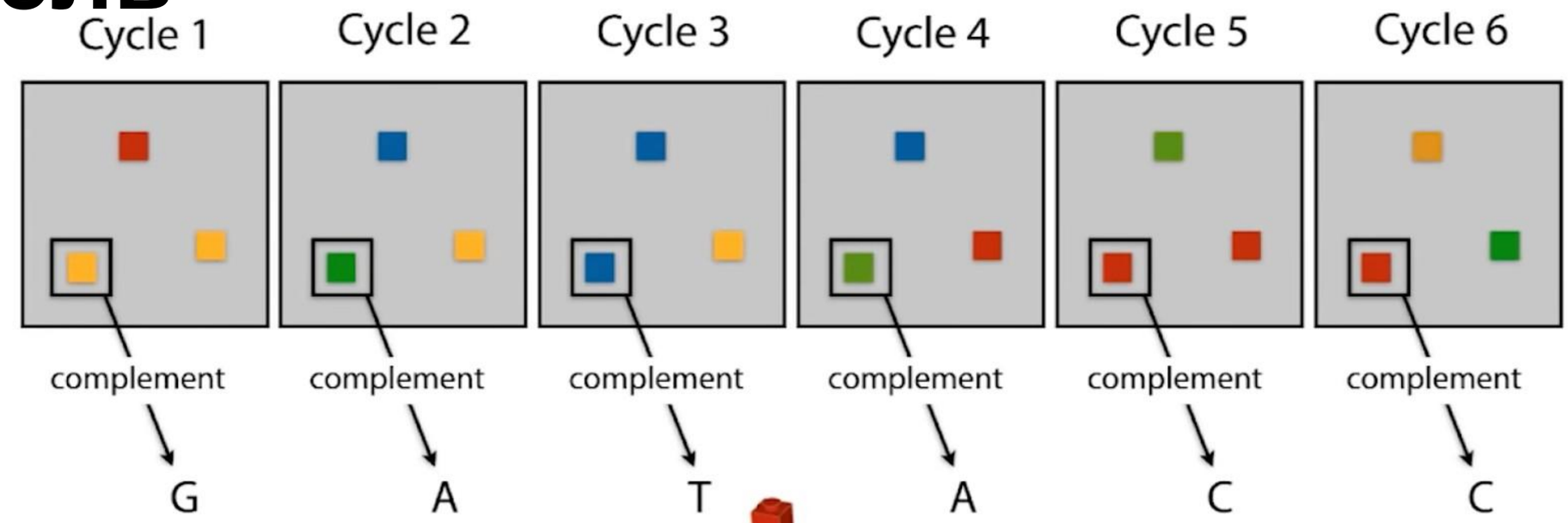
Illumina, модель

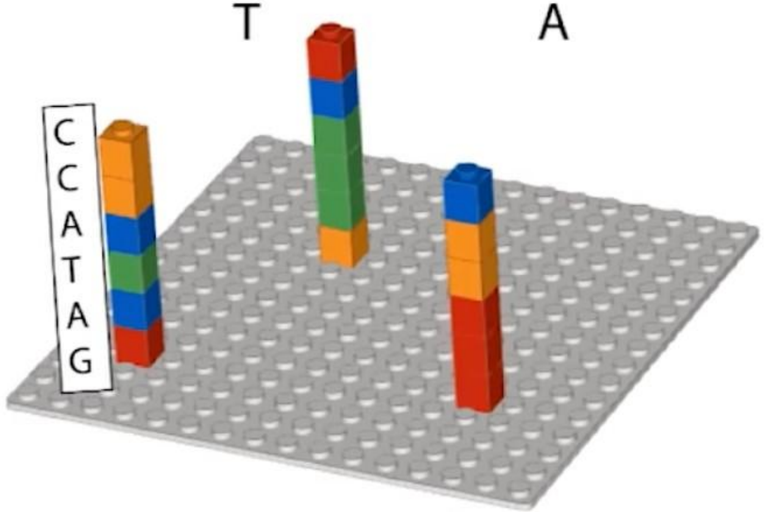


Illumina, модель

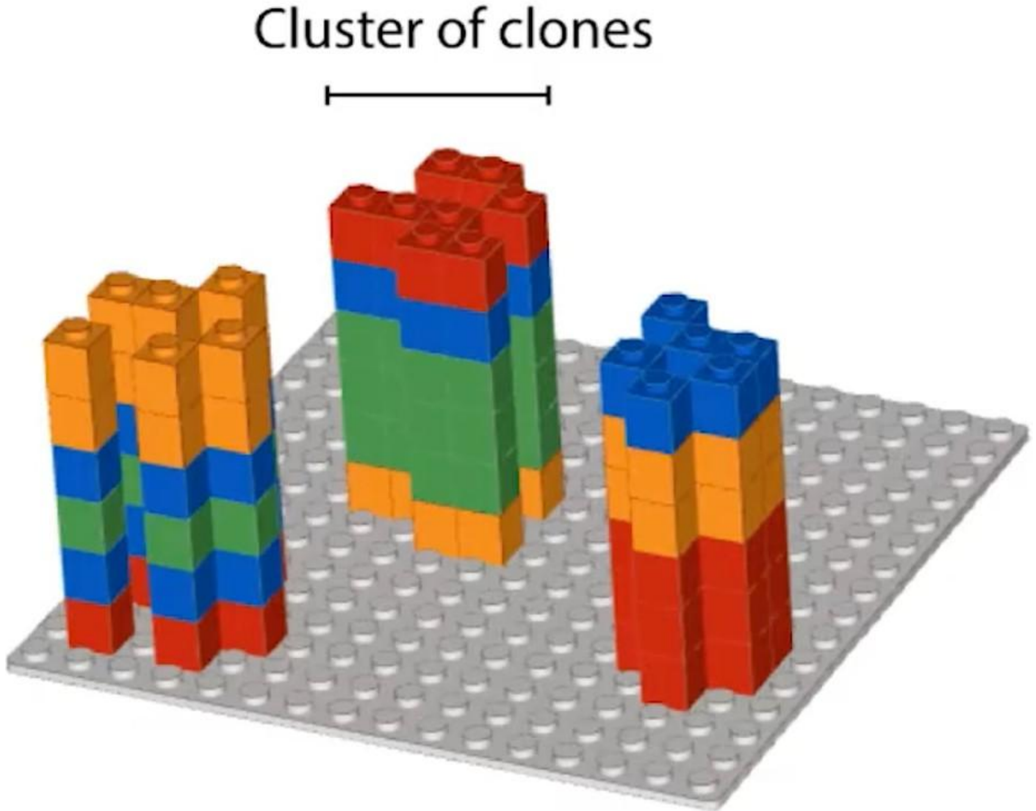


Illumina, модель

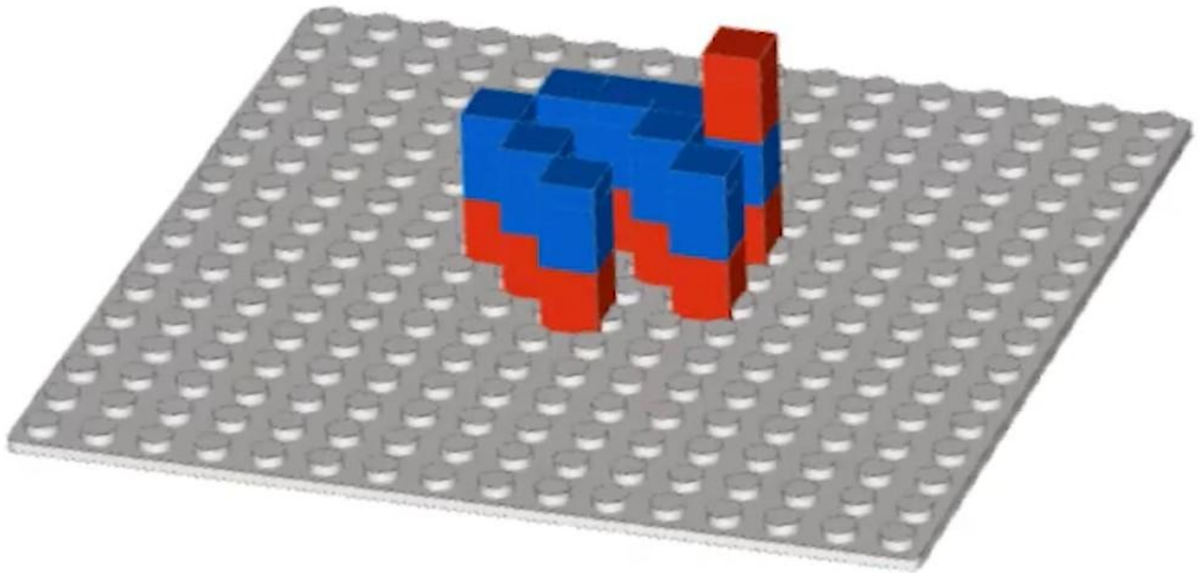




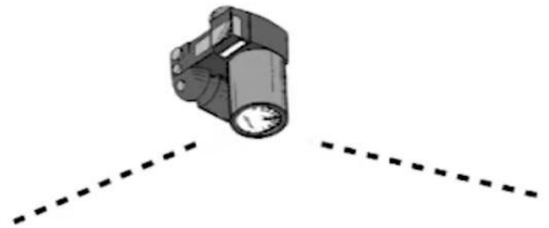
Ошибки, на примере Illumina

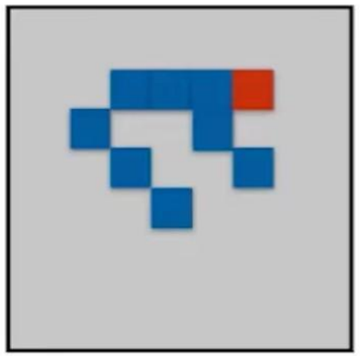


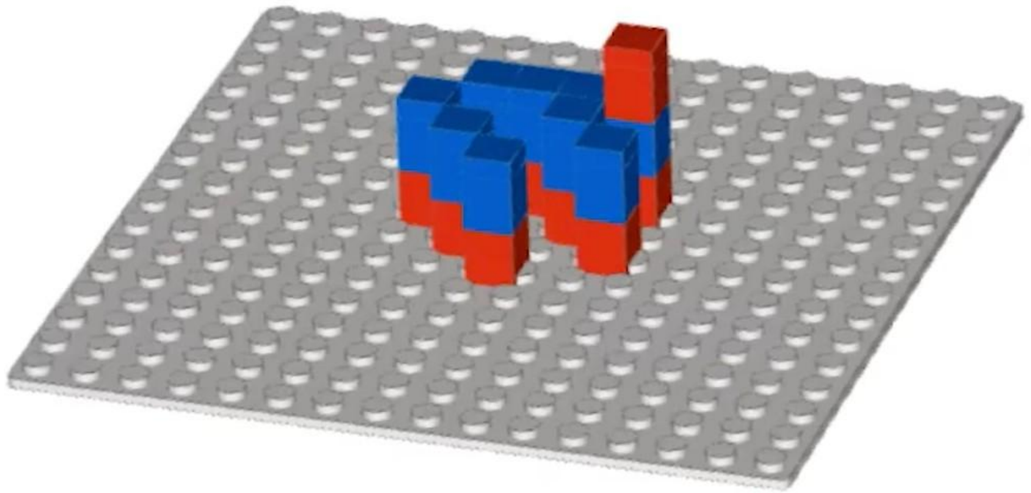
Ошибки, на примере Illumina



