DOI:10.3969/j.issn.1672-5565.20161215001

Phred/Phrap/Consed/Polyphred:类 Unix 平台的测序数据管理和 SNP 识别软件包

吴丹丹,阮　伋,王永安,孙　昌*
(云南生物资源保护与利用国家重点实验室(云南大学),昆明 650091)

摘　要:尽管二代基因组测序技术日渐流行,Sanger 测序依旧是 SNP 识别和分析的金标准。传统对于 Sanger 测序结果的分析多依赖 SeqMan 等软件进行。然而这类软件大多依靠人工操作来识别和记录测序结果中的 SNP 位点,效率低下且容易发生错误。此外,当对多个个体进行序列测定时,这类软件无法完成对群体数据的管理和输出,给研究人员造成了一定的不便。Phred/Phrap/Consed/Polyphred 是华盛顿大学开发的基于类 Unix 平台的软件包,在大规模测序数据的管理和 SNP 自动识别、标记与输出方面具有强大的功能。然而,由于其安装和使用较为复杂,在国内较少使用。本研究对该软件包的功能、使用流程、特点等进行了介绍,并将其安装于 Ubuntu12.04 操作系统并置于 VMware 虚拟机中,方便遗传学者的下载和使用。

关键词:polyphred;类 Unix 平台;测序数据管理;SNP 识别;软件包
中图分类号:Q31　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1672-5565(2017)03-196-05

Phred/Phrap/Consed/Polyphred: a software package for sequencing data management and SNP detection on Unix-like platform

WU Dandan, RUAN Ji, WANG Yongan, SUN Chang*
(*State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan*(*Yunnan University*),*Kunming* 650091, *China*)

Abstract: Although next-generation sequencing is more and more popular in current era, Sanger sequencing is still the gold standard for SNP detection and analysis. The analysis for Sanger sequencing is usually performed by softwares such as SeqMan. However, these softwares usually identify and record SNPs manually, which is low-efficiency and prone to error. Moreover, when multiple individuals are involved for sequencing, these softwares cannot organize and output the result for population, which cause some inconvenience for researchers. Phred/Phrap/Consed/Polyphred is a software package based on Unix-like operating system from University of Washington with powerful function in sequencing data manage and SNP detection, mark, and output. However, due to the complexity in setup and utilizing, this package is hardly used in Chinese genetic community. The function, working flow, and character of this package were introduced. Moreover, the software was installed in Ubuntu and enclosed in VMware virtual machine, which can facilitate the download and usage for genetic researchers.

Keywords: Polyphred; Unix-like platform; Sequencing data management; SNP detection; Software package

尽管二代基因组测序(next-generation sequencing)技术日渐流行,Sanger 测序依旧是 SNP 识别和分析的金标准。一般对 Sanger 测序结果的分析多依赖于 Windows 平台的 SeqMan (DNASTAR Inc.)等软件进行。然而这类软件大多在测序数据与参考序列拼接后依靠肉眼观察来识别和记录测序结果中的 SNP (single nucleotide polymorphism)位点,效率低下且容易发生错误。更为重要的是,当对多个个体进行序列测定时,这类软件无法完成对群体数据的自动比较、管理和输出,给研究人员带来了

收稿日期: 2016-12-15;**修回日期**:2017-03-14.
基金项目:国家自然科学基金(31260266).
作者简介:吴丹丹,女,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学;E-mail:903381300@qq.com.
*通信作者:孙昌,男,博士,研究员,研究方向:人类遗传学;E-mail:sunchang1@foxmail.com.

一定的不便。

Phred/Phrap/Consed/Polyphred 是华盛顿大学(University of Washington)开发的基于类 Unix 平台(包括 Unix、Linux、BSD、Solaris、Mac OS X 等)的软件包[1-8],在群体测序数据的管理和 SNP 自动识别、标记与输出等方面具有强大的功能。然而,由于其安装、设置和使用较为复杂,在国内较少使用。鉴于此,本文对该软件包的组成、功能、使用和特点等进行了总结和介绍。

1　软件包主要组分

该软件包由多个可执行文件和 Perl 脚本组成,主要组分及其功能见表 1。这些组分中,Phred[1-2]、Phrap、Consed[3-5]、Polyphred[6-8]是作为软件包核心的可执行程序,其余均为调用这些可执行程序完成特定功能的 perl 脚本。

