

NGS Analiz Raporu

16S / ITS / 18S Metagenom Analizi
QIIME -OTU

BM LABOSİS
2018

Rapor İçeriği

1. ANALİZ ADIMLARI

2. PROJE BİLGİLERİ

3. DENEY ADIMLARI

4. ANALİZ SONUÇLARI

4.1. HER ÖRNEK İÇİN OKUMA SAYISI

4.2. İŞLENMİŞ DATA KALİTESİ

4.3. TAKSONOMİK İÇERİK

4.4. ÇEŞİTLİLİK ANALİZİ

4.4.1. ALFA VE BETA ÇEŞİTLİLİK ANALİZİ

4.4.2. TEMEL KOORDİNATLAR ANALİZİ

4.4.3. CLUSTER ANALİZİ

5. REFERANS



1. Analiz Adımları

1. HAM DATA KALİTE KONTROLÜ

Fastqc dosyalarının kalitesinin kontrolü. (Fastqc)

Phred skorları 20 nin altında olan okumaların çıkarılması. (FASTX)

Read kalitesinin kontrolü. (Fastqc)

2. BİRLEŞTİRME

Paired-end readlerin birleştirilmesi. (QiiME)

3. KİMERİK OKUMALARIN BELİRLENMESİ (QiiME)

4. FİLTRELEME

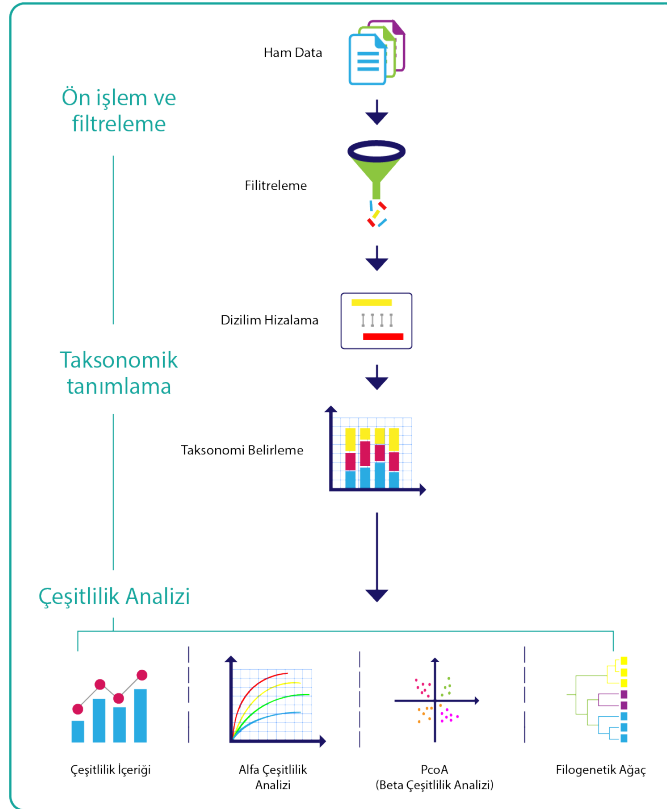
Phred skorları 20'den küçük olan readlerin, primer ve barkodların filtrelenmesi.Kimerik okumaların filtrelenmesi.

5. TAKSONOMİNİN BELİRLENMESİ

Her örnek için taksonomik türlerin belirlenmesi. (Qiime)

6. ÇEŞİTLİLİK ANALİZİ

Alfa ve Beta çeşitlilik analizi. (Qiime)



2. Proje Bilgileri

Müşteri Bilgisi	BM LABORATUVAR SİSTEMLERİ
Kurum Adı	BM LABORATUVAR SİSTEMLERİ
Read Çeşidi	Paired-end
Read Uzunluğu	D44
Örnek Sayısı	E4
Reagent	MiSeq Reagent Kit
Sekans Planformu	MiSeq System

3. Deney Adımları

3.1 Örneklerin Hazırlanması

Kütüphane oluşturmak için örneklerden DNA izolasyonu ve kalite kontrolü yapılır.

3.2. Kütüphane Hazırlama ve Dizileme:

Kütüphane hazırlama iş akışında iki amplifikasyon adımı bulunmaktadır: lokus-spesifik PCR primerlerini kullanan bir başlangıç PCR ve devamında ilgili akış hücresi bağlanma etki alanlarını ve tekli endeksleri birleştiren bir amplifikasyon (NexteraXT Index Kit, FC-131-1001/FC-131-1002).