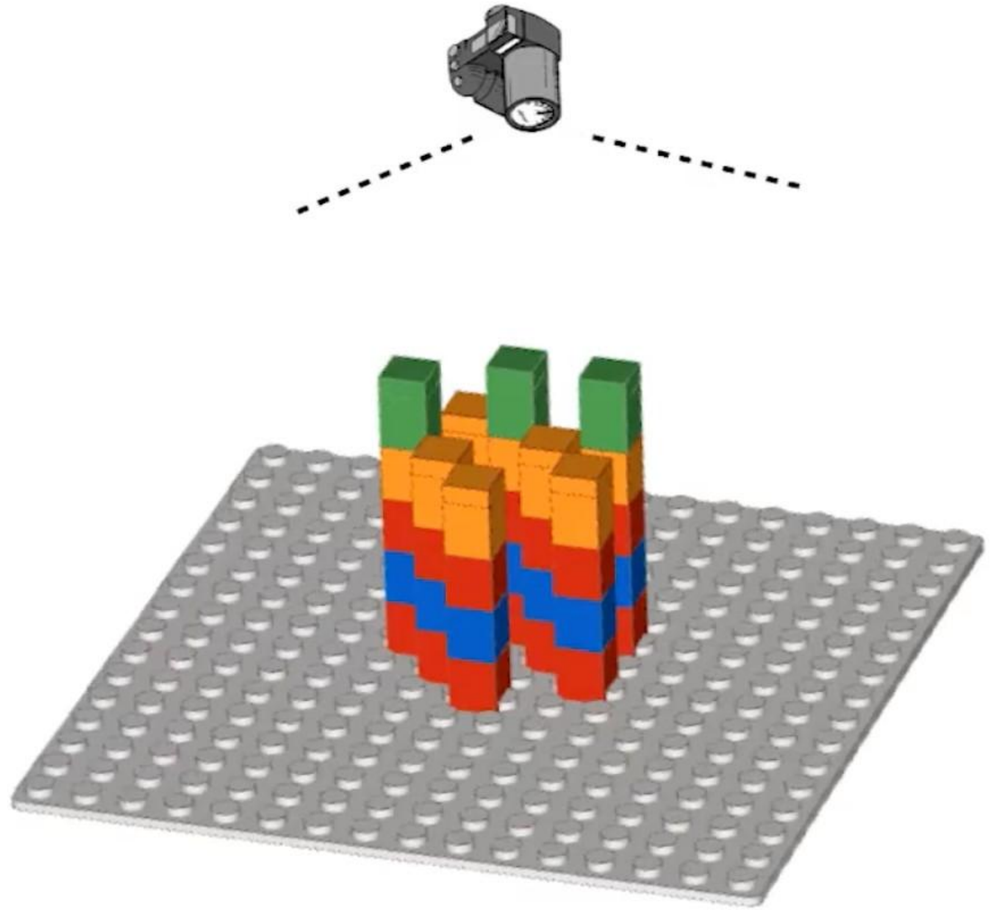
Ошибки, на примере Illumina

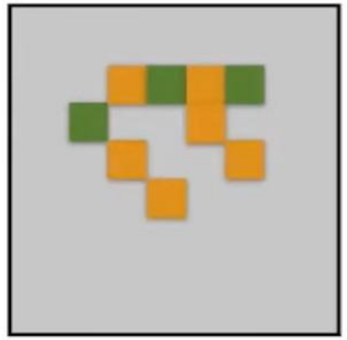






Ошибки, на примере Illumina





Ошибки, на примере Illumina

$$Q = -\ 10 \log_{10}(p)$$

Качество прочтения

Вероятность ошибки

Ошибки, на примере Illumina

$$Q = -10 \log_{10}(p)$$

Качество прочтения

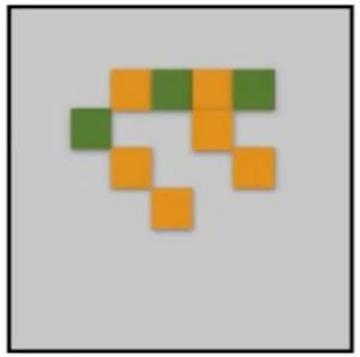
Вероятность ошибки

$Q = 10 \rightarrow$ 1 к 10 что произошла ошибка

