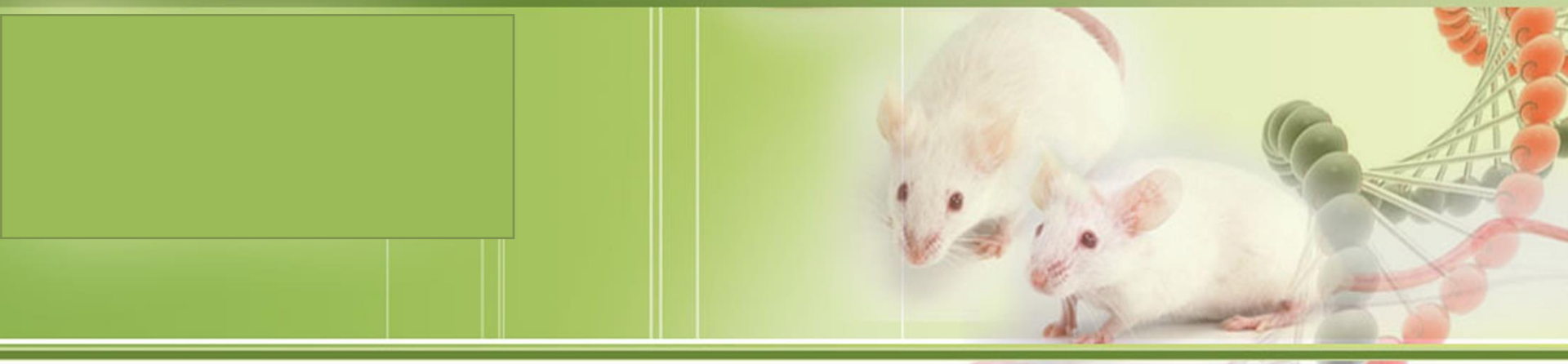


# 第17期OmicShare课堂

# 基因组浏览器（IGV）使用教程

BROAD INSTITUTE

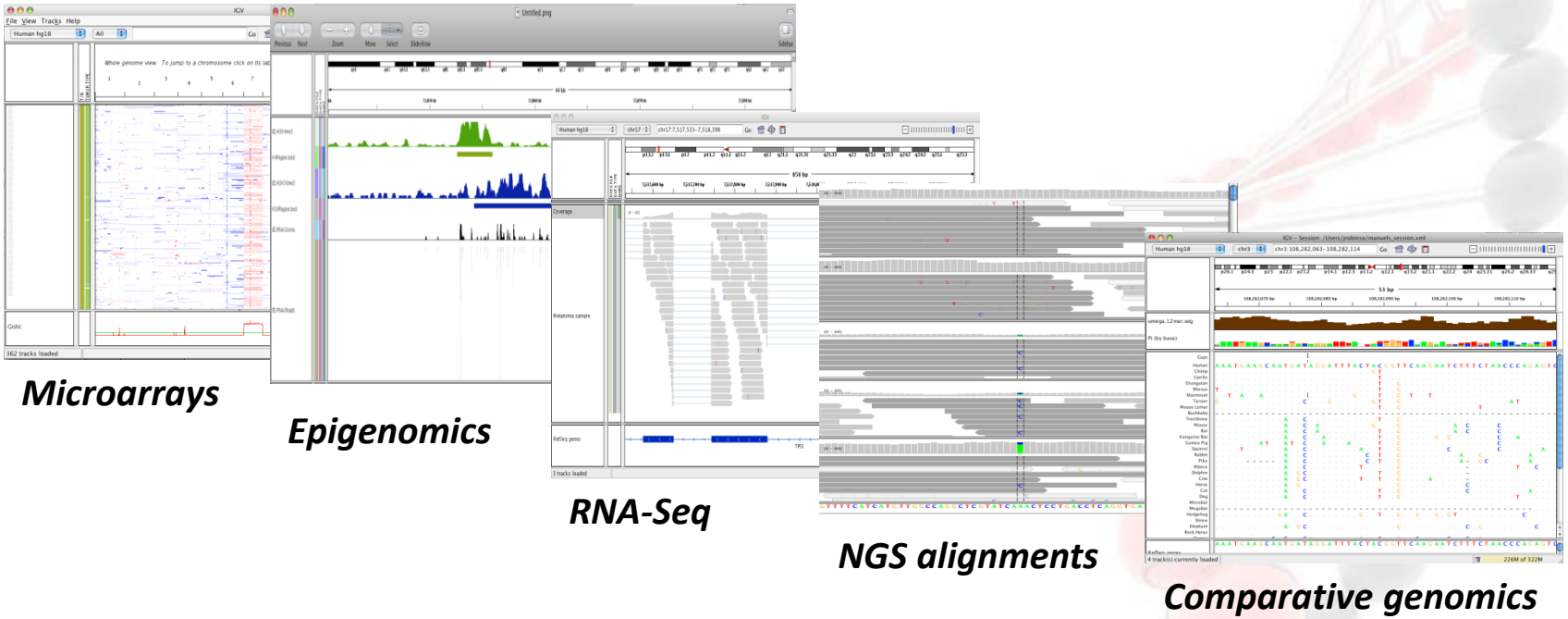
# 提纲

- 软件介绍与安装启动
- 数据导入与文件格式介绍
- IGVTools介绍
- 数据练习

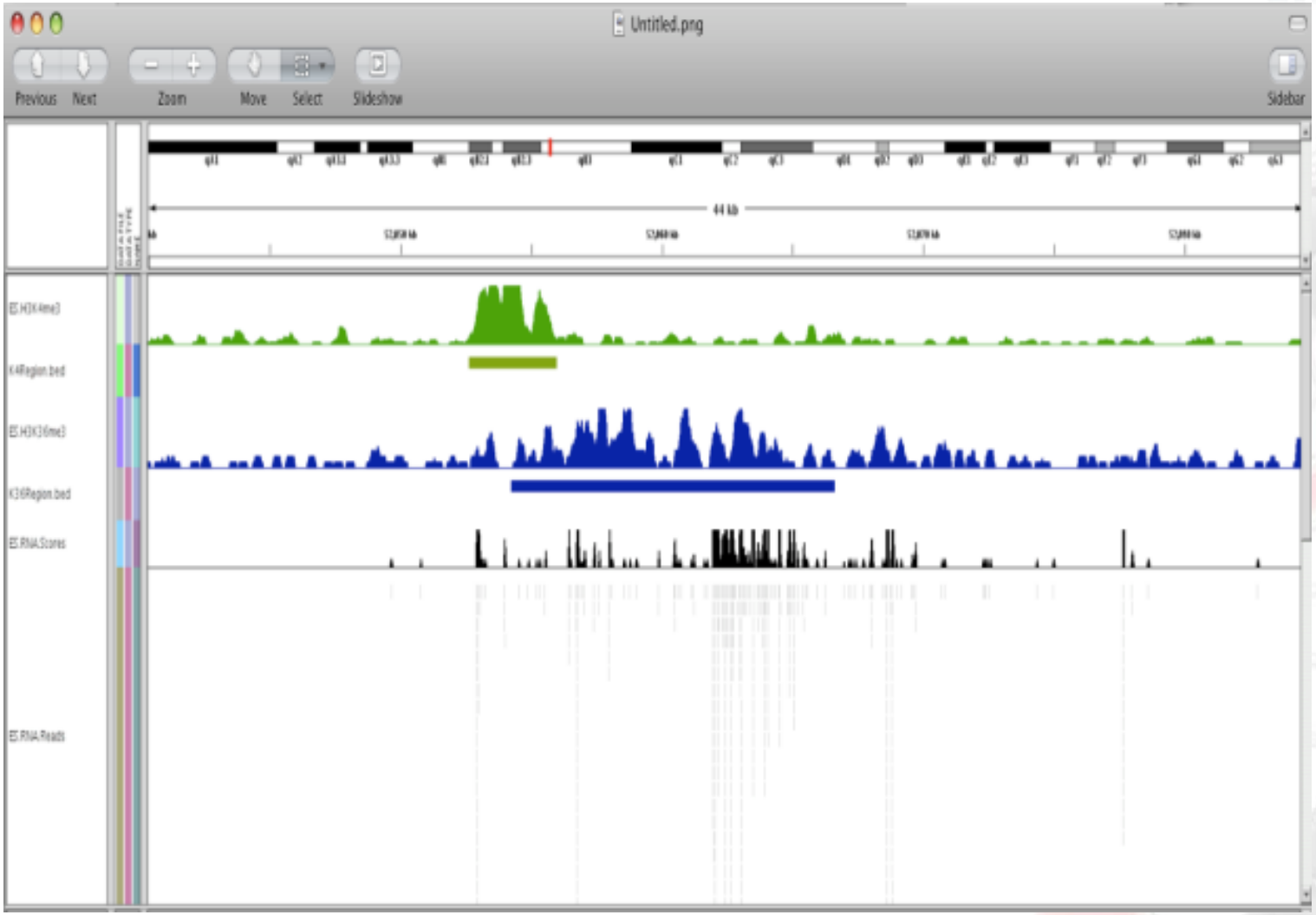
# 什么是 IGV

一款Java软件，可以桌面使用，也可命令行运行；

用于基因组中各类数据的整合可视化，非常适合NGS数据。

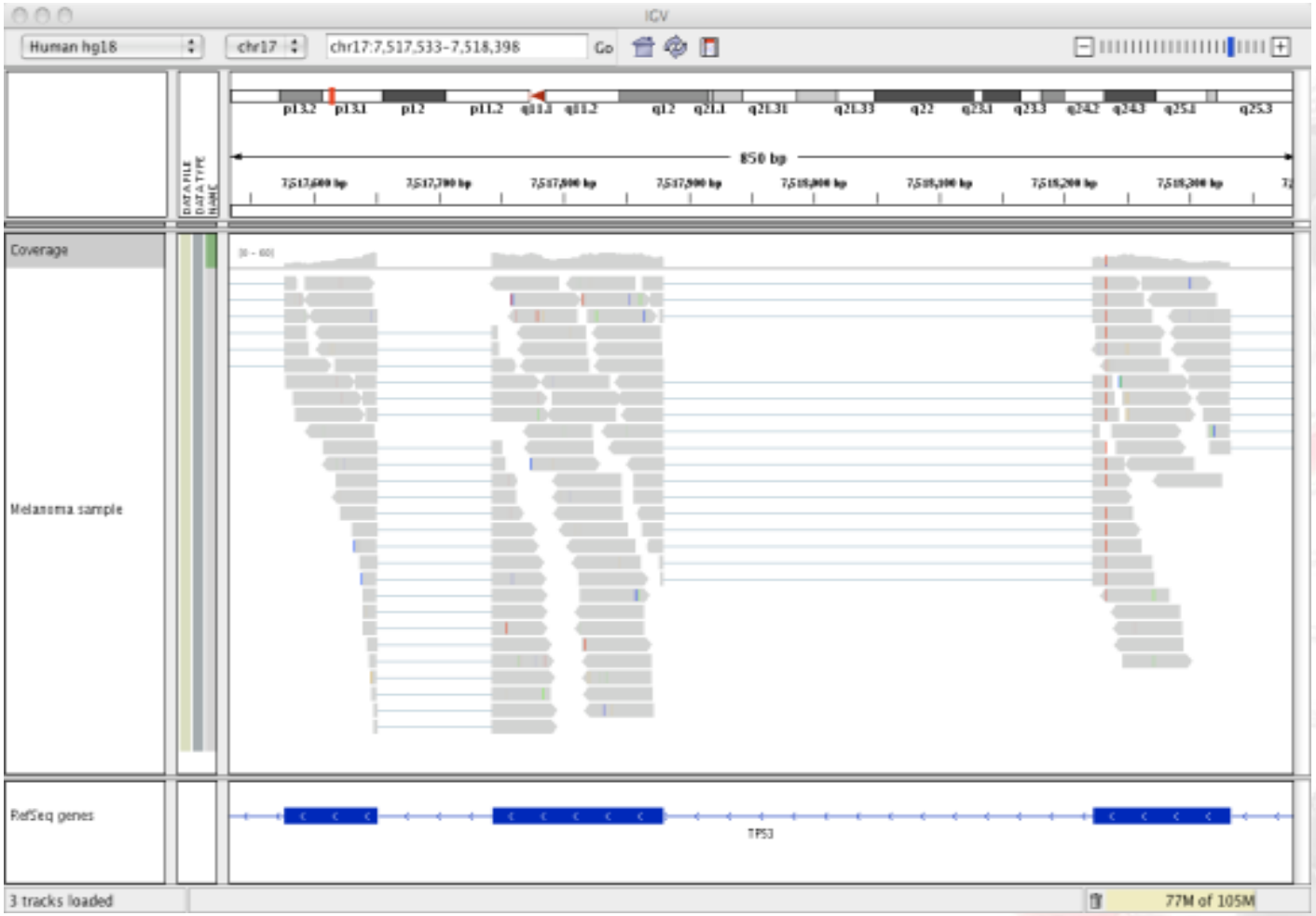


# 信号丰度




**信号类型包括： mRNA表达量，组蛋白修饰程度，甲基化率等**

# 比对结果




编码基因外显子剪切方式的查看（RNA-seq比对结果）

# 比对结果


全基因组重测序，局部比对结果，例如查看局部缺失信息。以上图片是基迪奥一个分析项目——寻找拟南芥T-DNA插入位点。通过寻找跨越外源插入片段和基因组序列的paired-END序列，确定插入位点。