Bu metot ile iki gen bölgesinin çoğaltılması yapılmaktadır:

- I. Bakteriyel popülasyonu bileşimlerini karakterize etmeyi amaçlayan 16S rRNA geninin değişken V3-V4 bölgelerini veya V1-V2 bölgeleri
- II. Mantar popülasyonu sınıflandırılması için ITS bölgesi
- III. Ökaryotik 18S rRNA bölgesi



3.3 Sekanslama

MiSeq platformu kullanarak kütüphanelerin dizinlemesi iki uçtan 300-bp okuma uzunluğu ile gerçekleştirilir.

3.4 Standart Biyoinformatik Analiz:

BM Laboratuvar sistemleri 16S, ITS ve 18S amplikon dizilerini analiz etmek için biyoinformatik analiz hattı oluşturmuştur.

Açıklama:

Okumalar, Illumina indeksleme sistemine dayalı olarak ayrıştırılır (de-multiplex). Amplikonun uzunluğu, ilgili sıralama uzunluğu ile uyumlu ise, 3'- uçları üst üste getirilerek konsensüs okuma dizi oluşturmak için kullanılırken, kalanlar ayrılmış çiftler olarak tutulurken, 16S dizileme için sadece örtüşen okumaların korunmasını zorunlu tutuluyor. Daha sonra 3'-kuyruklarda düşük kaliteli okumaları kaldırmak için bir kırpma işlemi uygulanır. En az 200 bp uzunluğunda kalan okumalar korunarak analizler için kullanılır. 5'-ucundaki herhangi bir primer dizisi kaldırılır ve işlem sırasında dikkate alınmaz.

QIIME biyoinformatik analiz adımları takiben, kimera filtreleme, tekrarlı dizilerinin gruplandırılması; azalan bolluğa göre dizileri sıralama ve OTU tanımlanması. Operational Taxonomic Unit (OTU), sorgu dizilerini toplama, sentroidlerle temsil

edilen kümeler halinde gruplamayı amaçlıyor. Her bir sentroid, üye dizileriyle benzerlik düzeyini paylaşır. Her projenin ihtiyacına ve örnek sayısına bağlı olarak iki analiz yöntemi benimsenebilir. Farklı şekilde istenmediyse, açık referans algoritması varsayılan yaklaşım olarak kullanılır. Tüm okumalar, primer sekanların ve düşük kaliteli bazların çıkarılmasından sonra minimum 200 bp'lik bir uzunluğa sahip olmaları durumunda analizde kullanılır. 3'-uçlarında üst üste binen eşleştirilmeye izin veren okumalar, tek parçaya birleştirilir ve atama doğruluğunu geliştirmek için kullanılır. Üst üste binmeyi desteklemeyen okumalar, alt işlem için havuzda tutulur. RDP sınıflandırıcı ve Referans veri tabanı, 0.50 minimum güven eşiği ile taksonomi atamak için kullanılır.

