



第20回 CRISPR 編集結果の解析(その3)

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。CRISPR 解析(<u>その1</u>、<u>その2</u>) 最後の今回(その 3)は、解析結果の解釈についてご紹介し ます。

チュートリアルデータでは Analyze CRISPR Editing Results ツールによる解析の終了後、Apc Reference CRISPR Variants for Sample Reads (trimmed) (merged) というコンティ グドキュメントが作成されるはずです。通常のリファレンスマッピングで用いられる map to reference の出力結果と似ていますが、各リードがリファレンス配列にマッピングされるのではなく、 以下のスクリーンショットに示すように、各クラスターの代表1つだけがマッピングされています。

Consensus	110	120 222 TCCCTT	130 GACAGTTTT	140 GAGAGTE GET	150 TCCATTGCCA	160 GETETGTTE	170 AGAGTGÁGECA	180 TG-TAGTGG	190 AATGGTGAG	200 TGGCATCATA	210 AGECCEAGTG	220 ACCTTCCAG	225 2	(30 (777777)
Coverage 01														
> Apc Reference		AGETECETT	GACAGTTTT	98 GAGA <u>GTE GE</u>	TCEATTGCEA	78 6стст <u>ат</u> те	68 AGAGTGÅGCCA	60 TGETÁGTGG	51 AATGGTGAG	41 TGGCAŤCATA	31 MGCCCCAGTG	21 ACCTTCCAG	16 ATAGTO	11 стабасл
	>> Ap	c gene												
53.63% No nucleione Varianti (20,059 reads, in 77.85% frame shift 2 bp deletion (15,484 read., 5.58% In frame protein variant 3 bp deletion (3.56% In frame shift 1 bp insertion (4,108 reads, 3.56% In frame shift 1 bp deletion (2,575 reads, I 3.97% Frame shift 1 bp deletion (1,382 reads, I 5.95% Frame shift 1 bp deletion (1,382 reads, I 5.95% frame shift 1 bp deletion (1,382 reads, I 5.95% frame shift 2 bp deletion (1,382 reads, I 1.51% In frame protein variant 24 bp deletion (1.43% In frame spoten variant 24 bp deletion (1.17% Frame shift 2 bp deletion (1,032 reads, I 1.17% Frame shift 2 bp deletion (1,032 reads, I 1.17% Frame shift 2 bp deletion (1,032 reads, I 1.17% Frame shift 2 bp deletion (999 reads, I 1.04% Frame shift 2 bp deletion (899 reads, I 0.92% In frame stop codon 6 bp deletion (802 0.85% Frame shift 4 bp insertion (506 reads, I 0.86% Frame shift 2 bp deletion (909 reads, I 0.86% Frame shift 2 bp deletion (203 reads, I 0.86% Frame shift 2 bp deletion (203 reads, I 0.86% Frame shift 3 bp insertion (506 reads, I 0.86% Frame shift 3 bp deletion (203 reads, I 0.85% Frame shift 5 bp deletion (200 reads, I					ICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA TICATIGCA	64 TE 164 TE 64 TE 64 TE 164 TE 64			ANTIGOTIAN ANTIGOTIAN ANTIGOTIAN ANTIGOTIAN ANTIGOTIAN ANTIGOTIAN ANTIGOTIAN ANTIGOTIAN ANTIGOTIAN ANTIGOTIAN ANTIGOTIAN ANTIGOTIAN ANTIGOTIAN ANTIGOTIAN ANTIGOTIAN ANTIGOTIAN	1000 ATC ATT AT A TO A TO A TO A TO A TO A T				

マッピングされた配列の名称は以下のような形式となっています。

バリアント頻度% バリアント効果(クラスター内の総リード数, クラスター内の推定シークエンシング エラーを含むリード数)

例:17.85% Frame shift 2 bp deletion (15,484 reads, including 483 with sequencing errors)