表 1　软件包主要组分和功能

Table 1　The main component and function of the software package

程序名称	功能
Phred	测序胶图文件读取、碱基判断和测序质量评估的可执行文件
Phrap	拼接测序数据的可执行文件
Consed	查看、编辑拼接测序数据的图形化工具
Polyphred	SNP 搜索和显示的可执行文件
setup_std_dir.pl	在当前目录内建立多个工作文件夹
moveChromats	调用 Phred 对 newchromats 目录内的新测序数据进行质量判断,并转移入相应文件夹
fasta2Phd.perl	将 fasta 格式的参考序列转为 phd 格式
phredPhrap	调用 Phrap,对测序数据和参考序列进行初次拼接,一般仅在项目初始时使用一次
2fof.pl	对 chromat_dir 目录中的测序文件和特定 ace 文件进行比对,列出新的测序文件
creatpoly.pl	对 2fof.pl 列出的每个新测序文件,生成 poly 文件
polyphredref2pb.pl	对于指定的个体,根据指定的 ace.out 文件,输出 prettybase 格式文件

2　使用流程

使用流程如图 1 所示,具体说明如下。

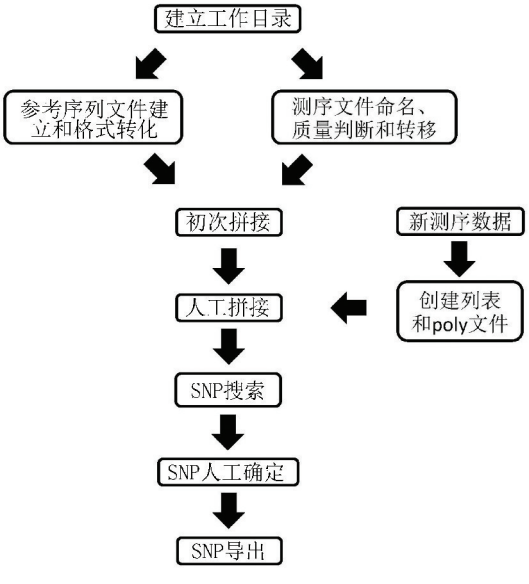


图 1　软件包的使用流程

Fig.1　The working flow of the software package

2.1　建立工作目录

在任意目录内,运行 setup_std_dir.pl 脚本,即可自动在该目录下建立工作目录,各个文件夹的名称和功能见表 2。

2.2　参考序列建立

人工生成 fasta 格式的参考序列并置于 fasta_dir 目录中,使用 fasta2Phd.perl 脚本转化为 phd 格式,并将其移入 phd_dir 目录。

2.3　测序数据文件命名、质量判断和转移

将所有测序文件按照“基因名_个体名_引物名”的格式进行重命名,并保持大小写和长度一致,以方便后续 SNP 输出;将测序文件置于 newchromats 目录中,运行 moveChromats 脚本,质量较好的数据移入 chromat_dir 文件夹,低质量数据移入 bad_chromats 文件夹。

2.4　初次拼接

进入 edit_dir 目录,使用 phredPhrap 脚本,对 chromat_dir 目录中的测序数据和 phd_dir 目录中的参考序列的进行初次拼接。

表 2 各个工作目录功能

Table 2 The function of each working directory

目录名称	功能
edit_dir	最重要工作目录,存放 ace 文件、拼接信息、临时工作文件等,主要命令均应在此目录下执行
chromat_dir	存放高质量测序文件
phd_dir	存放 phd 格式文件
poly_dir	存放 poly 格式文件
bad_chromats	存放低质量测序文件,该目录内文件不进入分析
fasta_dir	存放 fasta 格式参考序列
newchromats	存放新测序文件,moveChromats 脚本运行后,该目录自动清空

2.5 人工拼接

由于算法的限制,初次拼接的结果往往为多个临近序列的集合(contig)。在这种情况下,在 edit_dir 目录中打开 Consed 界面,利用各个集合中可能重合的部分进行比对,将其拼接成一个完成的集合。具体方法见《使用说明》。

2.6 SNP 搜索

在 edit_dir 目录中运行 Polyphred 程序对每条序列进行等位基因确定,并对拼接的单个集合进行序列间比对,以确定潜在 SNP 位点。这些潜在的 SNP 位点,可在 Consed 界面中以高亮显示。