Referans veri tabanları

- 16S: GreenGene Veritabanı
- 18S Internal Veritabanı
- ITS UNITE Veritabanı



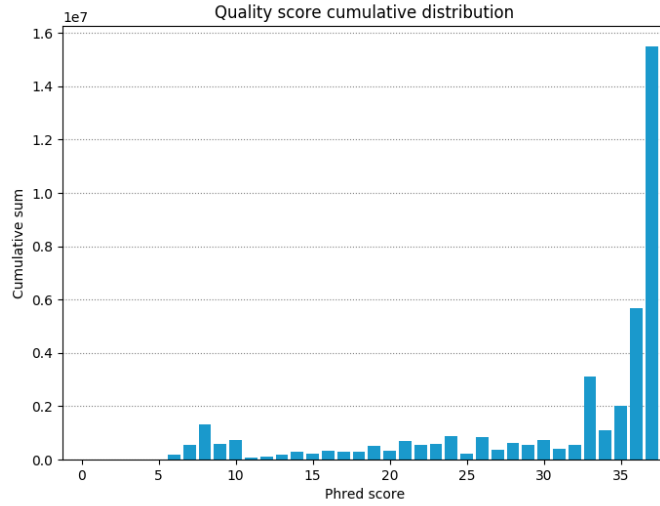
Araştırmacıya Hazırlanan Dosyalar

- **Metagenom Analiz Raporu** dosyasında, araştırmacının elde ettiği tüm verilerin genel sonuçları listelenmektedir ve elde edilen verilerin kalite istatistikleri, toplam okuma sayıları, ve QIIME biyoinformatik adımlarıyla elde edilen çeşitlilik sonuçlarının önemli çıktıları listelenmektedir.
- **FastQC okuma kalitesi** sonuçlarında .html uzantılı olarak her örneğe ait ham dizilerin detaylı kalite kontrol istatistiklerini, okumaların GC oranını, okumaların baz dağılımlarını ve uzunlukları farklı görsellerde betimlenir. FastQC sonuçları dikkate alınarak biyoinformatik ekibi araştırmacının verisini düzenler ve analize hazır hale getirir.
- **Family Genus Species Bilgileri** klasöründe .html uzantılı olarak işlenmiş ve QIIME analizi tamamlanmış tüm örneklerin toplu halde sütun grafikleri, alan grafikleri ve pasta grafikleri bulunmaktadır. Sütun, alan ve pasta grafikleri; aile, tür ve cins seviyesinde ayrı ayrı hazırlanıp araştırmacıya sunulmaktadır.
- **Pie Chart Cins ve Tür Bilgileri** klasöründe, her örneğin kendi içindeki tür veya cins çeşitliliği, tek pasta grafiğinde yüzdesele oranları verilerek gösterilmektedir.
- **Taksonomik Soy** Listesinde her örneğin kendi içindeki okumalardan elde edilen sonuçlara göre sınıflandırma sonuçları bulunur. Bakteri (16S), mantardan (ITS) yada Ökaryotik (18S) başlayarak örnekteki çeşitlilik, aile, tür ya da cins seviyesine kadar belirlenir.
- **Alfa Çeşitlilik Grafiği** klasöründe .html uzantılı olarak chao1 ve OTU parametreleri seçilerek, örneklerin kendi içlerindeki çeşitlilik farkları görülebilmektedir. Shannon ve Simpson indeksleri kullanılarak elde edilen bu grafiklerde okuma sayısına göre refraction curve (seyreltme eğrisi) çizilmektedir.
- **Beta Çeşitlilik Grafiği** klasöründe .html uzantılı olarak EMPEROR ile üç boyutlu olarak temel koordinatlar belirlenerek (x, y ve z) örneklerin kendi arasındaki çeşitliliğini belirlememizi sağlar. İnteraktif arayüz sayesinde örneklerin diğerlerinden farklılığına her noktadan yaklaşıp uzaklaşarak bakılabilmektedir.
- **Heatmap, Pcoa ve Cluster grafikleri** klasöründe cins seviyesinde tespit edilen ana türler örnek içindeki yoğunluğuna istatistiki değer verilerek analiz edilir ve buna göre örnekler kendi aralarında karşılaştırılır. Ward hiyerarşik kümeleme metodu kullanılarak filogenetik ağaç hazırlanıp farklılıklar karakterize edilir.



4. Analiz Sonuçları

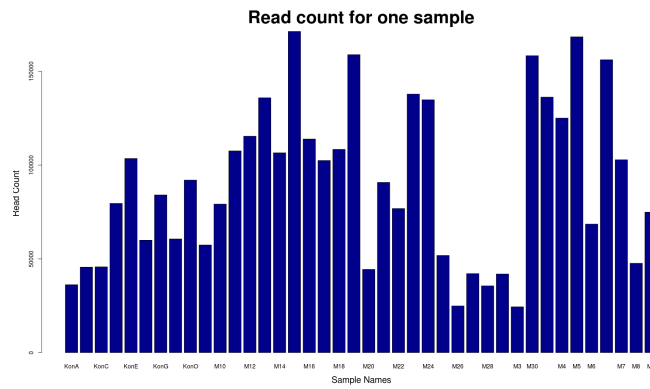
4.1. Data Kalitesi



Quality Score	Error Probability
Q40	0.0001 (1 in 10,000)
Q30	0.001 (1 in 1,000)
Q20	0.01 (1 in 100)
Q10	0.1 (1 in 10)