今回は解析設定時の Variants of Interest の設定により、カットサイトと思われる位置の上/下流 50 bp のみを表示するようにトリミングされています。この領域はリードを同一のクラスターにまと めるために使用され、この領域外のバリアントは考慮されていません。 Geneious は、バリアントの多い位置をもとにカットサイトを自動的に決定します。アルゴリズムの詳細については、Geneious Prime User Manual(英語版)をご参照ください。

バリアントなしのリードの割合とノックアウトバリアントのリードの割合など、データセット全体の結果は、Description of the Contig documentに表示されています。より詳細な結果については、 ドキュメントの Info タブで確認することができます。

Add Meta-Data 🥜 Edit Meta-Data Types 🚡 Save		0.00	Properti
Name	Apc Reference CRISPR Variants for Sample Reads (trimmed) (merged)		Histor
Description	23.9% no variant. 55.9% knock out (53.1% frame shift, 2.8% in frame stop codon)		
Folder	Local/Analysing CRISPR results/Tutorial		
Created	03 Aug 2020		
Free end gaps:	true		
Modified	03 Aug 2020		
Topology	linear		
Notes	No value		
itput		×	
utput: 55.9% knock out (53.1% frame shift, 2.8% in fram 23.9% no variant. 76.1% protein variant. 0.0% sile	e stop codon) nt variant.		
 100.0% of reads (87,403 of 87,431) aligned to ref 96.6% of reads (84,461 of 87,431) aligned suffici Reference sequence range covered: 1 → 237 23.85% No nucleotide variant (20,691 reads, incl 17.85% Frame shift 2 bp deletion (15,484 reads, i 6.58% In frame protein variant 3 bp deletion (5,70 4.74% Frame shift 1 bp insertion (4,108 reads, inc 3.56% In frame protein variant 3 bp deletion (5,70 4.74% Frame shift 1 bp insertion (2,955 reads, inc 1.59% Frame shift 1 bp deletion (2,575 reads, inc 1.59% Frame shift 1 bp deletion (2,575 reads, inc 1.58% In frame protein variant 2 bp deletion (1, 1.58% In frame protein variant 24 bp deletion (1, 1.51% In frame protein variant 12 bp deletion (1, 1.51% In frame protein variant 12 bp deletion (1, 1.30% Frame shift 2 bp deletion (1,127 reads, inc 1.19% Frame shift 2 bp deletion (1,035 reads, inc 1.15% Frame shift 2 bp deletion (930 reads, inc 1.07% Frame shift 2 bp deletion (737 reads, inc 0.92% In frame stop codon 6 bp deletion (802 read 0.85% Frame shift 4 bp deletion (737 reads, incl 0.92% In frame shift 4 bp deletion (536 reads, incl 0.92% In frame shift 4 bp deletion (536 reads, incl 0.92% In frame shift 4 bp deletion (536 reads, incl 0.92% In frame shift 4 bp deletion (536 reads, incl 0.92% In frame shift 4 bp deletion (536 reads, incl 0.92% In frame shift 4 bp deletion (536 reads, incl 0.92% In frame shift 4 bp deletion (536 reads, incl 0.92% In frame shift 4 bp deletion (536 reads, incl 0.93% Frame shift 4 bp deletion (536 reads, incl 0.94% Frame shift 4 bp deletion (536 reads, incl 0.94% Frame shift 4 bp deletion (erence. ently well to range covered. uding 752 with sequencing errors) ncluding 483 with sequencing errors) 16 reads, including 208 with sequencing errors) 19 reads, including 12 with sequencing errors) 10 uding 104 with sequencing errors) 10 uding 100 with sequencing errors) 10 uding 100 with sequencing errors) 13 reads, including 32 with sequencing errors) 13 reads, including 35 with sequencing errors) 13 reads, including 35 with sequencing errors) 13 reads, including 35 with sequencing errors) 13 reads, with sequencing errors) 13 reads, with sequencing errors) 14 reads, with sequencing errors) 12 uding 36 with sequencing errors) 12 uding 36 with sequencing errors) 12 uding 36 with sequencing errors) 13 with sequencing errors) 13 reads, including 47 with sequencing errors) 13 reads, including 47 with sequencing errors) 14 uding 36 with sequencing errors) 15 uding 37 with sequencing errors) 16 uding 37 with sequencing errors) 16 uding 37 with sequencing errors) 16 uding 37 with sequencing errors) 17 uding 37 with sequencing errors) 18 uding 37 with sequencing errors) 19 uding 31 with sequencing errors) 19 uding 32 with sequencing errors) 10 uding 34 with sequenci		