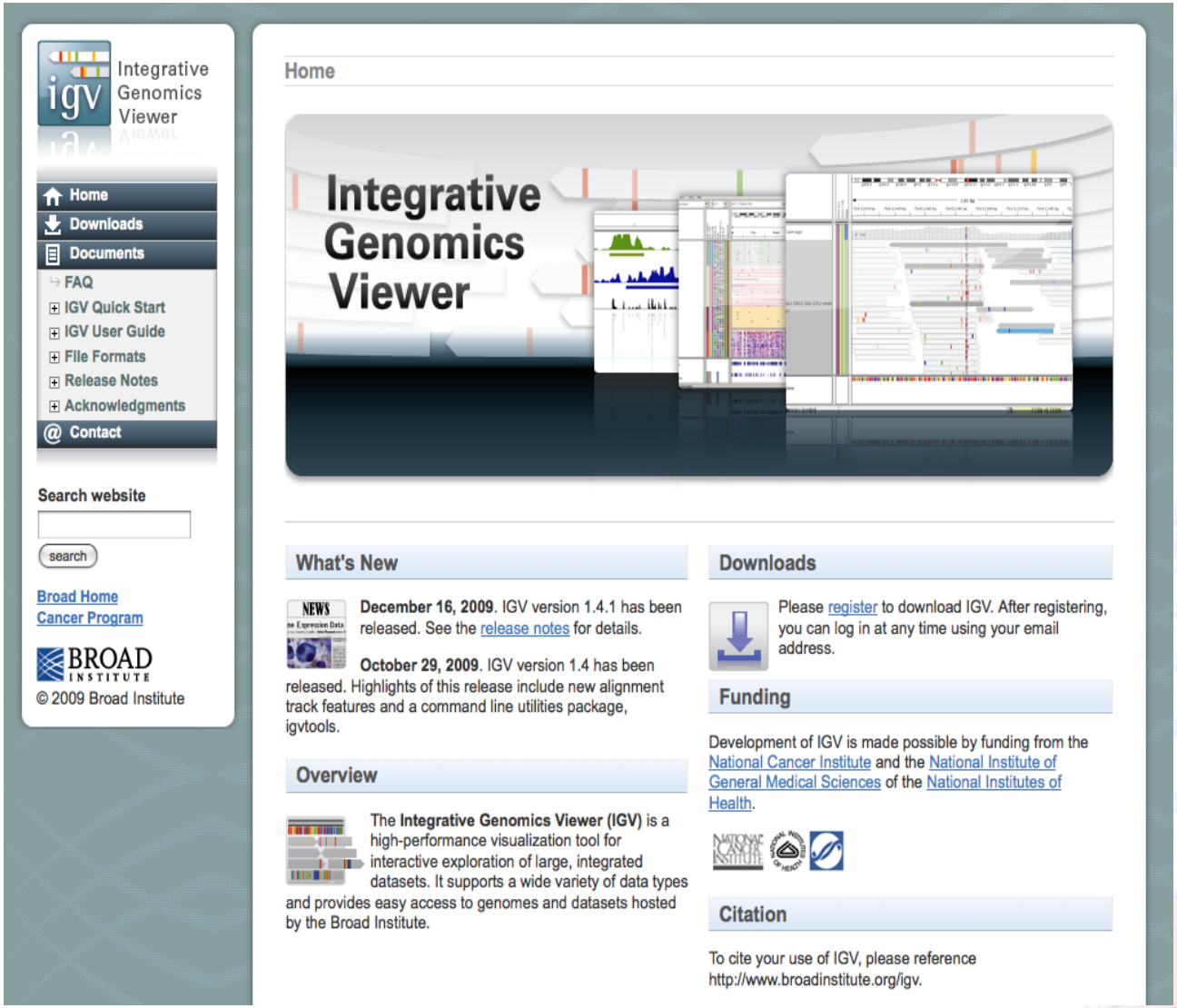
# IGV 的优点

- 满足不同类型的研究的需求，便于查看各种类型的现成的数据
  - The Cancer Genome Atlas (TCGA)
  - Epigenetic & lincRNA studies
  - 1000 Genomes Project
  - 个人的研究项目
- 满足不同类型的用户 –

  生物学者和生物信息学学者
- 在单机桌面系统下也可以处理大数据
- 交互式界面，容易使用

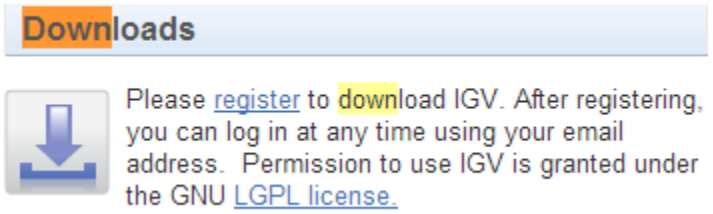
# IGV 官网

## http://www.broadinstitute.org/igv

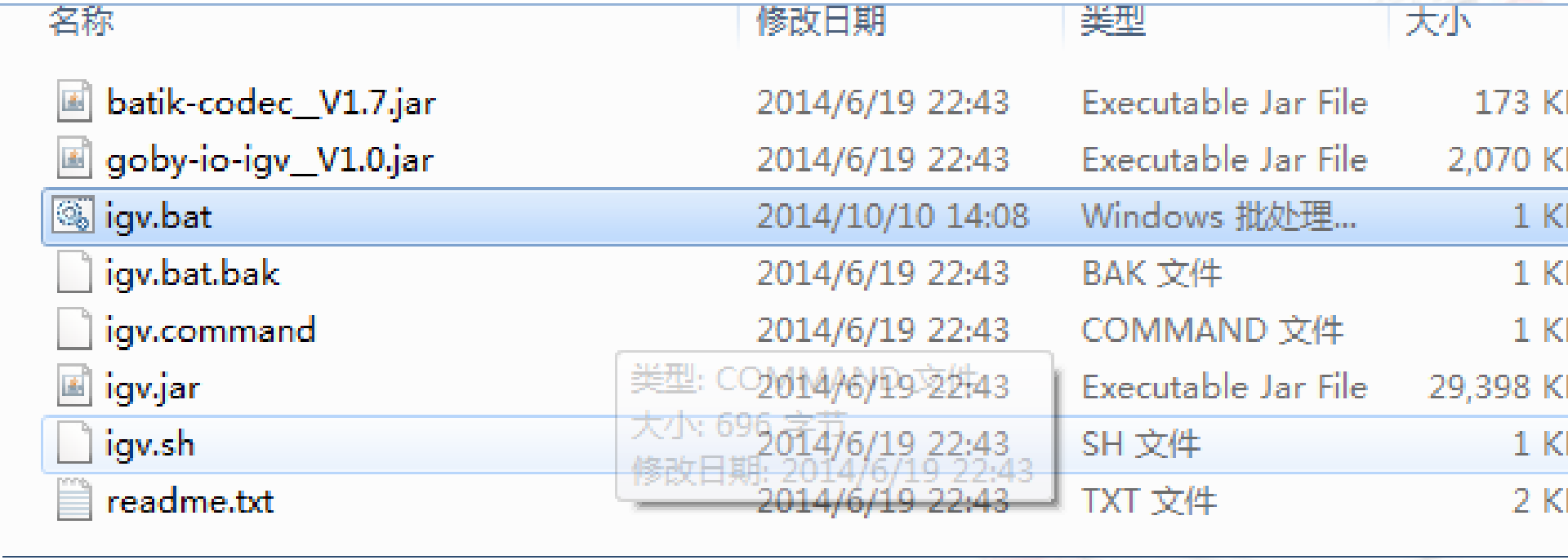


# IGV 下载与安装

- 注册（没有限制），http://www.broadinstitute.org/igv
- 点击“Downloads”
- 选择系统类型， Mac or window，或 linux
- 备注：如果运行，电脑需要先安装Java程序



