猫も杓子も

Geneious Prime でシーケンス解析



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、バリエーション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。

[チュートリアル用データセット](#)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ケンスから得られた 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。

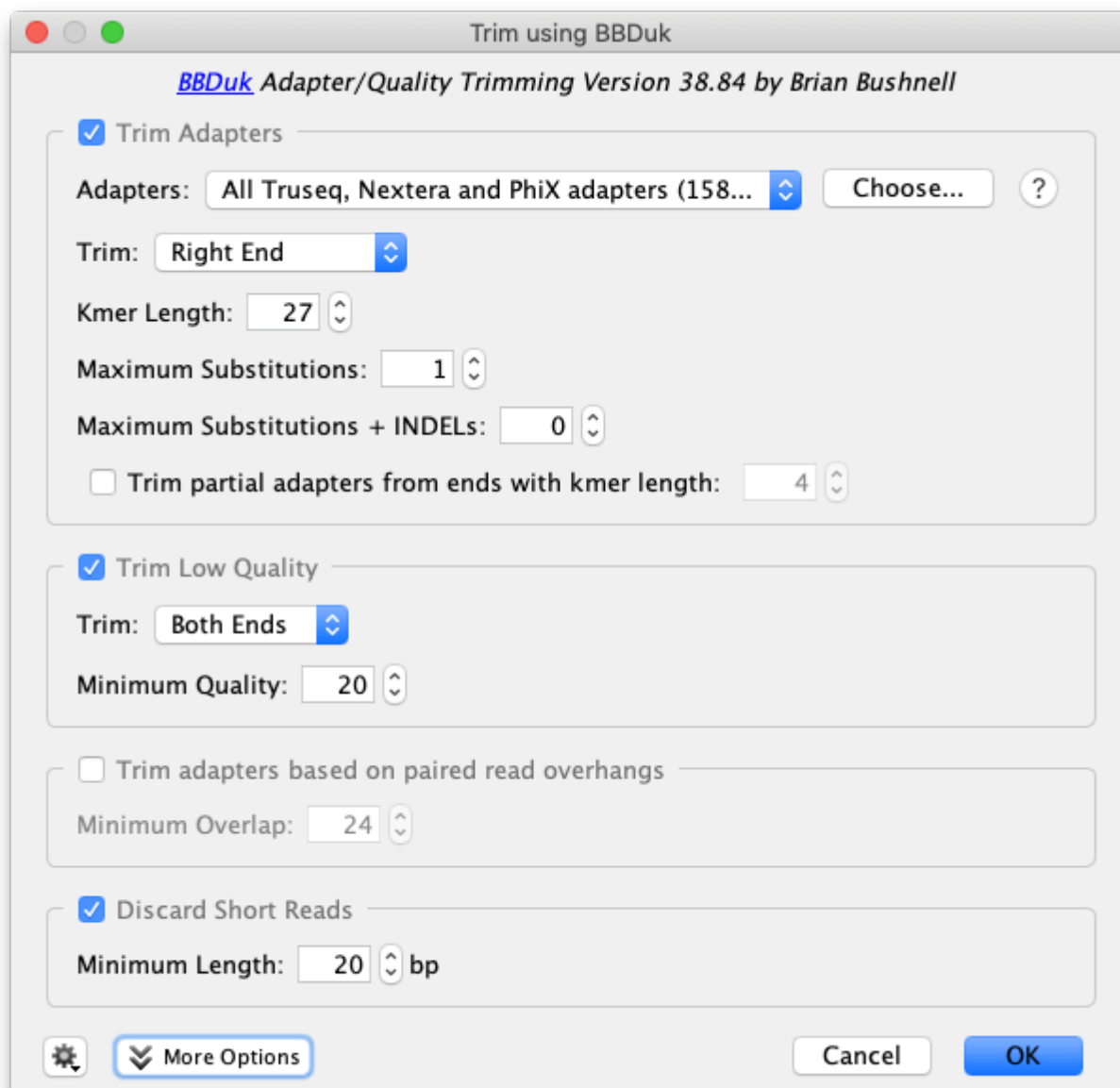
Analyze CRISPR Editing Results は、fastq ファイルからインポートしたアラインされていない NGS リードに対して実行するように設計されています。ペアリードの場合、ファイルをインポートする際に適切なペアリング設定を選択する必要があります。また、ペアリングされたリードは、解析を実行する前にマージする必要があります。さらに、マージする前に基本的な Quality トリミングを行い、マージステップの精度を確保することをお勧めします。

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[こちら](#)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。

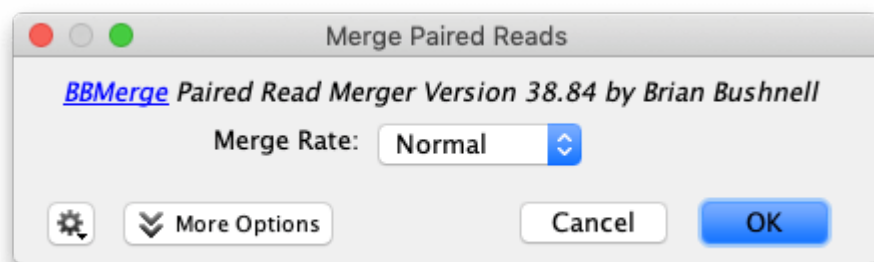
Sample Reads を選択し、Annotate and Predict → Trim using BBDuk に進みます。まず、ウィンドウの左下にある歯車をクリックし、**Reset to defaults** を選択します（現在の設定がデフォルトの場合はグレーアウトしています）。Trim Adapters をチェックし、設定はそのままにします。次に、Trim Low Quality をチェックし、Minimum Quality を 20 に設定します。この設定により、リードの両末端から phred スコアが 20 未満の低クオリティ塩基がトリミングされます。また、トリミング後に短すぎて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。



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。



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 でシーケンス解析』の過去の記事は[こちらでチェック!](#)