2.7 SNP 人工确定

在 edit_dir 目录中打开 Consed 界面,对于 Polyphred 搜索结果进行人工检视、修订和确认,以确定各条序列在该位置的基因型和 SNP 的真实性。这是整个数据处理过程中耗时最多的部分,具体方法见《使用说明》。

2.8 SNP 导出

生成包含需要导出个体名的文本文件。利用 polyphredref2pb.pl 脚本,指定其在测序文件名中的起始位置和长度,导出 prettybase 格式的群体变异文件,用于后续制图、计算或分析,具体方法见《使用说明》。

2.9 新数据加入

对于新加入的测序数据,经测序数据文件命名、质量判断和转移步骤后,使用 2fof. pl 脚本,对 chromat_dir 目录中的测序数据和指定 ace 文件进行比对,生成新测序文件的列表(fof 格式),并使用 creatpoly.pl 脚本对该列表中的新测序文件生成相关 poly 文件。在 Consed 界面中,将新测序数据加入集合,并重复人工拼接、SNP 搜索、SNP 人工确定、SNP 导出步骤,对新增数据进行分析。

3 软件包特点

3.1 基于类 Unix 平台、命令行式操作方式

该软件包主要可执行程序均只有类 Unix 操作系统版本,无 Windows 版本。除人工拼接、SNP 搜索部分在 Consed 界面中以图形化方式操作外,其他主要工作均以命令的方式进行。这给初学者,尤其是不熟悉类 Unix 操作系统的学者,带来了一定的困难和麻烦。但是,由于需要掌握的命令不多,且类 Unix 操作系统多具有命令补齐和自动记录的功能,经一段时间练习后,大多使用者均可熟练使用该软件包。

3.2 标签式管理方式

常见 Windows 平台的 SeqMan 等软件在遇到测序数据基因型判断失误、新发现 SNP 位点时,只能通过人工记录来保存数据分析过程和结果,极其不便且效率低下。与此不同的是,本软件包在序列处理过程中,Phred 生成的质量评估结果、Polyphred 生成的基因型判断、Consed 界面中基因型的人工确认等各种处理分析结果,均以文本标签的形式,自动保存于 ace 或 ace.out 文件中。这些标签,由 Consed 读取,在界面中以不同颜色显示于序列相应位置上。所有标签,均可以手动在 Consed 界面中删除,或使用特定命令直接删除。在 Polyphred 自动生成的基因型与人工判断不一致时,优先输出人工标签。这种管理方式,在不改变原始测序文件的基础上,保存了数据处理过程的所有细节,同时方便了结果的输出。

3.3 数据管理、SNP 数据输出的自动化

常见 Seqman 等软件,在 SNP 识别、数据管理和输出方面,只能依赖操作者手动进行,效率低下且容易发生错误。本软件包在数据管理等方面具有较高程度的自动化,主要表现在:1)相同个体、引物多次测序数据的自动整理。在研究过程中,由于各种原因,有时需对同一个体应用同一引物进行多次测序,对于这种情况,软件会自动在测序文件名后加入“.1”、“.2”等后缀,分别代表第 1、2 次测序结果,并在后续分析中整合判断位点基因型;2)多态位点和质量的自动判断。对于测序结果,软件包会对每个个体进行比对,任何一个个体出现突变的位点,均视为潜在多态性位点,用特殊颜色标记以待人工检视;对于测序数

据的低质量部分,会自动使用黄色背景表示,从分析中剔除;3)数据输出自动化。对于群体的测序数据,可输出每个个体的基因型,用于后续分析。

4　需要说明的问题

4.1　序列删除

当需要去除特定序列时,可使用操作系统自带的文本编辑工具(如 vi、Emacs、gedit 等),建立一个含有需要去除测序文件名列表的文本文件,以回车键分隔(与下述 fof 后缀文本文件格式相同),并保存于 edit_dir 文件夹中。打开 Consed 界面,点击“Remove reads”,选择生成的文本文件,即可从集合中去除指定的测序数据。进而从 chromat_dir 文件夹中删除这些测序文件,以避免其在下一次加入新测序数据时被软件自动加入测序集合。