# IGV启动




- igv.jar 是IGV软件的执行程序（java程序），但在windows下一般使用bat脚本启动jar，以便对软件参数进行重新设置。

# IGV启动

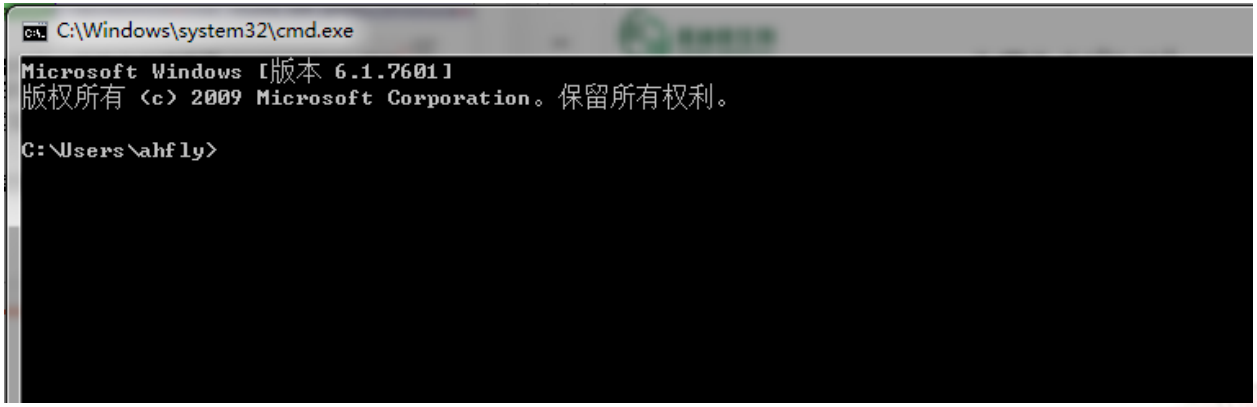
```
::Get the current batch file's short path
for %%x in (%0) do set BatchPath=%%~dpsx
for %%x in (%BatchPath%) do set BatchPath=%%~dpsx
java  -Xmx3000m -Dproduction=true -Djava.net.preferIPv4Stack=t
```

- 第一次启动前，使用文本编辑器（notepad ++）修改IGV使用的内存大小（这里我设定为3G）；
- 保存，然后双击点击igv.bat，启动IGV;
- **备注：按照你电脑的配置修改**；

# IGV启动

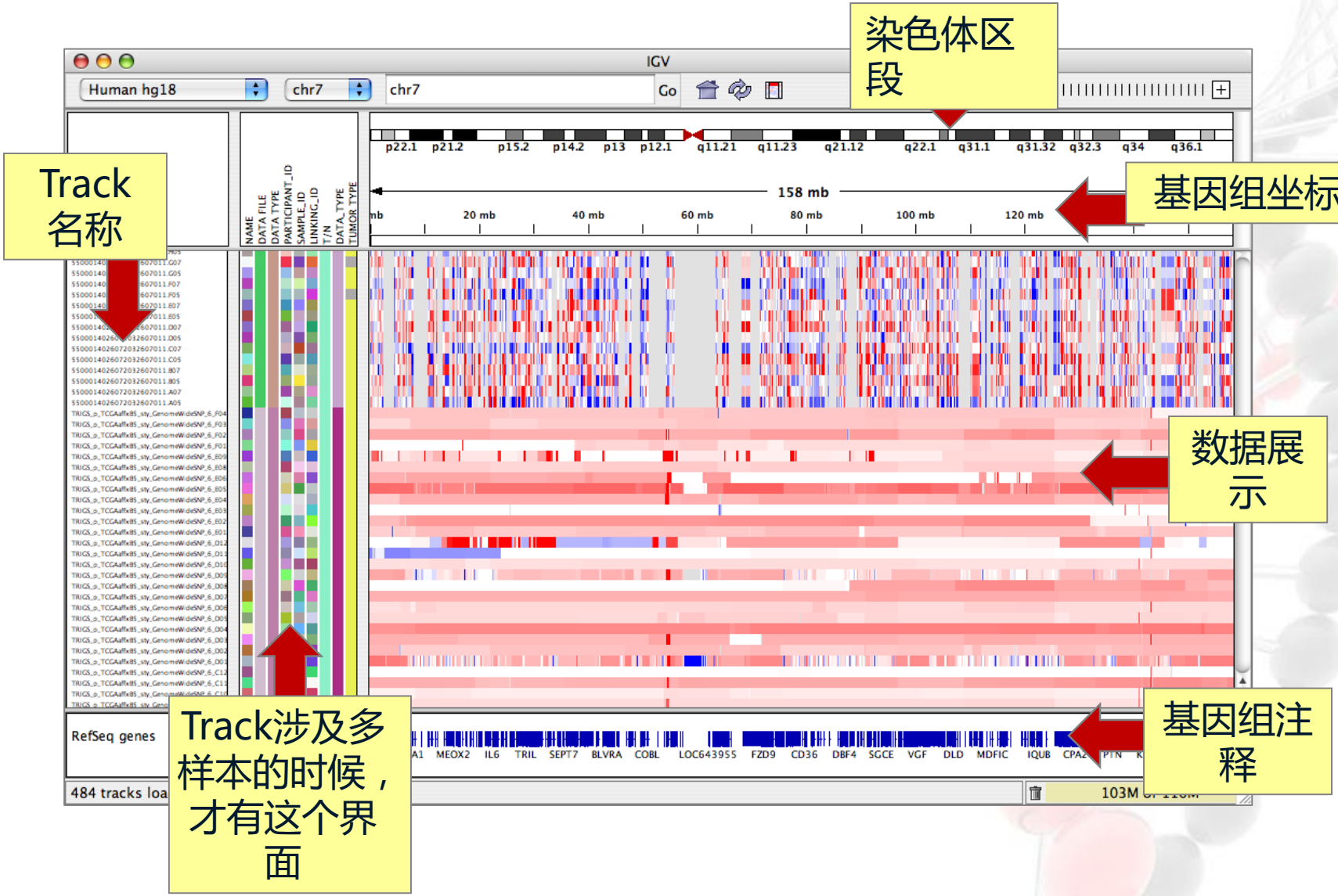
- 机房的部分计算机双击无法启动bat文件的解决方法；

1) 进入dos（cmd）界面




2）然后使用鼠标将bat文件拖动到dos界面内，然后回车即可。

# IGV 页面布局


染色体区段
Track名称
基因组坐标
数据展示
基因组注释
Track涉及多样本的时候，才有这个界面
IGV
Human hg18
chr7
Go
158 mb
RefSeq genes
484 tracks loa

# 提纲

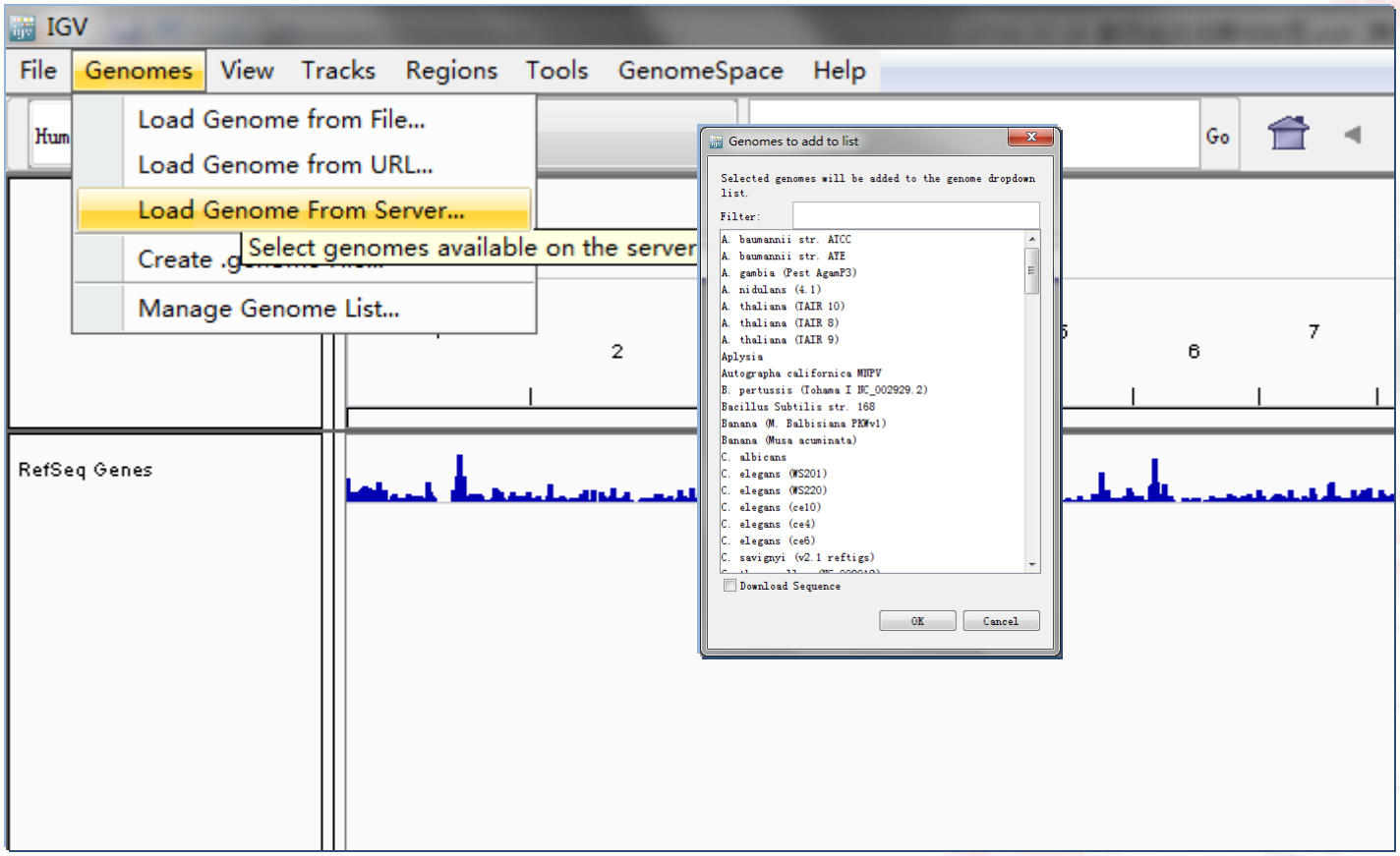
- 软件介绍与安装启动
- 数据导入与文件格式介绍
- IGV tools
- 数据练习