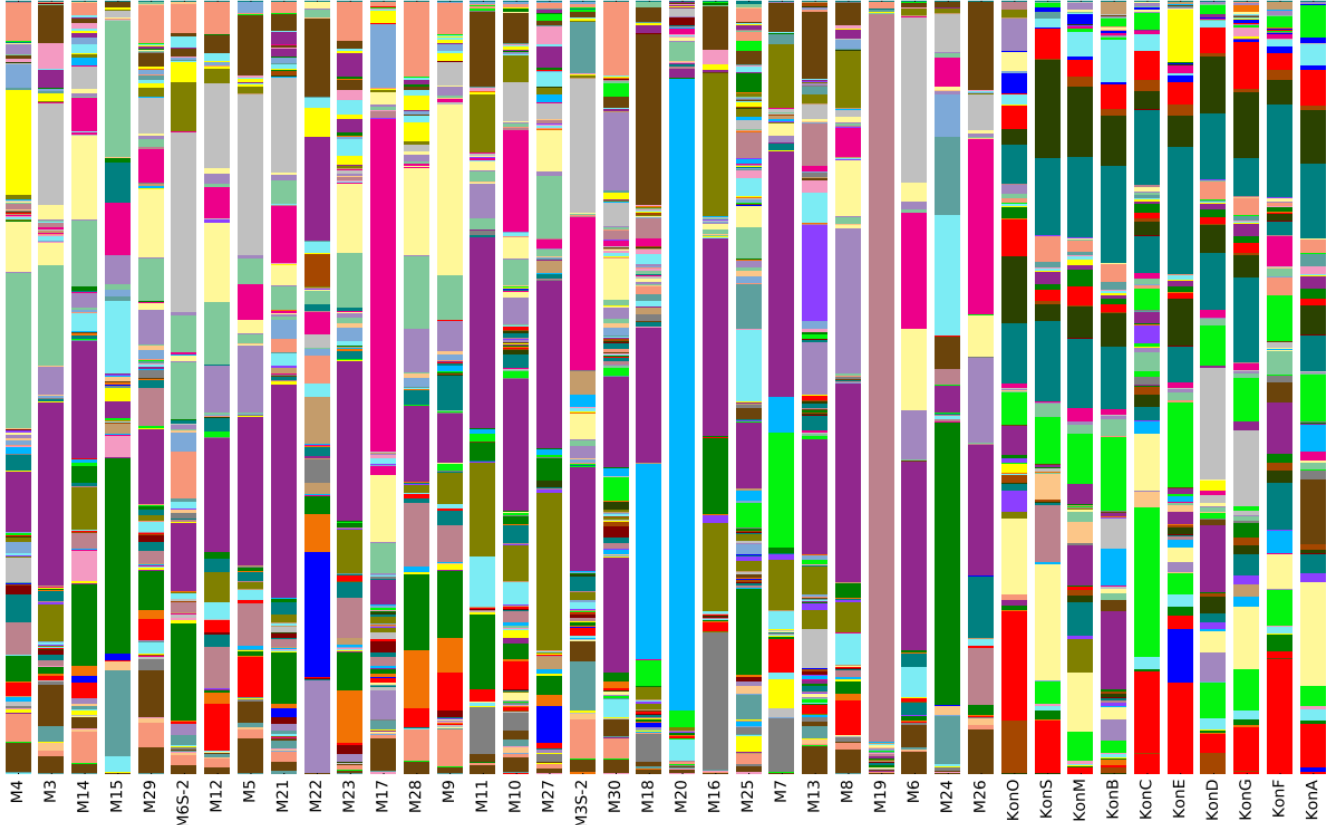
Tablo 1. Illumina kalite skorları ve hata olasılıkları tablosu.