4.2　质量判断失误

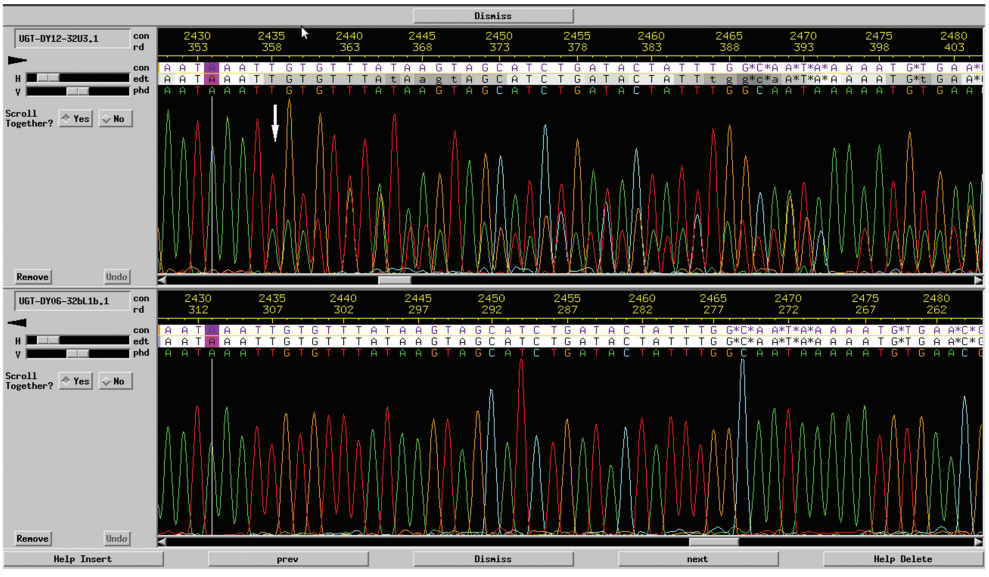
一般而言,该软件包对测序质量的判断较为准确。但当测序后纯化处理不当时,测序数据前端经常出现一个巨大的、横跨多个碱基的非特异峰形(俗称“酒精峰”),从而导致其下的碱基无法识别、后续的碱基峰图高度相对较低,因此 Phred 软件经常将其错误地标为低质量数据,而无法用于分析。对于这种情况,可在 Consed 中手动将其标为高质量数据,进入后续分析流程。

4.3　SNP 自动识别的失效

根据使用经验,Polyphred 的 SNP 自动搜索算法阈值较低,因此有一定的假阳性(即实际并非多态性位点、而被软件标识)率,而假阴性(即实际为多态性位点但软件未能标识)发生的概率极低。本文使用该软件包分析了长达 75.5 kb 的测序数据、多达至 800 个 SNP 位点[9],仅发现了 2 个软件未识别的多态性位点,表明其假阴性率约在 0.25%。假阴性的出现,多源于杂合子个体中两个等位基因的峰型高度差异过大、且稀有等位基因在群体中频率过低(导致无个体携带纯合稀有等位基因)。对于可能出现的假阴性,目前尚无良好、快速的解决办法,只能通过肉眼观察和比较测序胶图予以确定。

4.4　插入缺失(indel)的确定

Polyphred 软件具有自动识别 indel 的功能,但根据本文经验,其错误率较高、且无法识别 indel 的两个具体等位基因,因此建议对 indel 进行人工识别和标注(软件只允许标注为++、+-、--,不能标注具体序列)。对于两个等位基因都有纯合子个体的情况,可通过比对直接获得具体基因型。对于未发现稀有等位基因纯合子的情况,可通过分析杂合子个体序列胶图获得基因型信息。如图 2 上部所示,从白色箭头所指的位置开始的 15 个碱基,每个位置的基因型为(A/T)(A/G)(A/T)(T/G)(T/T)(T/G)(T/T)(A/G)(T/T)(A/T)(A/T)(A/G)(T/T)(A/A)(A/G)。已知其中参考等位基因序列为 TGTGTTTATAAGTAG(图 2 下部),则另一等位基因序列为 AAATTGTGTTTATAA,即为一个 AAAT 的插入。