# 数据导入的顺序

1. 选择（并导入）参考基因组
2. 导入其他数据
3. 浏览数据，选取目标区域
4. 设置 track 的属性，优化展示结果

备注：在此类软件里，一个输入文件就被称为一个track

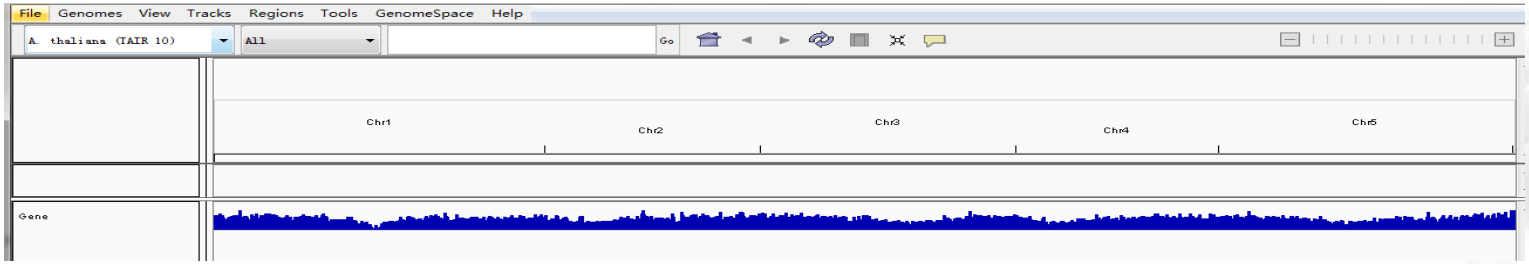
# （1）导入参考基因组



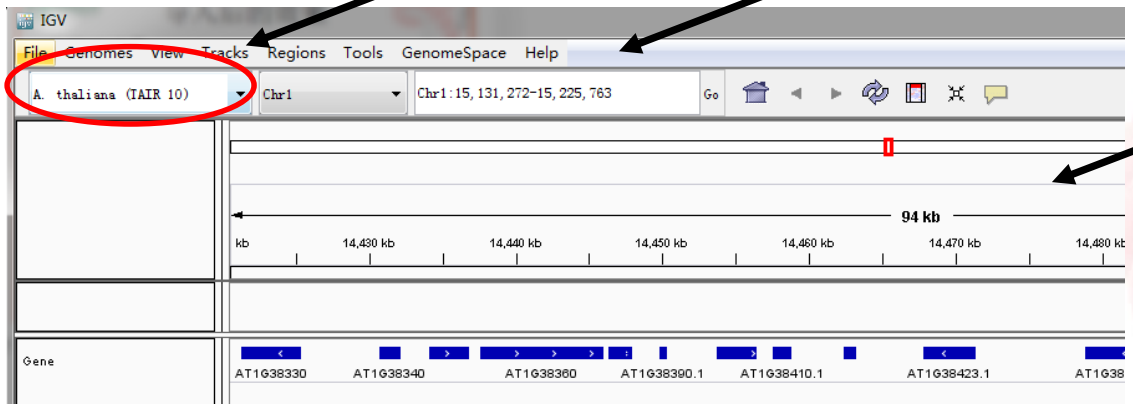

启动后，可以选择下载基因组的信息，绝大部分为动物，但也包含水稻、玉米、拟南芥、大豆这样模式植物；

# 导入拟南芥基因组后的效果

## 全局的效果




## 局部的效果




参考基因型名称

染色体编号和区间坐标信息

区间的标尺

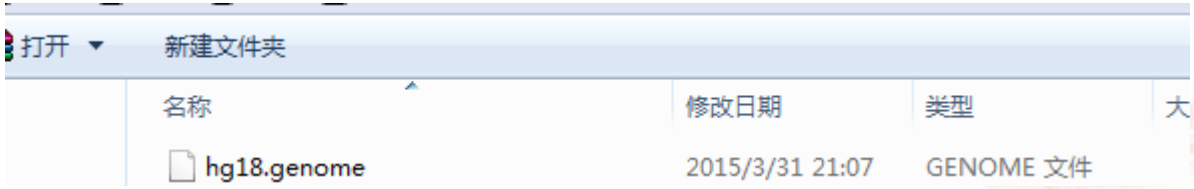
基因信息

# 导入参考基因组——生成基因组文件

基因组文件是*.genome格式，一般存储在“我的文档里面”

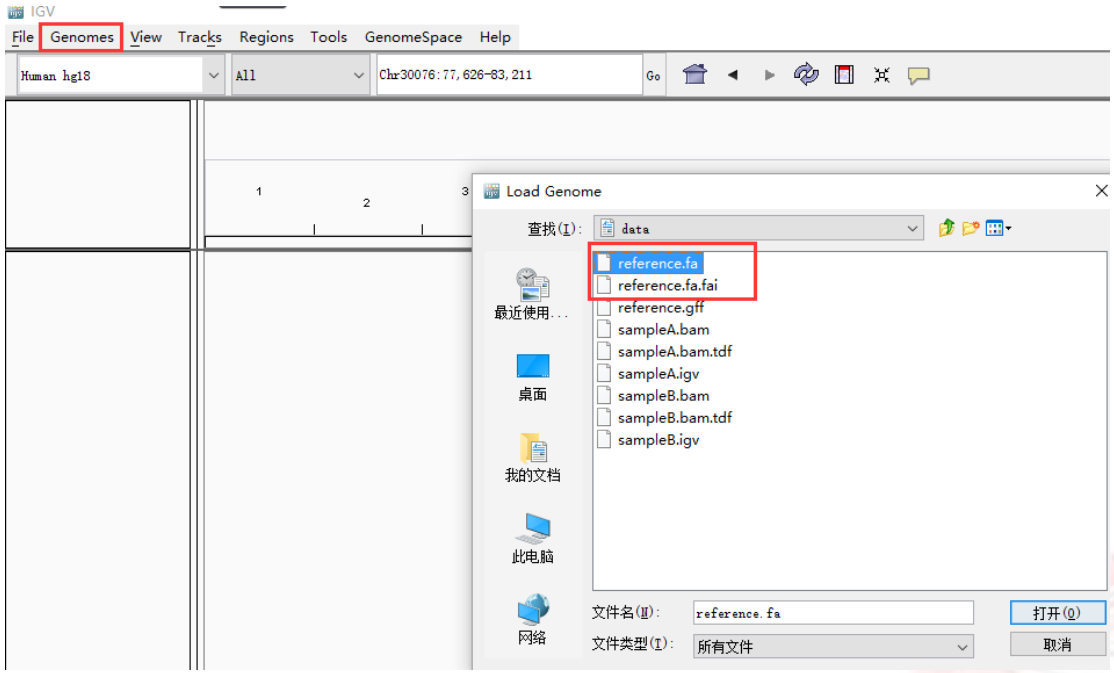
例如在机房的电脑，数据路径在c:\Documents and Settings\user\igv\genome