4.2. Her örnek için okuma sayısı



4.3. Taksonomik İçerik

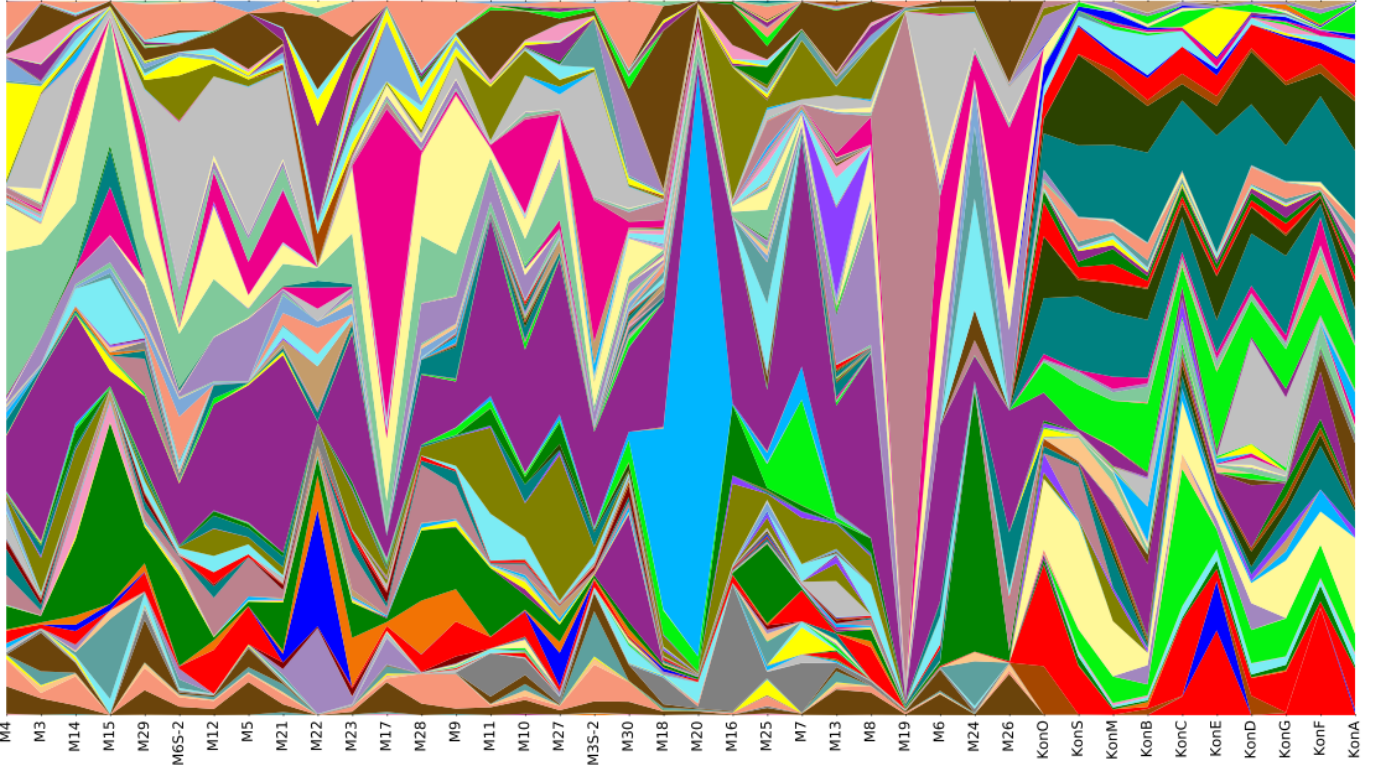
Aşağıdaki figür her örnek için familyadan türe kadar belirlenmiş taksonomik içeriği göstermektedir (x-eksen: örnek ismi; y-eksen: OTU yüzdeleri).



FIGÜR 1. BÜTÜN ÖRNEKLER İÇİN TAKSONOMİK İÇERİK ALAN GRAFİĞİ.

Legend	Taxonomy	Total %	M4 %	M3 %	M14 %	M15 %	M29 %	M6S-2 %
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__	1.0%	3.8%	0.7%	4.1%	0.0%	3.1%	1.3%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__aurimucosum	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__durum	0.2%	0.0%	0.9%	0.4%	0.0%	0.6%	0.3%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Demabacteraceae;g__Brachybacterium;s__	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Demabacteraceae;g__Brachybacterium;s__conglomeratum	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcaceae;g__Arthrobacter;s__nitroguajacolicus	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcaceae;g__Kocuria;s__rhizophila	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcaceae;g__Micrococcus;s__	0.1%	0.6%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcaceae;g__Micrococcus;s__lylae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcaceae;g__Rothia;s__	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcaceae;g__Rothia;s__aeria	0.4%	0.0%	1.9%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcaceae;g__Rothia;s__dentocariosa	0.7%	0.0%	5.4%	1.4%	0.1%	6.0%	0.2%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcaceae;g__Rothia;s__muclaginoso	1.1%	0.3%	0.4%	0.1%	0.1%	1.5%	0.3%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__agilis	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__brevis	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__coelebominis	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__paralimentarius	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__paraplantarum	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__reuteri	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__ruminis	0.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__vaginialis	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__zeae	2.9%	0.0%	0.0%	0.5%	0.0%	0.0%	0.0%