* 白色箭头代表 indel 起始的位置。

图 2　Consed 中杂合和纯合的 indel 示例

Fig.2　The example for homozygous and heterozygous indel in Consed

4.5 相关主要文件格式说明

整个软件包处理过程中生成多种格式文件,大多为文本格式,主要文件格式说明如下。

phd:Phred 对每个测序胶图文件均生成一个对应的同名 phd 格式文件,存放该测序胶图的碱基、质量、位置等信息[10]。

poly:Phred 对每个测序胶图文件均生成一个对应的同名 poly 格式文件,存放该测序胶图的碱基、位置、峰面积等信息,用于后续突变检测。

ace:Consed 读取、保存文件格式,保存有该 contig 中所有序列名称、碱基等信息。

wrk:Consed 生成的临时文件,用于存储在 Consed 软件上的工作过程。当 Consed 意外停止运行时,可从 wrk 文件恢复之前的未保存修改。

ace. out: Polyphred 输出格式文件,包含 Polyphred 运行时间、参数、结果,以及每条测序胶图在特定位点的基因型等信息。

prettybase:群体遗传学中常用的基因型数据文件格式,可用 polyphredref2pb.pl 脚本从 ace.out 文件中导出。一般由 4 列组成,第 1 列为位置,第 2 列为个体名,第 3、4 列为两个等位基因的基因型,其中 A/C/T/G、+/-、N 分别代表 4 种碱基、indel、未确定碱基,X 代表该个体不同测序数据存在矛盾,应人工检视以消除。

fof:2fof.pl 脚本生成的新测序文件的列表,每行为一个新的测序文件名,以回车键分隔。

5 下载方法

研究者可通过电子邮件向华盛顿大学各个软件负责人免费申请该软件包的非商业许可,联系方式见如下网页: http://www. phrap. org/index. html (Phred/Phrap/Consed) 和 http://droog.gs.washington.edu/polyphred/(Polyphred)。经包括本文通信作者在内的多名研究者安装测试表明,该软件包的 Linux 版本,可在 Redhat 8.0、Ubuntu 8.04/12.04/14.04 等不同 GNU/Linux 版本中正常运行和使用,表明该软件包具有较好的可移植性。

为方便研究者使用,本文将该软件包安装于 Ubuntu 12.04 操作系统中,下载链接 http://pan.baidu.com/s/1slanyAL。研究者只需下载并导入 VMware 虚拟机,即可直接使用。详细使用说明见该压缩包中《使用说明》文件。

参考文献 (References)

[1]WING B, HILLIER L, WENDL M C, et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment [J]. Genome Research, 1998, 8(3): 175-185.DOI: 10.1101/gr.8.3.175.

[2]EWING B, GREEN P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities[J]. Genome Research, 1998, 8(3):186-194.DOI: 10.1101/gr.8.3.186.

[3]GORDON D. Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed[M]// BAXEVANIS A D, DAVISON D B, eds. In Current Protocols in Bioinformatics. New York: John Wiley & Co., 2004, 11.2.1-11.2.43. DOI: 10.1002/0471250953.bi1102s02.

[4]GORDON D, DESMARAIS C, GREEN P. Automated finishing with Autofinish [J]. Genome Research, 2001, 11(4): 614-625. DOI: 10.1101/gr.171401.

[5]GORDON D, ABAJIAN C, GREEN P. Consed: a graphical tool for sequence finishing [J]. Genome Research, 1998, 8(3):195-202.DOI:10.1101/gr.8.3.195.

[6]NICKERSON D A, TOBE V O, TAYLOR S L. Polyphred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(14): 2745-2751.DOI: 10.1093/nar/25.14.2745.

[7]STEPHENS M, SLOAN J S, ROBERTSON P D, et al. Automating sequence-based detection and genotyping of SNPs from diploid samples [J]. Nature Genetics, 2006, 38(3): 375-381.DOI: 10.1038/ng1746.

[8]BHANGALE T R, STEPHENS M, NICKERSON D A. Automating resequencing-based detection of insertion-deletion polymorphisms[J]. Nature Genetics, 2006, 38(12):1457-1462.DOI: 10.1038/ng1925.

[9]SUN C, SOUTHARD C, HUO D, et al. SNP discovery, expression, and cis-regulation variation in the UGT2B family [J]. The Pharmacogenomics Journal, 2012, 12(4): 287-296. DOI: 10.1038/tpj.2011.2.

[10]王俊. 常用生物数据分析软件[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 13-61.
WANG Jun. Common analysis software for biological data[M]. Beijing: Science Press, 2008, 13-61.