人类h18版本的参考基因组




如果你研究物种的基因组文件在IGV数据库没有（版本号不对应或根本没有），怎么办？

# 参考基因组——直接导入Fasta格式的文件




更简单的是：Genomes → load from files → 点击选择相应的fa 文件

备注：这里为了让文件更小便于演示，序列数据来源某物种的单个scaffold。

# (2)导入其他信息

数据信息类型

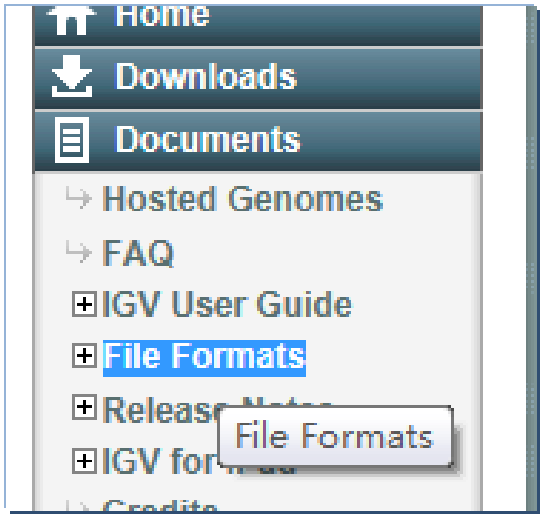
- 所有与基因组坐标有关的测序数据
- 基因组注释

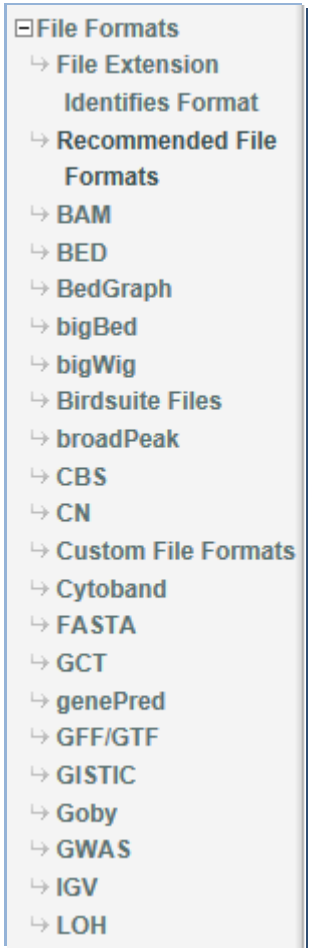
文件格式

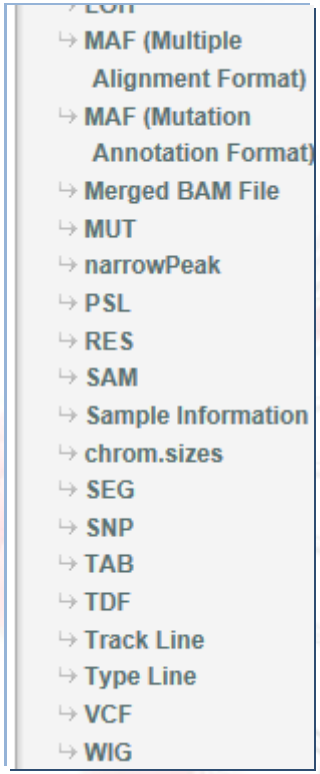
- 支持多种格式；
- 这里介绍几种常见格式，更多信息，请见官网 www.broadinstitute.org/igv/FileFormats

# 输入的格式

- 以IGV软件为例，其实其官网介绍了常见的输入格式：



# 输入的格式

- 有几个格式，可能与我们关联很强。

BAM/Sam # 比对文件
TDF # BAM的精简版
BED # 注释文件
GFF/GTF # 注释文件
PSL # blat比对的结果
VCF # SNP、indel信息
WIG # UCSC数据库的推荐格式
IGV # IGV默认的格式

# BAM

- 序列比对的直接输出结果是BAM或SAM

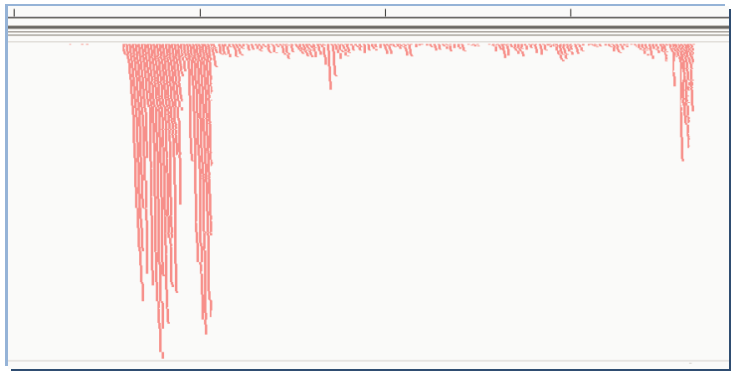
  SAM属于文本格式，简单点说来，就是告诉我们reads比对在基因组上哪个位置，mismatch是多少；

```
@HD VN:1.3 SO:coordinate
@SQ SN:ref LN:45
r001 163 ref  7 30 8M2I4M1D3M = 37  39 TTAGATAAAGGATACTG *
r002   0 ref  9 30 3S6M1P1I4M *  0   0 AAAAGATAAGGATA    *
r003   0 ref  9 30 5H6M       *  0   0 AGCTAA   *   NM:i:1
r004   0 ref 16 30 6M14N5M    *  0   0 ATAGCTTCAGC       *
r003  16 ref 29 30 6H5M       *  0   0 TAGGC    *   NM:i:0
r001  83 ref 37 30 9M         =  7 -39 CAGCGCCAT         *
```

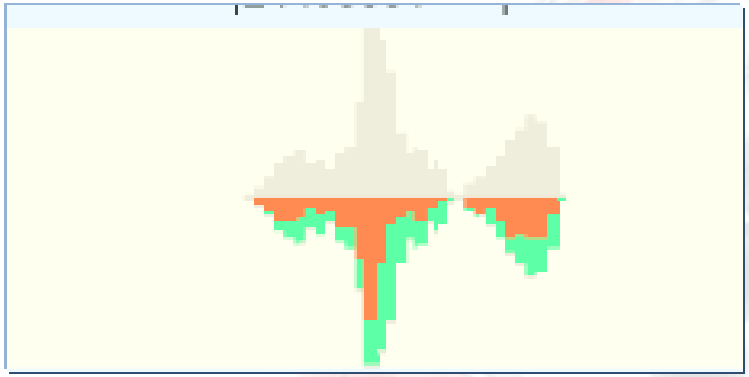
  但文本文件太大，不易存储，因此一般会将SAM转化压缩为(工具：samtools) BAM文件（二进制）。

# TDF

- 因为BAM文件依然保持着每一条reads的信息，信息量依然过大；
- 但绘图其实只需要保存局部的深度信息就足够；
- 所以，可见将局部深度、正负链等信息，进一步整合到简化到TDF格式的二进制文件中。



BAM格式包含每一条reads信息



TDF格式以一定区间为单位存储信息

# BED

- BED常见的格式比较简单，文本文件，告诉我们一段区域的位置信息。

```
browser position chr7:127471196-127495720
browser hide all
track name="ColorByStrandDemo" description="Color by strand demonstration"
visibility=2 colorByStrand="255,0,0 0,0,255"
chr7    127471196  127472363  Pos1  0  +
chr7    127472363  127473530  Pos2  0  +
chr7    127473530  127474697  Pos3  0  +
chr7    127474697  127475864  Pos4  0  +
chr7    127475864  127477031  Neg1  0  -
chr7    127477031  127478198  Neg2  0  -
chr7    127478198  127479365  Neg3  0  -
chr7    127479365  127480532  Pos5  0  +
chr7    127480532  127481699  Neg4  0  -
```

# GFF/GTF

- GFF/GTF都是基因组的注释文件，告诉你这个区域是什么（基因、重复序列、lncRNA），坐标是多少；

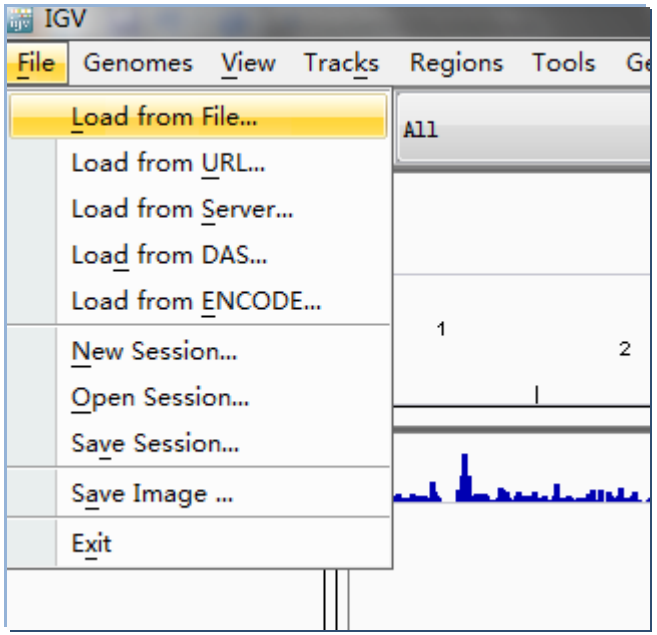
```
browser position chr22:10000000-10025000
browser hide all
track name=regulatory description="TeleGene(tm) Regulatory Regions"
visibility=2
chr22  TeleGene enhancer  10000000  10001000  500 +  .  touch1
chr22  TeleGene promoter  10010000  10010100  900 +  .  touch1
chr22  TeleGene promoter  10020000  10025000  800 -  .  touch2
```

其实和BED也没有本质区域，只是基因组注释文件，一般使用GFF或GTF而已；

# 其他

- PSL：Blat软件的输出结果
- VCF：SNP文件的常用格式
- WIG： Wiggle Track Format (WIG) ，是UCSC基因组浏览器推荐的输入格式；

# 导入其他信息




导入文件

#1 : Load local file

#2 : Load from URL

#3 : Load from server

(Broad IGV data server, other data server)

- 预备生成好的BAM、GFF、TDF等文件都可以导入；
- 但记住BAM、PLS等文件，需要先排序再导入（虽然IGV软件也可以排序，但对于BAM这样的大文件，建议在超算上分染色体排好序后，再在PC处理）