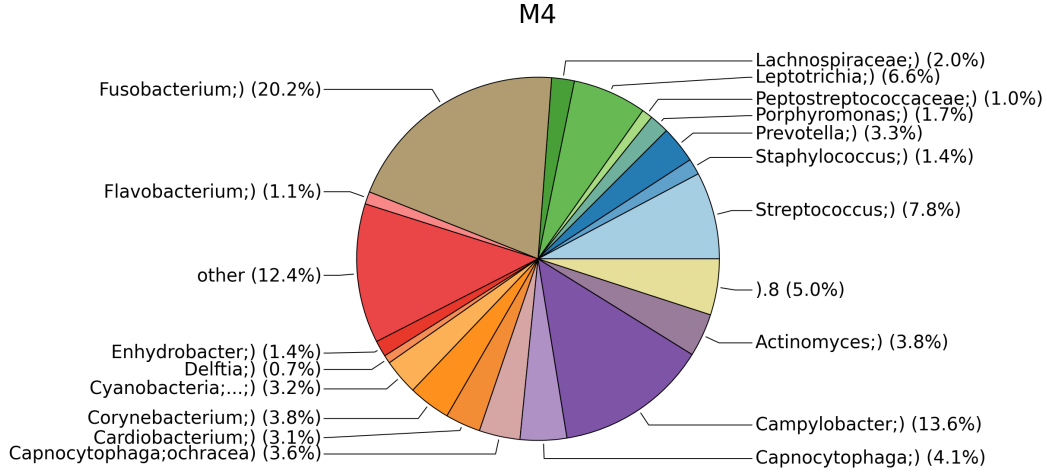


FIGÜR 2. BÜTÜN ÖRNEKLER İÇİN TAKSONOMİK İÇERİK ALAN GRAFİĞİ

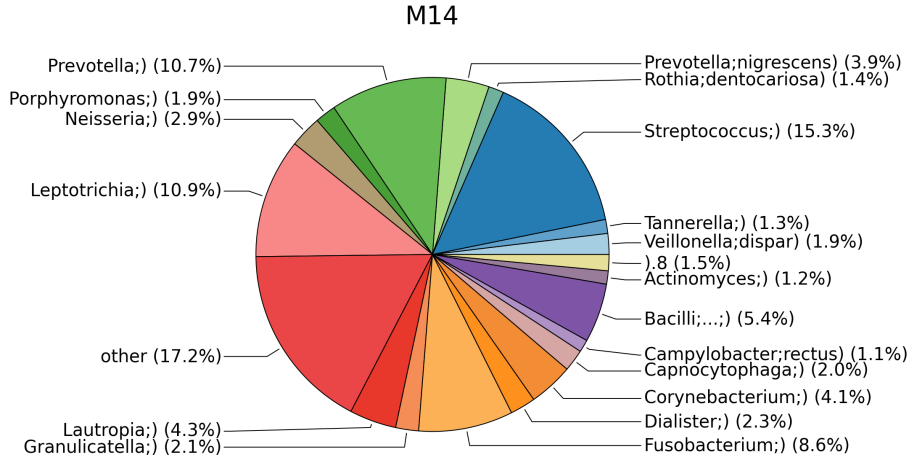
Legend	Taxonomy	Total %	M4 %	M3 %	M14 %	M15 %	M29 %	M6S-2 %
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__	1.0%	3.8%	0.7%	4.1%	0.0%	3.1%	1.3%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__aurimucosum	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Corynebacteriaceae;g__Corynebacterium;s__dunum	0.2%	0.0%	0.9%	0.4%	0.0%	0.6%	0.3%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Demabacteriaceae;g__Brachybacterium;s__	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Demabacteriaceae;g__Brachybacterium;s__conglomeratum	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcales;g__Arthrobacter;s__nitroguajacolicus	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcales;g__Kocuria;s__rhizophila	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcales;g__Micrococcus;s__	0.1%	0.6%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcales;g__Micrococcus;s__lylae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcales;g__Rothia;s__	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcales;g__Rothia;s__aeria	0.4%	0.0%	1.9%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcales;g__Rothia;s__dentocariosa	0.7%	0.0%	5.4%	1.4%	0.1%	6.0%	0.2%
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcales;g__Rothia;s__mucilaginosus	1.1%	0.3%	0.4%	0.1%	0.1%	1.5%	0.3%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__agilis	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__brevis	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__coelestis	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__paraplantarum	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__paraplantarum	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__reuteri	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__ruminis	0.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__vaginialis	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__zeae	2.9%	0.0%	0.0%	0.5%	0.0%	0.0%	0.0%