$Q = 20 \rightarrow$ 1 к 100

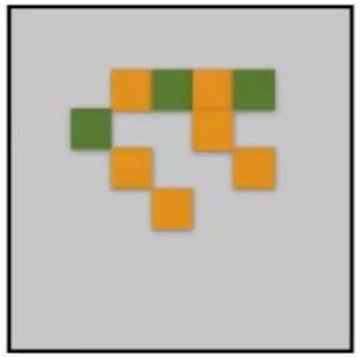
$Q = 30 \rightarrow$ 1 к 1000

Ошибки, на примере Illumina



$$p = \frac{3}{9} = \frac{1}{3}$$

Ошибки, на примере Illumina



$$p = \frac{3}{9} = \frac{1}{3}$$

$$Q = -10 \log_{10} \left(\frac{1}{3} \right) = 4.77$$

FASTQ

```
@SEQ_ID
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACTCACAGTTT
+
!''*((((***+))%%%++)(%%%%).1***-+*''))**55CCF>>>>>>CCCCCCC65
```

FASTQ

```
@SEQ_ID [идентификатор]
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACTCACAGTTT
+
!''*((((***+))%%%++)(%%%%).1***-+*''))**55CCF>>>>>>CCCCCCC65
```

FASTQ

```
@SEQ_ID [идентификатор]
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACTCACAGTTT [последовательность]
+
!''*((((***+))%%%++)(%%%%).1***-+*''))**55CCF>>>>>>CCCCCCC65
```