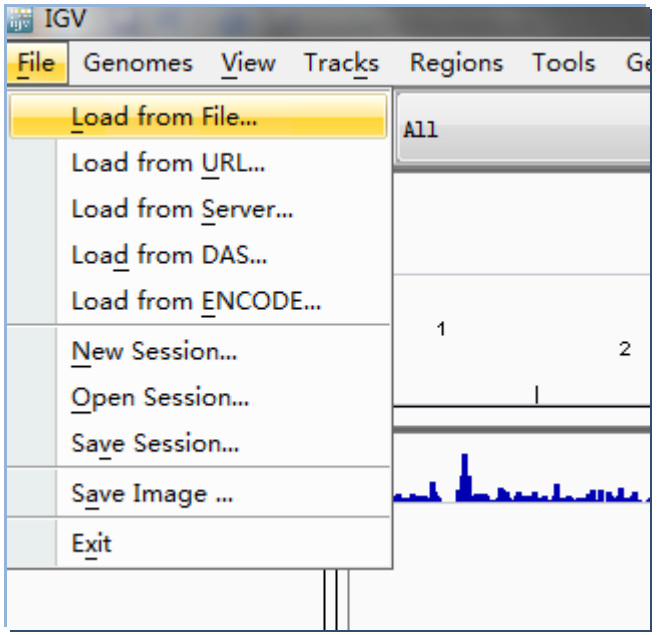
# 导入注释文件


- 由于导入的fa文件并没有基因组注释，这里导入gff文件进行注释。

  导入步骤：file → load geome from file → 选择

  “reference.gff” 文件

# 导入网络数据信息




导入文件

#1 : Load local file

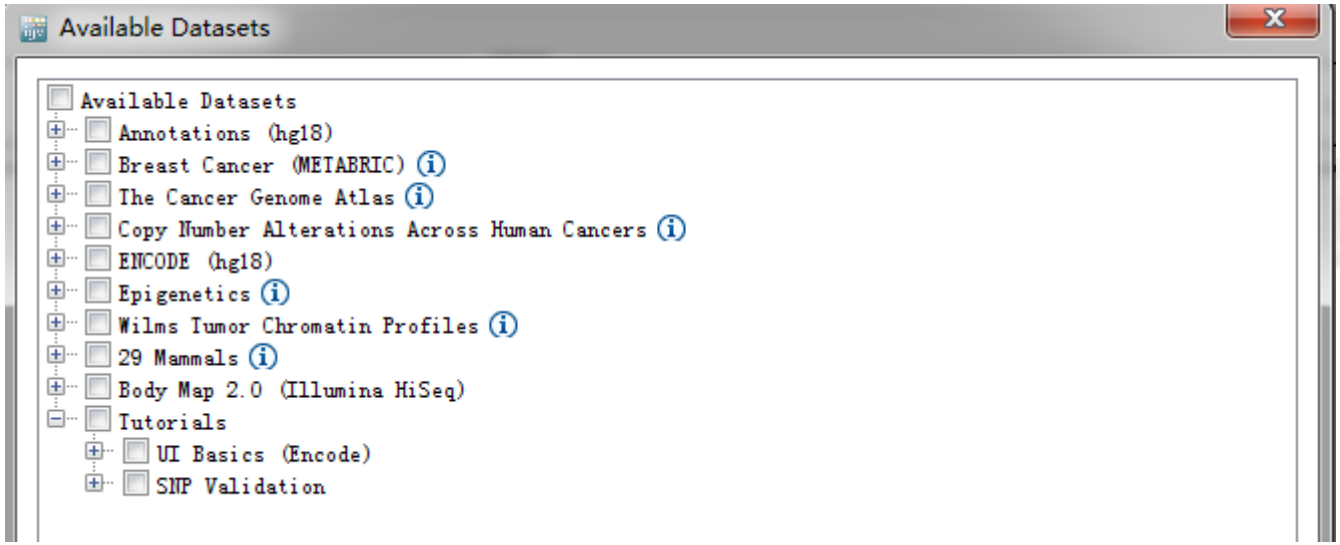
#2 : Load from URL

#3 : Load from server

(Broad IGV data server, other data server)

- 如果是模式物种，可以从IGV的官网下载相关的信息。

# “Load from server”

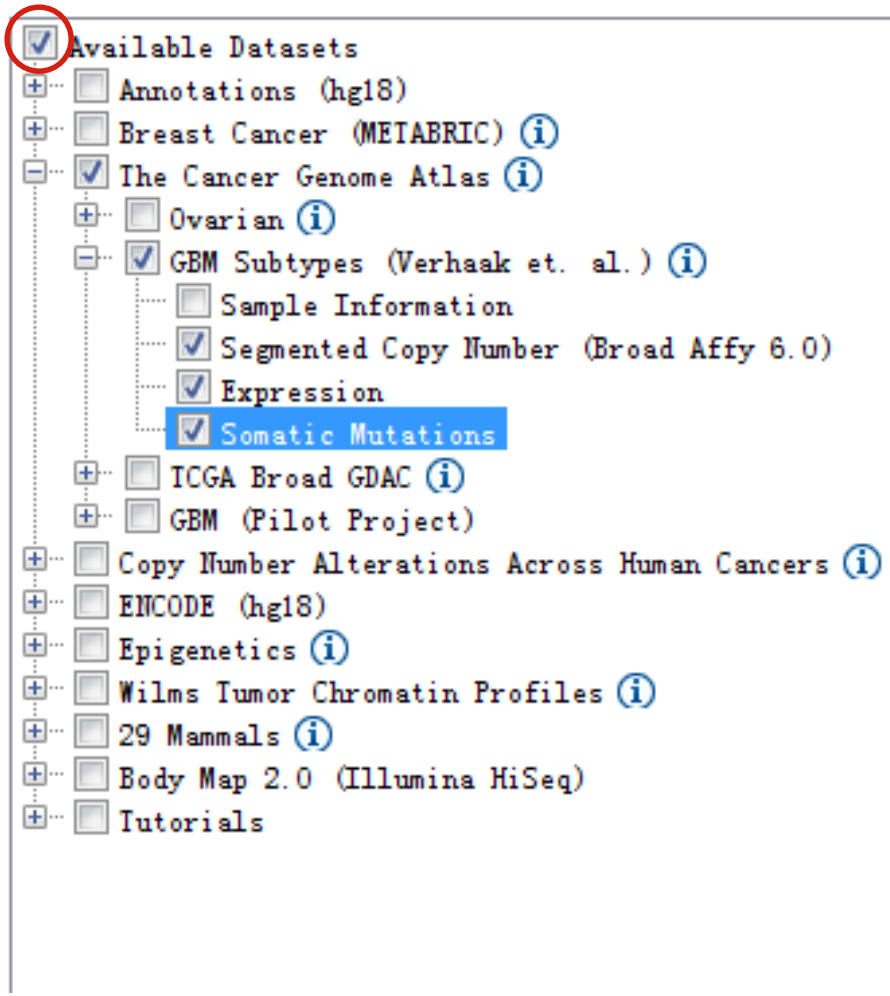



可以选择的数据决定于:

（1）你选择的服务器，默认是 Broad server

（2）你选择的参考基因组

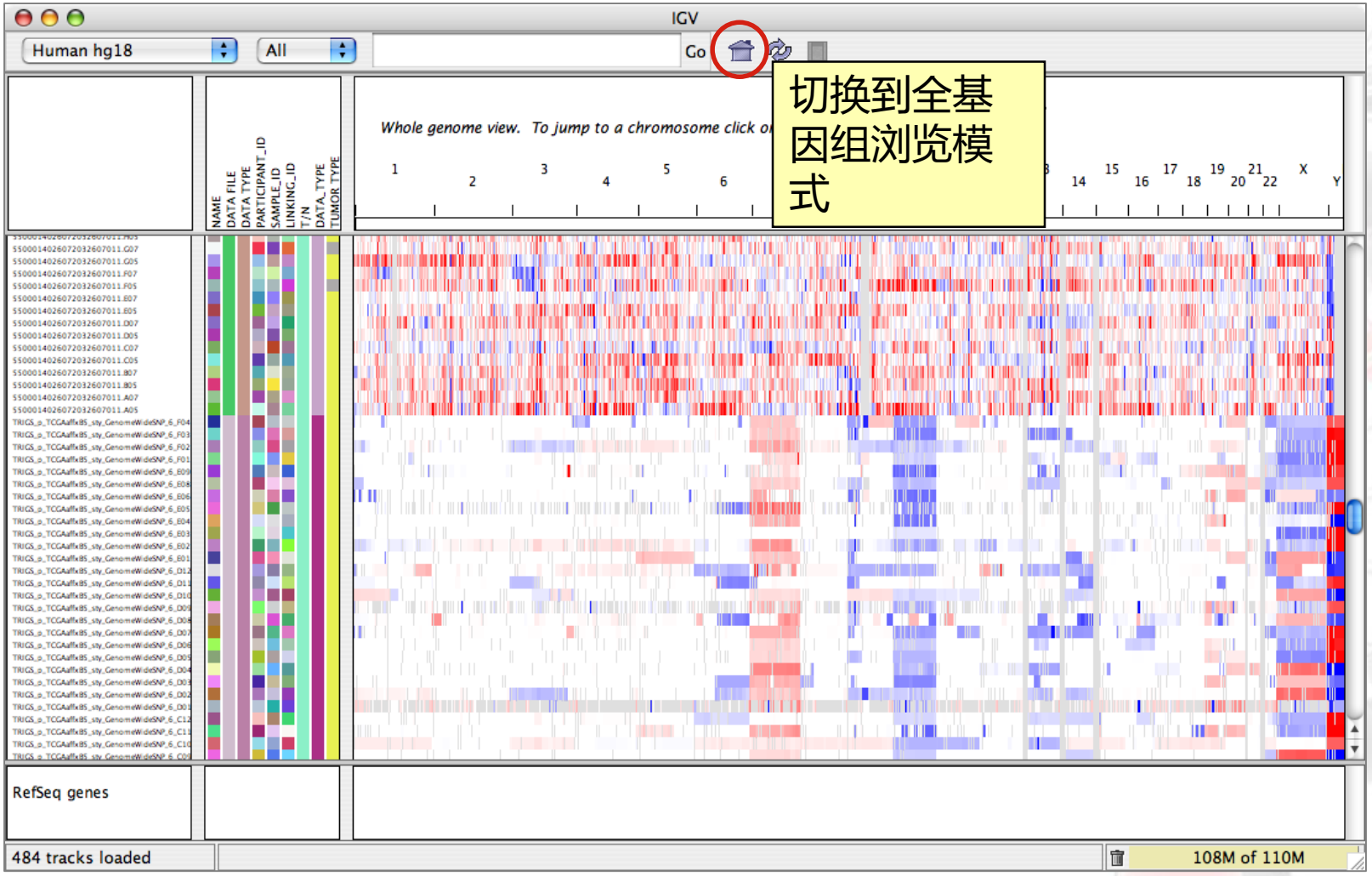
# “Load from server”