結果はビューアーの上の Annotations タブを表示することにより、表形式で出力することもできます。各代表配列には、効果、頻度、バリアント塩基などのバリアントの統計情報を含むバリアントのア ノテーション(シークエンスビューアーのデフォルトではオフになっています)が表示されます。この情報は、Annotations テーブルで表示することができ、.csv フォーマットでエクスポートすることができます。

🛁 Type: Variant 🔠 Track 🕂 Columns 🛃 Expo	rt table 🏟	Edit Annotation 🕒 Extract	😚 Translate 📄 Save	₽	P			
Sequence Name Name	Length	Variant Effect	Variant Frequency v	Reference Nucleotide(s)	Variant Nucleotide(s)	Variant Raw Frequency		
17.85% Fram Frame shift 2 bp deletion	0	Frame shift	17.85%	GT		15,484		
6.58% In fra In frame protein variant 3 bp	0	In frame protein variant	6.58%	AGT		5,706		
4.74% Frame Frame shift 1 bp insertion	1	Frame shift	4.74%		Т	4,108		
3.56% In fra In frame protein variant 3 bp	0	In frame protein variant	3.56%	ATG		3,089		
3.41% Frame Frame shift 1 bp insertion	1	Frame shift	3.41%		A	2,955		
2.97% Frame Frame shift 1 bp deletion	0	Frame shift	2.97%	G		2,575		
1.59% Frame Frame shift 1 bp deletion	0	Frame shift	1.59%	т		1,382		
1.58% In fra In frame protein variant 24 bp	0	In frame protein variant	1.58%	AGCCATGTAGTGGAAT		1,375		
1.51% In fra In frame stop codon 1 bp sub	1	In frame stop codon	1.51%	с	Т	1,313		
1.48% In fra In frame protein variant 12 bp	0	In frame protein variant	1.48%	AGCCATGTAGTG		1,285		
1.30% Frame Frame shift 1 bp insertion	1	Frame shift	1.30%		G	1,127		
1.19% Frame Frame shift 2 bp deletion	0	Frame shift	1.19%	TA		1,035		
1.17% Frame Frame shift 5 bp deletion	0	Frame shift	1.17%	TAGTG		1,012		
1.15% Frame Frame shift 20 bp deletion	0	Frame shift	1.15%	CCATGTAGTGGAATGG		999		
1.07% Frame Frame shift 4 bp deletion	0	Frame shift	1.07%	TGTA		930		
1.04% Frame Frame shift 10 bp deletion	0	Frame shift	1.04%	TAGTGGAATG		899		
0.92% In fra In frame stop codon 6 bp dele	. 0	In frame stop codon	0.92%	TAGTGG		802		
0.85% Frame Frame shift 4 bp deletion	0	Frame shift	0.85%	CATG		737		
0.76% Frame Frame shift 1 bp insertion	1	Frame shift	0.76%		C	656		
0.68% Frame Frame shift 8 bp deletion	0	Frame shift	0.68%	CCATGTAG		586		
0.58% Frame Frame shift 2 bp insertion	2	Frame shift	0.58%		GT	506		
0.56% Frame Frame shift 5 bp deletion	0	Frame shift	0.56%	CCATG		490		

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 6. 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