FASTQ

```
@SEQ_ID [идентификатор]
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACTCACAGTTT [последовательность]
+ [необязательная строка]
!''*((((***+))%%%++)(%%%%).1***-+*''))**55CCF>>>>>>CCCCCCC65
```

FASTQ

```
@SEQ_ID [идентификатор]
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACTCACAGTTT [последовательность]
+ [необязательная строка]
!''*((((***+))%%%++)(%%%%).1***-+*''))**55CCF>>>>>>CCCCCCC65 [качество прочтения]
```

FASTQ

```
@SEQ_ID [идентификатор]
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACTCACAGTTT [последовательность]
+ [необязательная строка]
!''*((((***+))%%%++)(%%%%).1***-+*''))**55CCF>>>>>>CCCCCCC65 [качество прочтения]
```

ASCII представление того самого Q

Из качества в символ: chr(Q + 33)

Обратно: ord(qual) - 33

Визуализация

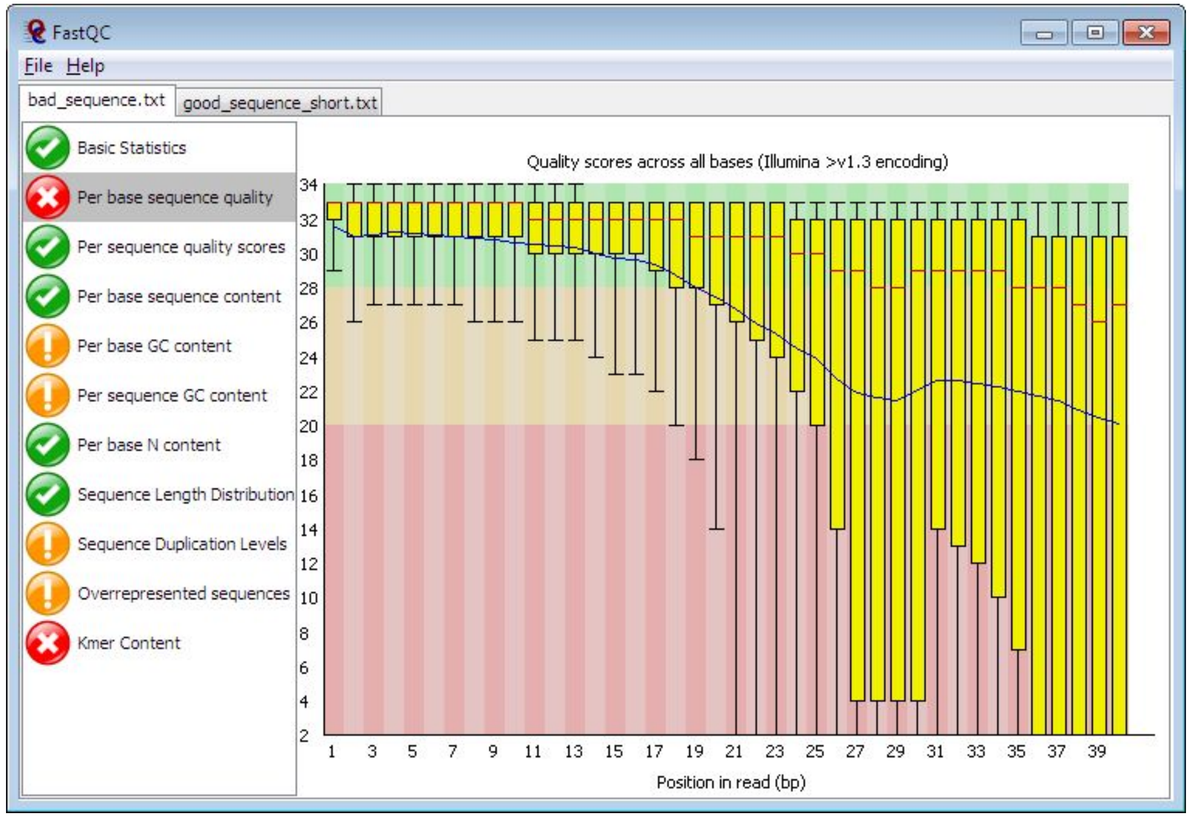
FastQC [https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/]

```
>>fastqc bad_sequence.txt good_sequence.txt
```

Визуализация

FastQC [https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/]

```
>>fastqc bad_sequence.txt good_sequence.txt
```