# (3)数据浏览，确定目标区域

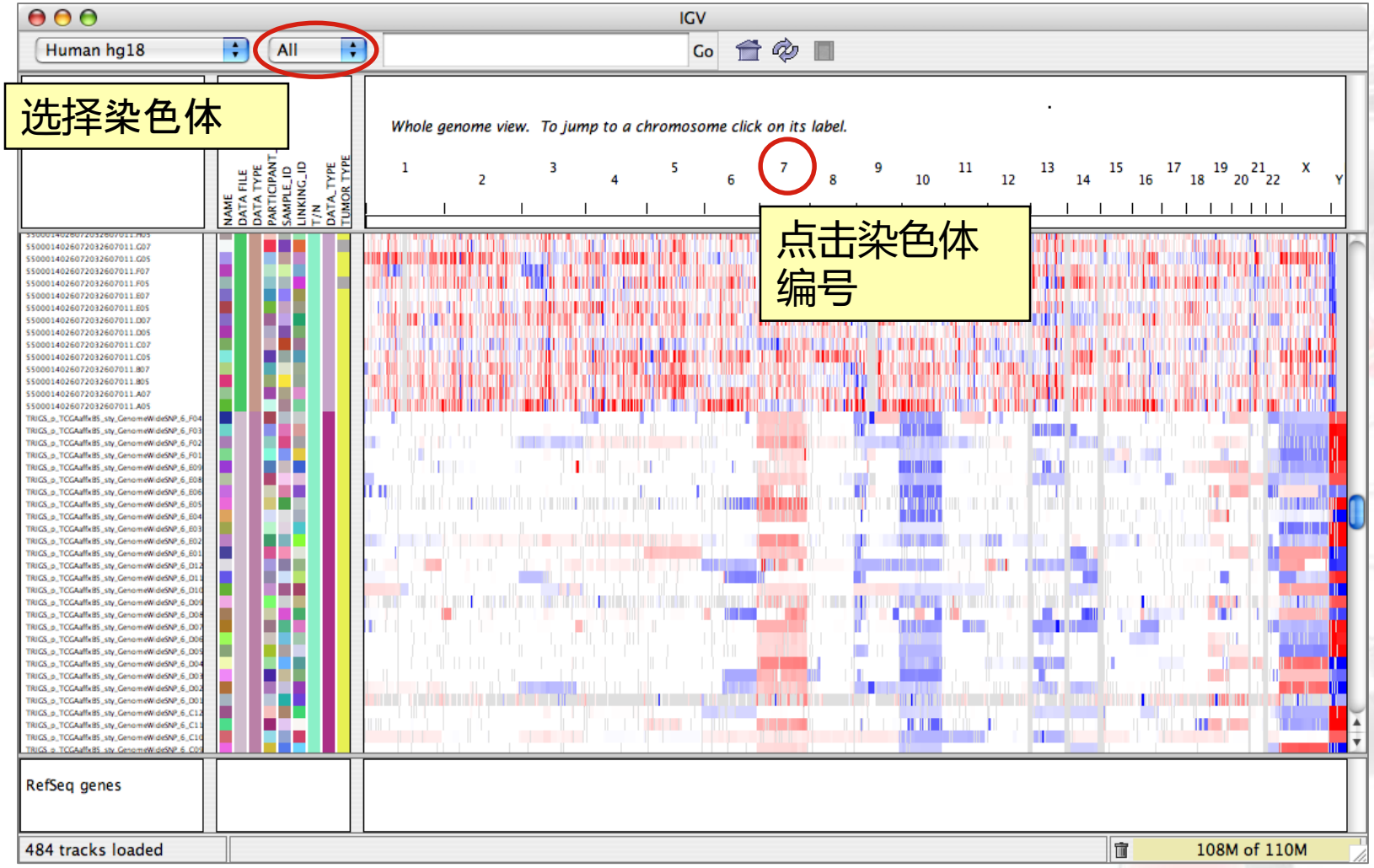
Integrative Genomics Viewer

## Whole genome view



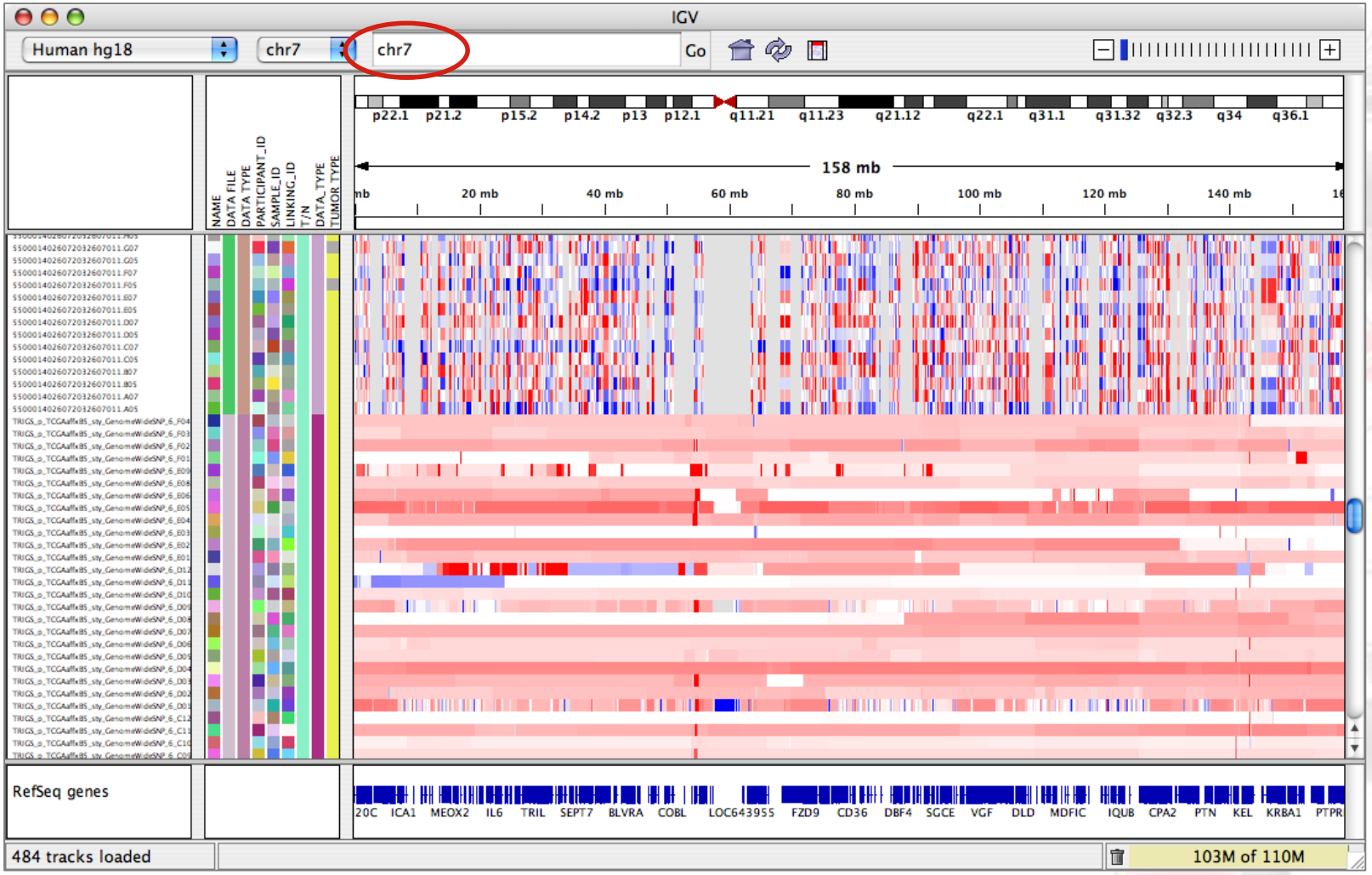
# 数据浏览

## 缩放到染色体水平



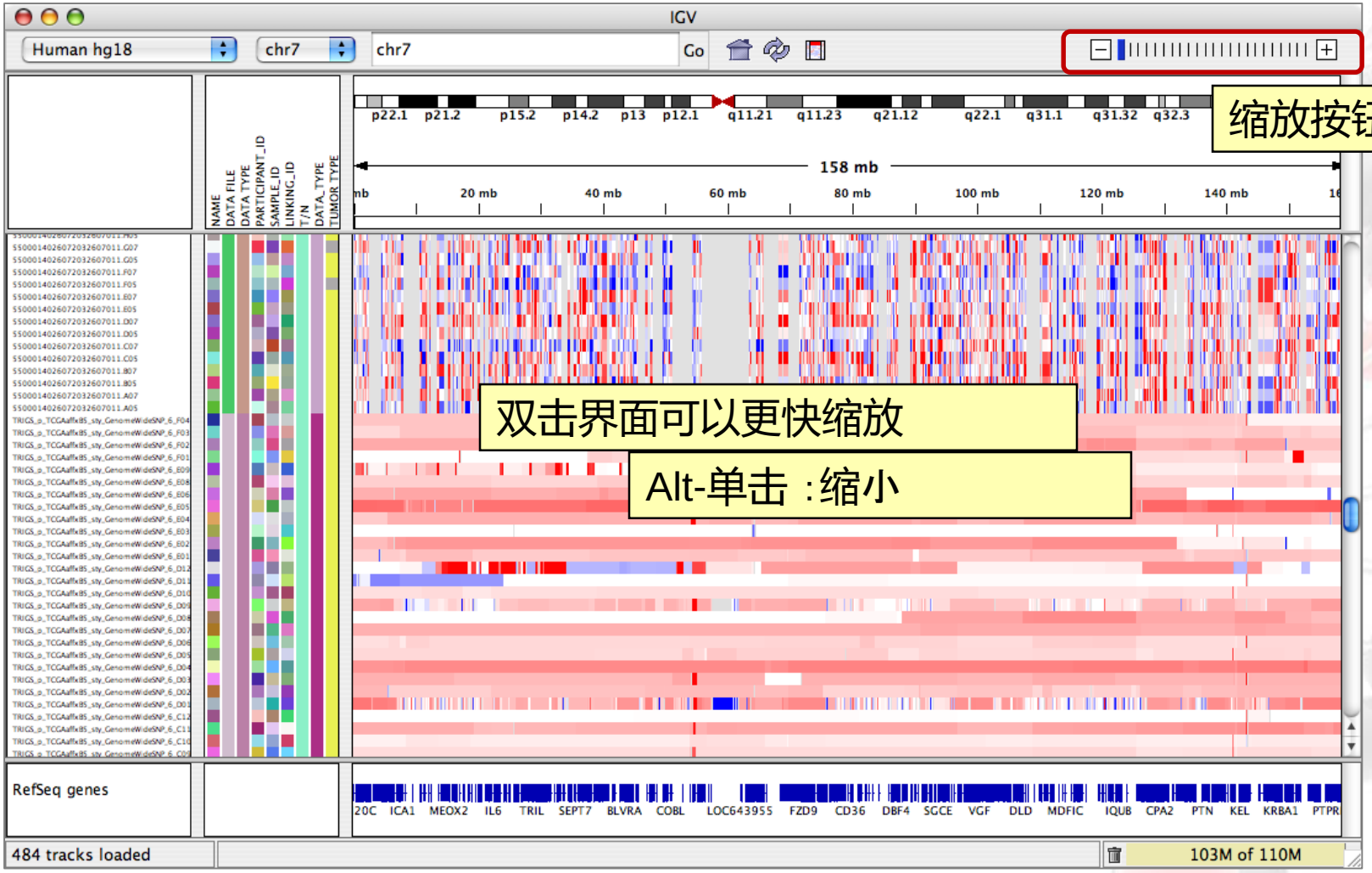
# 数据浏览

## 缩放到染色体水平



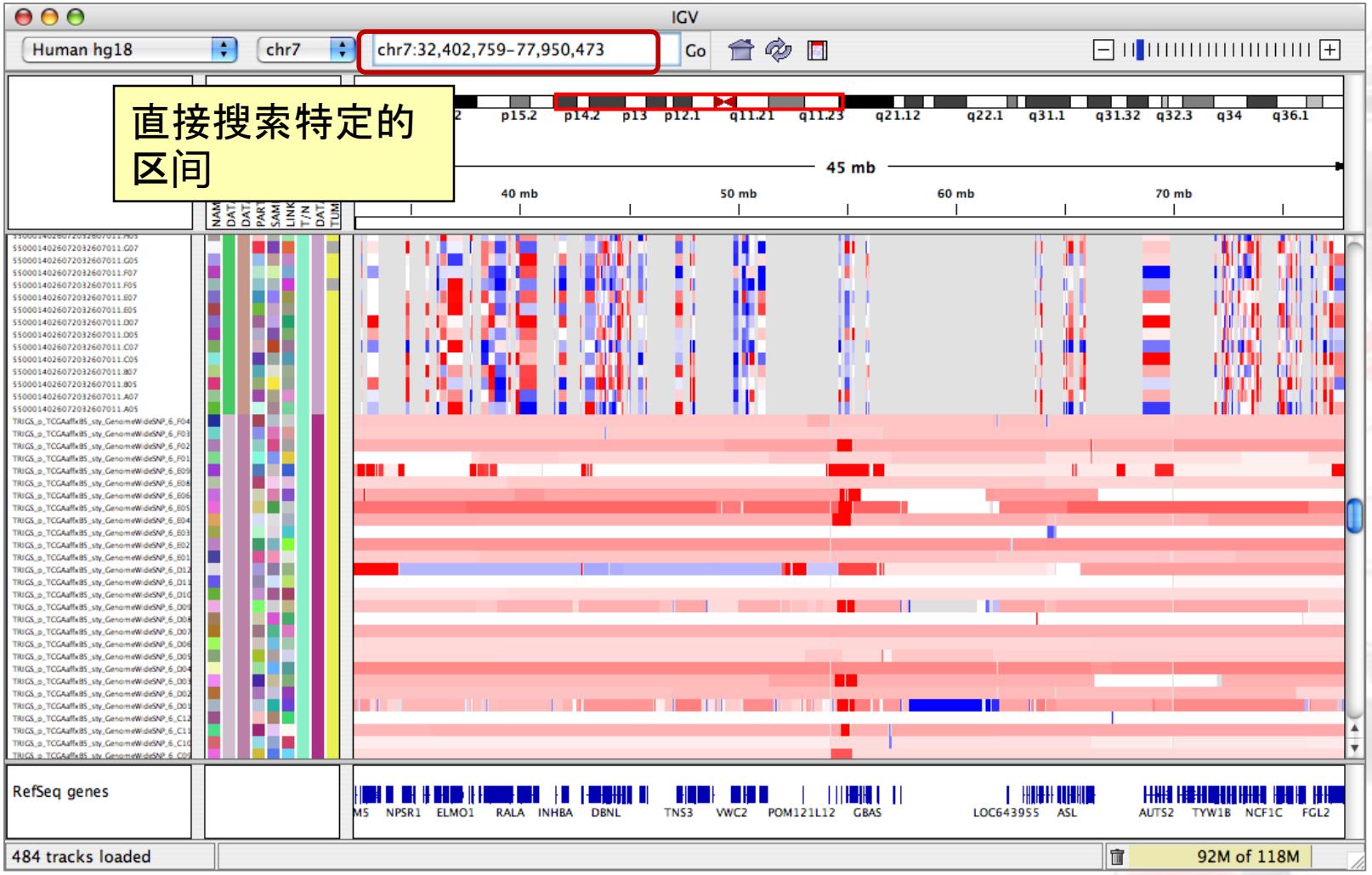
# 数据浏览

## 进一步放大


IGV
