geneious prime





第18回 CRISPR 編集結果の解析(その1)

Analyze CRISPR Editing Results ツールにより、CRISPR 編集実験から得られた NGS リード をアラインメント、クラスタリング、解析し、バリアントの頻度やタンパク質への影響を判断することが できます。今回より、このツールで使用するためのリードの処理方法(その 1)、解析のセットアップ方 法(その 2)、結果の解釈方法(その 3)、としてご紹介する予定です。

<u>チュートリアル用データセット</u>として、CRISPR サイト周辺のターゲット領域のアンプリコンシークエン スから得られた Illumina MiSeq ペアエンドリードデータをご用意しています。本ターゲット領域は、 WNT シグナル伝達経路の制御因子である APC 遺伝子の 240 bp から構成されています。

Prime2022 以前の Geneious をお使いの場合は BBDuk プラグインが必要となりますので、解 析前に Tools → Plugins で BBDuk Trimmer を選択し、Install をクリックしてインストール してください。

Analyze CRISPR Editing Results は、fastq ファイルからインポートしたアラインされていない NGS リードに対して実行するように設計されています。ペアリードの場合、ファイルをインポートする 際に適切なペアリング設定を選択する必要があります。また、ペアリングされたリードは、解析を実行 する前にマージする必要があります。さらに、マージする前に基本的な Quality トリミングを行い、マ ージステップの精度を確保することをお勧めします。

また、Analyze CRISPR Editing Results は、サンガー配列に対しても実行することができます。 アンプリコンにまたがるフォワード/リバースリードがある場合、解析前に de novo アセンブルツール を使用して、これらを1つの配列にアセンブルする必要があります(手順は<u>こちら</u>をご参照ください)。

チュートリアル用データには、すでにペアリング済みのリード(Sample Reads)が含まれています。 まず、このデータセットを BBDuk でトリミングします。 Sample Reads を選択し、Annotate and Predict → Trim using BBDuk に進みます。まず、 ウィンドウの左下にある歯車をクリックし、**Reset to defaults** を選択します(現在の設定がデフォ ルトの場合はグレーアウトしています)。Trim Adapters をチェックし、設定はそのままにします。次 に、Trim Low Quality をチェックし、Minimum Quality を 20 に設定します。この設定により、 リードの両末端から phred スコアが 20 未満の低クオリティ塩基がトリミングされます。また、トリ ミング後に短すぎて使い物にならないリードを捨てるには、Discard Short Reads を選択して、 最小長を 20 bp に設定します。

BBDuk の設定は以下のようになります。

| Contraction Trim using BBDuk | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <u>BB</u> | Duk Adapter/Quality Trimming Version 38.84 by Brian Bushnell | |
| 🗹 Trim Ad | apters | |
| Adapters: | All Truseq, Nextera and PhiX adapters (158 ᅌ Choose ? | |
| Trim: Rig | ht End | |
| | | |
| Kmer Lengt | h: 27 C | |
| Maximum S | Substitutions: 1 | |
| Maximum S | Substitutions + INDELs: 0 | |
| Trim p | artial adapters from ends with kmer length: 4 | |
| | | |
| | | |
| Trim Lo | w Quality | |
| ✓ Trim Lo Trim: Bot | w Quality | |
| Trim Lo | w Quality | |
| Trim Lo | w Quality | |
| Trim Lo Trim: Bot Minimum C | w Quality h Ends Quality: 20 apters based on paired read overhangs | |
| Trim Lo Trim: Bot Minimum C Trim ad | w Quality | |
| Trim Lo Trim: Bot Minimum C Trim ad Minimum C | w Quality h Ends Quality: 20 apters based on paired read overhangs Overlap: 24 | |
| ✓ Trim Lo Trim: Bot Minimum C Trim ad Minimum C ✓ Discard | w Quality h Ends Quality: 20 apters based on paired read overhangs overlap: 24 Short Reads | |
| ✓ Trim Lo Trim: Bot Minimum C ○ Trim ad Minimum C ✓ Discard Minimum L | w Quality | |
| Trim: Bot Minimum C Trim ad Minimum C Discard Minimum L | w Quality h Ends Quality: 20 apters based on paired read overhangs overlap: 24 Short Reads ength: 20 bp | |
| ✓ Trim Lo Trim: Bot Minimum C Trim ad Minimum C ✓ Discard Minimum L | w Quality h Ends Quality: 20 apters based on paired read overhangs overlap: 24 Short Reads ength: 20 bp | |

OK をクリックして解析を実行すると、Sample Reads (trimmed)という新しいファイルが作成されます。このファイルの情報タブで、トリミングの全結果を確認することができます。

つぎに、Sample Reads (trimmed) ファイルを選択し、Sequence → Merge Paired Reads と進み、ペアリードを1つの配列にマージします。

| 🔴 🔘 🔵 Mer | ge Paired Reads |
|-------------------------|--------------------------------------|
| BBMerge Paired Read Mer | rger Version 38.84 by Brian Bushnell |
| Merge Rate: | Normal ᅌ |
| 🛠 🛛 😵 More Options | Cancel |

これで、マージされたリードとマージできなかったリードの 2 つのファイルができあがります。マージ されたリードのファイルを、次のステップのインプットとして使用します。

第19回 CRISPR 編集結果の解析(その2) へつづく

Geneious 製品概要・フリートライアルリクエストについてはこちら

『Geneious Prime でシークエンス解析』の過去の記事は<u>こちらでチェック!</u>



TDB News 4. 2023 トミーデジタルバイオロジー株式会社 Phone 03-6240-0843 Fax 03-6240-0461