Удаление плохих ридов

Trimmomatic [http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic]

```
java -jar trimmomatic-0.35.jar SE -phred33 input.fq.gz output.fq.gz
ILLUMINACLIP:TruSeq3-SE:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36
```

Удаление плохих ридов

Trimmomatic [http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic]

```
java -jar trimmomatic-0.35.jar SE -phred33 input.fq.gz output.fq.gz
ILLUMINACLIP:TruSeq3-SE:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36
```

Удаление адаптеров (ILLUMINACLIP:TruSeq3-SE:2:30:10)

Удаление плохих ридов

Trimmomatic [http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic]

```
java -jar trimmomatic-0.35.jar SE -phred33 input.fq.gz output.fq.gz
ILLUMINACLIP:TruSeq3-SE:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36
```

Удаление адаптеров (ILLUMINACLIP:TruSeq3-SE:2:30:10)

Удаление низкокачественных вначале (с качеством хуже 3) (LEADING:3)

Удаление плохих ридов

Trimmomatic [http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic]

```
java -jar trimmomatic-0.35.jar SE -phred33 input.fq.gz output.fq.gz
ILLUMINACLIP:TruSeq3-SE:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36
```

Удаление адаптеров (ILLUMINACLIP:TruSeq3-SE:2:30:10)
Удаление низкокачественных вначале (с качеством хуже 3) (LEADING:3)
Удаление низкокачественных в конце (с качеством хуже 3) (TRAILING:3)

Удаление плохих ридов

Trimmomatic [http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic]

```
java -jar trimmomatic-0.35.jar SE -phred33 input.fq.gz output.fq.gz
ILLUMINACLIP:TruSeq3-SE:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36
```

Удаление адаптеров (ILLUMINACLIP:TruSeq3-SE:2:30:10)
Удаление низкокачественных вначале (с качеством хуже 3) (LEADING:3)
Удаление низкокачественных в конце (с качеством хуже 3) (TRAILING:3)
Сканировать окном в 4 нуклеотида, если среднее качество в окне ниже 15, то удалять (SLIDINGWINDOW:4:15)
Удалять риды короче 36 нуклеотидов (MINLEN:36)

Исправление ошибок

Идея!

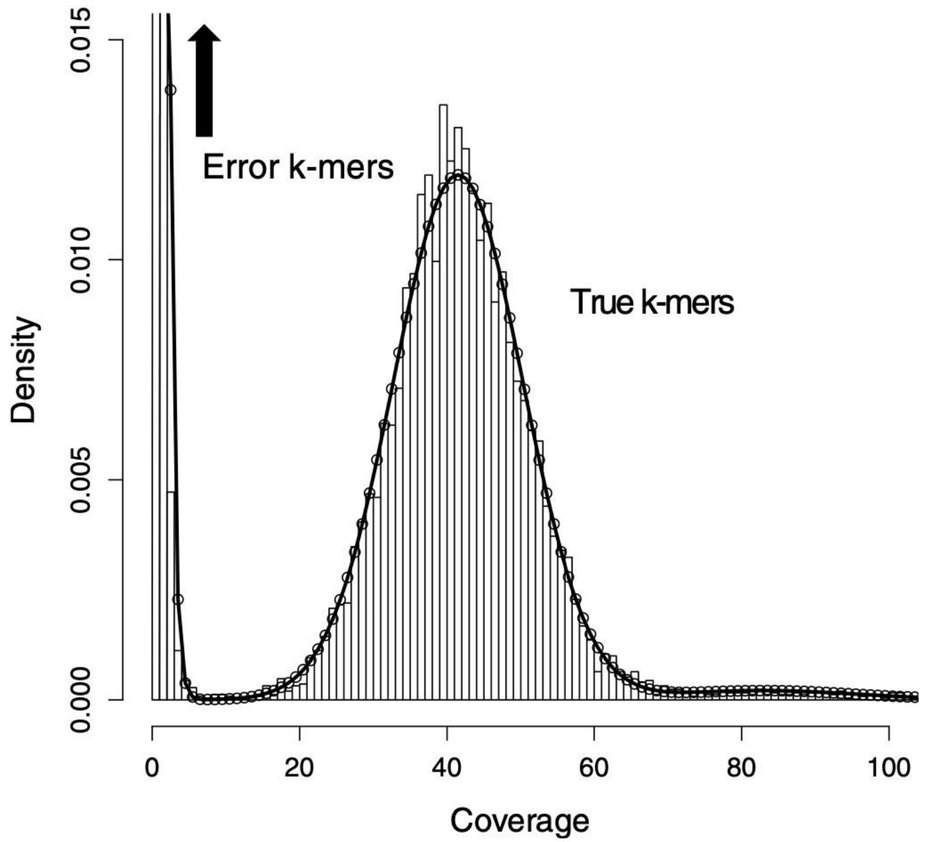
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATA
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATA
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATA
GATTTGTGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATA -> GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATA
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATA
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATA
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATA
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATA
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATAAAATA -> GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATA
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATA

Исправление ошибок: Quake

1. Нужно посчитать все k-меры и определить, какие ошибочные
   - k-мер: его количество не учитывает качество
   - Будем считать q-меры. k-мер: его количество * произведение качеств

Исправление ошибок: Quake

1. Нужно посчитать все k-меры и определить, какие ошибочные
   - k-мер: его количество не учитывает качество
   - Будем считать q-меры. k-мер: его количество * произведение качеств



Исправление ошибок: Quake

1. Нужно посчитать все k-меры и определить, какие ошибочные
   - k-мер: его количество не учитывает качество
   - Будем считать q-меры. k-мер: его количество * произведение качеств
   - По распределению разделим k-меры на 2 кластера (ошибочные и правильные)
2. Все ошибочные k-меры — кандидаты на исправление в ридах

   Нуклеотиды которые наблюдаем в риде $O = O_1, O_2, \ldots, O_N$

   Те которые на самом деле в геноме $A = A_1, A_2, \ldots, A_N$

   Нам бы хотелось по наблюдаемым понять наиболее вероятные A_i

Исправление ошибок: Quake

1. Нужно посчитать все k-меры и определить, какие ошибочные
   - k-мер: его количество не учитывает качество
   - Будем считать q-меры. k-мер: его количество * произведение качеств
   - По распределению разделим k-меры на 2 кластера (ошибочные и правильные)
2. Все ошибочные k-меры — кандидаты на исправление в ридах
   - Нуклеотиды которые наблюдаем в риде $O = O_1, O_2, \ldots, O_N$
   - Те которые на самом деле в геноме $A = A_1, A_2, \ldots, A_N$
   - Нам бы хотелось по наблюдаемым понять наиболее вероятные A_i

$$P(A = a \mid O = o) = \prod_{i=1}^{N} \frac{P(O_i = o_i \mid A_i = a_i) P(A_i = a_i)}{P(O_i = o_i)}$$

Исправление ошибок: Quake

1. Нужно посчитать все k-меры и определить, какие ошибочные
   - k-мер: его количество не учитывает качество
   - Будем считать q-меры. k-мер: его количество * произведение качеств
   - По распределению разделим k-меры на 2 кластера (ошибочные и правильные)
2. Все ошибочные k-меры — кандидаты на исправление в ридах
   - Нуклеотиды которые наблюдаем в риде $O = O_1, O_2, \ldots, O_N$
     Те которые на самом деле в геноме $A = A_1, A_2, \ldots, A_N$
   - Нам бы хотелось по наблюдаемым понять наиболее вероятные A_i
   - $$P(A = a \mid O = o) = \prod_{i=1}^{N} \frac{P(O_i = o_i \mid A_i = a_i) P(A_i = a_i)}{P(O_i = o_i)}$$

$$P(O_i = o_i \mid A_i = a_i) = \begin{cases} p_i & \text{if } o_i = a_i \\ (1 - p_i) E_{q_i}(a_i, o_i) & \text{otherwise} \end{cases}$$ где $$p_i = 1 - 10^{-\frac{q_i}{10}}$$

Исправление ошибок: Quake

1. Нужно посчитать все k-меры и определить, какие ошибочные
   - k-мер: его количество не учитывает качество
   - Будем считать q-меры. k-мер: его количество * произведение качеств
   - По распределению разделим k-меры на 2 кластера (ошибочные и правильные)
2. Все ошибочные k-меры — кандидаты на исправление в ридах
   - Нуклеотиды которые аблюдаем в риде $O = O_1, O_2, \ldots, O_N$
     Те которые на самом деле в геноме $A = A_1, A_2, \ldots, A_N$
   - Нам бы хотелось по наблюдаемым понять наиболее вероятные A_i
   - $$P(A = a \mid O = o) = \prod_{i=1}^{N} \frac{P(O_i = o_i \mid A_i = a_i) P(A_i = a_i)}{P(O_i = o_i)}$$

$$P(O_i = o_i \mid A_i = a_i) = \begin{cases} p_i & \text{if } o_i = a_i \\ (1 - p_i) E_{q_i}(a_i, o_i) & \text{otherwise} \end{cases} \quad \text{где} \quad p_i = 1 - 10^{-\frac{q_i}{10}}$$