Detaylı bilgi için her analize ait [.html](#) uzantılı sayfa, üzerine çift tıklanarak Google Chrome'da açılmalıdır.





FIGÜR 3. HER BİR ÖRNEK İÇİN TEK TEK ÇİZİLMİŞ, TÜR ÇEŞİTLİLİĞİNİ GÖSTEREN PASTA GRAFİKLERİ.



4.4. Çeşitlilik Analizi

4.4.1. Alfa (birim içi) ve Beta (birimler arası) çeşitlilik analizi

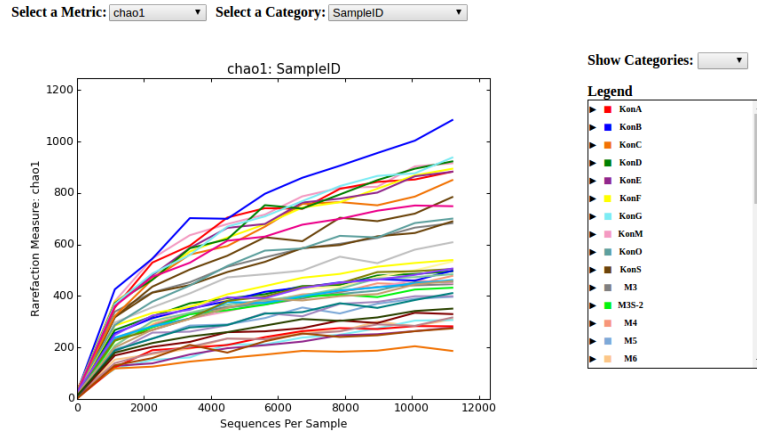
Bir mikrobiyal ekosistemin (bir örneğin) içindeki tür zenginliğinin belirlenmesiyle alfa çeşitlilik analizi yapılır.

Beta çeşitlilik analizinde ise mikrobiyal komünite (örnekler arası) içindeki çeşitlilik hesaplanır.

Alfa çeşitlilik grafiğindeki çizgilerin sağa doğru paralel hale gelmesi okuma sayısının analiz için yeterli sayıda olduğunu belirtir. Eğer grafikteki çizgiler paralel hale



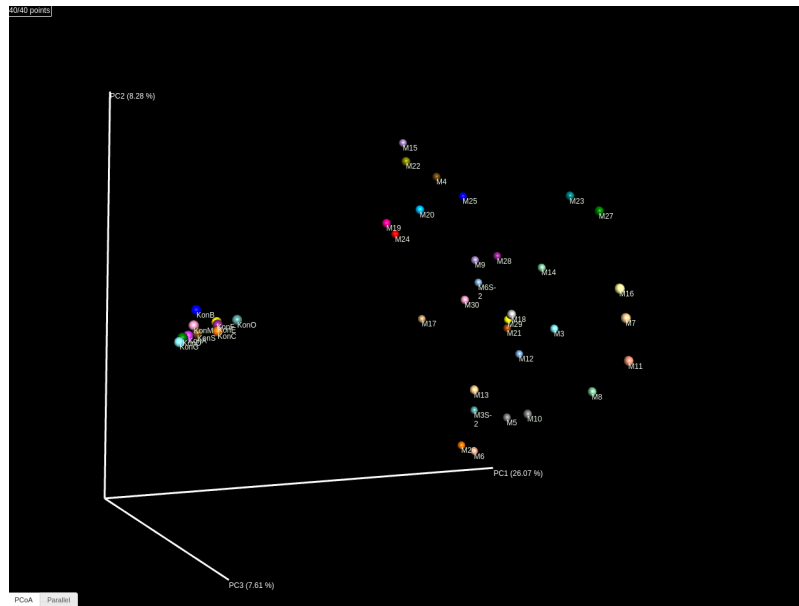
gelmemişse bir daha sekanslama yapmak gerekebilir. Aşağıdaki grafikte (x-eksen: okuma sayısı; y-eksen: OTU sayısı) her renk bir örneği belirtmektedir.