3. Коррекция

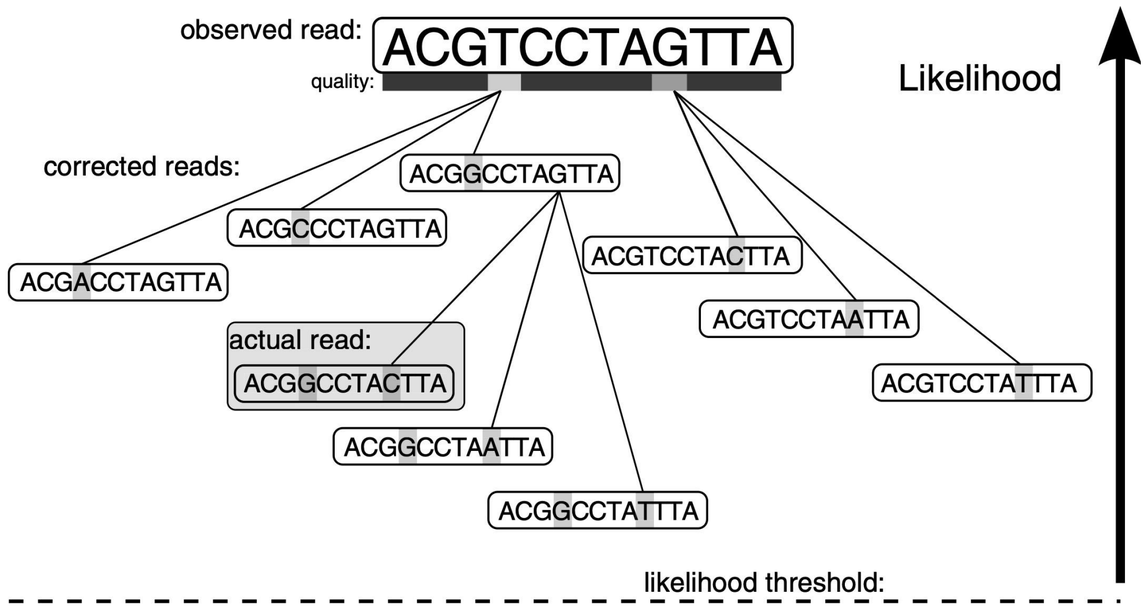
Исправление ошибок: Quake

1. Нужно посчитать все k-меры и определить, какие ошибочные
2. Все ошибочные k-меры — кандидаты на исправление в ридах
3. Коррекция
   - Хотим сделать в каждом риде такие замены, которые переместят все k-меры из
   - кластера ошибочных в кластер правильных

```
1: function SEARCH(R)
2:     P.PUSH({} , 1)
3:     while (C, L) ← P.POP() do
4:         if VALID (R, C) then
5:             return C
6:         else
7:             i ← lowest quality unconsidered position
8:             for nt ∈ [A, C, G, T] do
9:                 if R[i] == nt then
10:                    C_nt = C
11:                else
12:                    C_nt = C + (i, nt)
13:                L_nt ← LIKELIHOODRATIO(R, C_nt)
14:                if L_nt > likelihood_threshold then
15:                    P.PUSH(C_nt , L_nt)
16:    return {}
```

Исправление ошибок: Quake

1. Нужно посчитать все k-меры и определить, какие ошибочные
2. Все ошибочные k-меры — кандидаты на исправление в ридах
3. Коррекция
   - Хотим сделать в каждом риде такие замены, которые переместят все k-меры из кластера ошибочных в кластер правильных



Исправление ошибок: Quake

Quake: [http://www.cbcb.umd.edu/software/quake/manual.html]

```
>>quake.py -f [fastq file list] -k [k-mer size] -p 4
```

Резюмируем

- Секвенирование — случайный процесс
- Могут происходить ошибки секвенирования
- Можно просто отбрасывать риды с ошибками
- Но можно и исправлять!