FIGÜR 4. ALFA ÇEŞİTLİLİK GRAFİĞİ

4.4.2. Temel koordinatlar analizi (PcoA)

PCoA (metrik çok boyutlu ölçeklendirme metodu) örnekler arası farklılığı göstermektedir. PCoA genelde filogenetik ya da mesafe matrix bilgileri kullanarak örneklerin karşılaştırılmasını sağlar.

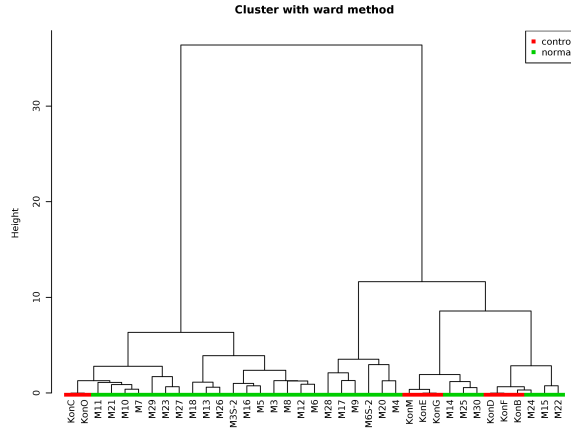


FIGÜR 5. BETA ÇEŞİTLİLİK GRAFİĞİ (PCoA METODU İLE HESAPLANMIŞTIR).

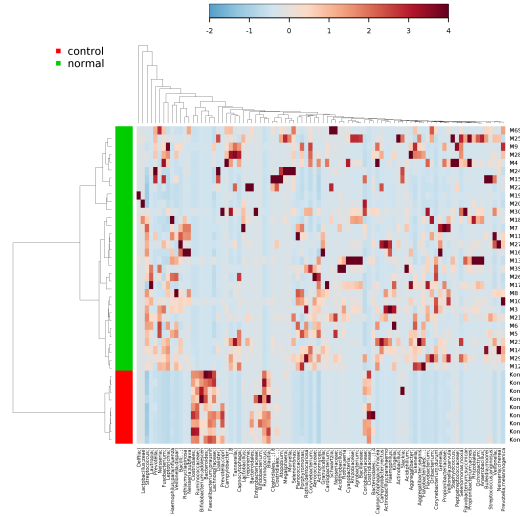
Detaylı bilgi için her analize ait [.html](#) uzantılı sayfa, üzerine çift tıklanarak Google Chrome'da açılmalıdır.



4.4.2. CLUSTER ANALİZİ (HIERARCHICAL CLUSTERING)



FIGÜR 6. WARD ALGORİTMASI İLE ÇİZİLMİŞ DENDOGRAM.



FIGÜR 7. WARD ALGORİTMASI İLE ÇİZİLMİŞ HEATMAP TÜRLERİN HANGİ ÖRNEKLERDE YOĞUNLAŞTIĞINI GÖSTERMEKTEDİR.

5. Referans

QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data

J Gregory Caporaso, Justin Kuczynski, Jesse Stombaugh, Kyle Bittinger, Frederic D Bushman, Elizabeth K Costello, Noah Fierer, Antonio Gonzalez Pena, Julia K Goodrich, Jeffrey I Gordon, Gavin A Huttley, Scott T Kelley, Dan Knights, Jeremy E Koenig, Ruth E Ley, Catherine A Lozupone, Daniel McDonald, Brian D Muegge, Meg Pirrung, Jens Reeder, Joel R Sevinsky, Peter J Turnbaugh, William A Walters, Jeremy Widmann, Tanya Yatsunenko, Jesse Zaneveld and Rob Knight; Nature Methods, 2010; doi:10.1038/nmeth.f.303