Human hg18
chr7
chr7
Go
缩放按钮
158 mb
双击界面可以更快缩放
Alt-单击 :缩小
RefSeq genes
484 tracks loaded
103M of 110M

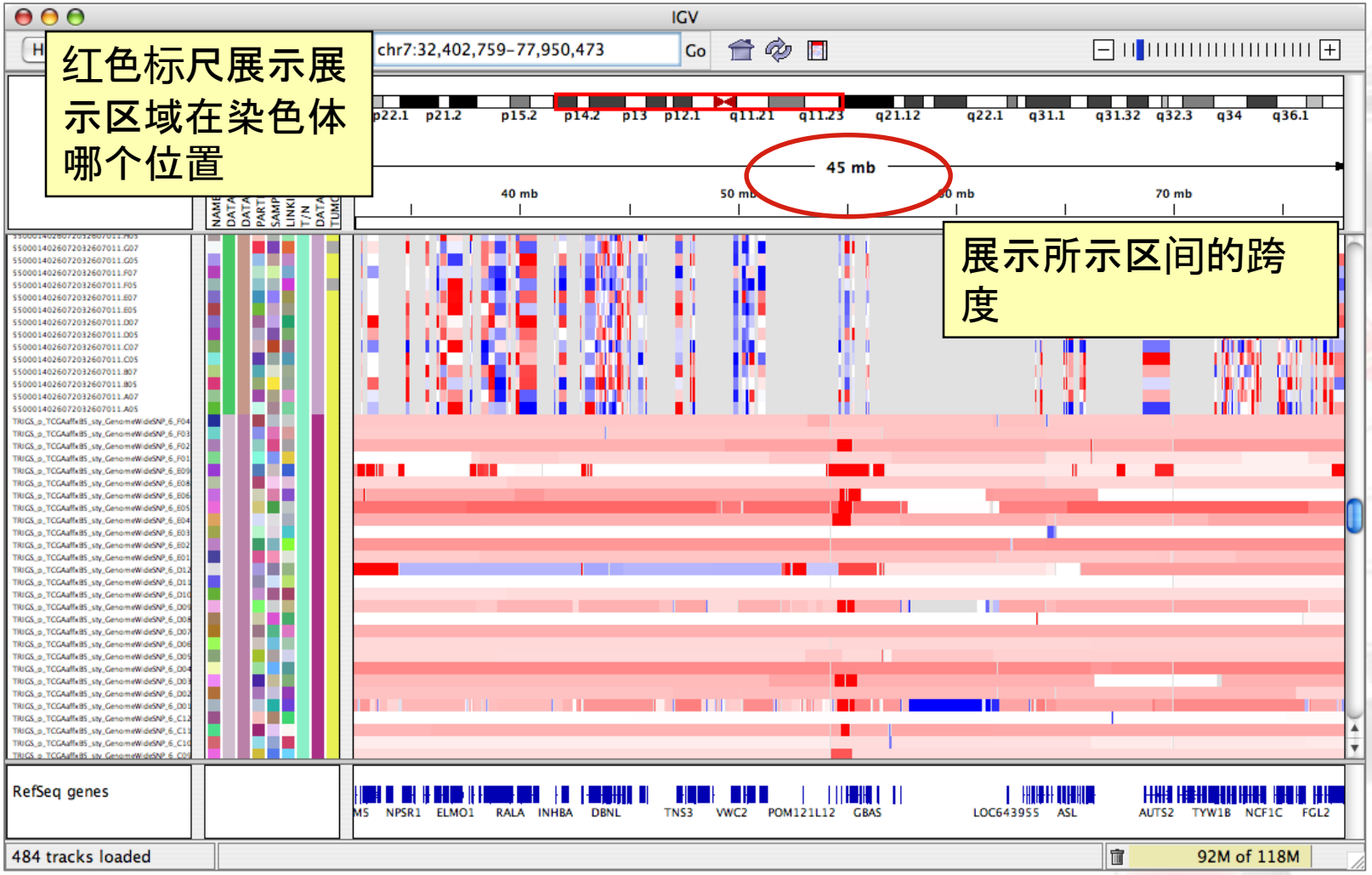
# 数据浏览

## 进一步放大


IGV
Human hg18
chr7
chr7:32,402,759-77,950,473
Go
直接搜索特定的区间
45 mb
40 mb
50 mb
60 mb
70 mb
RefSeq genes
484 tracks loaded
92M of 118M

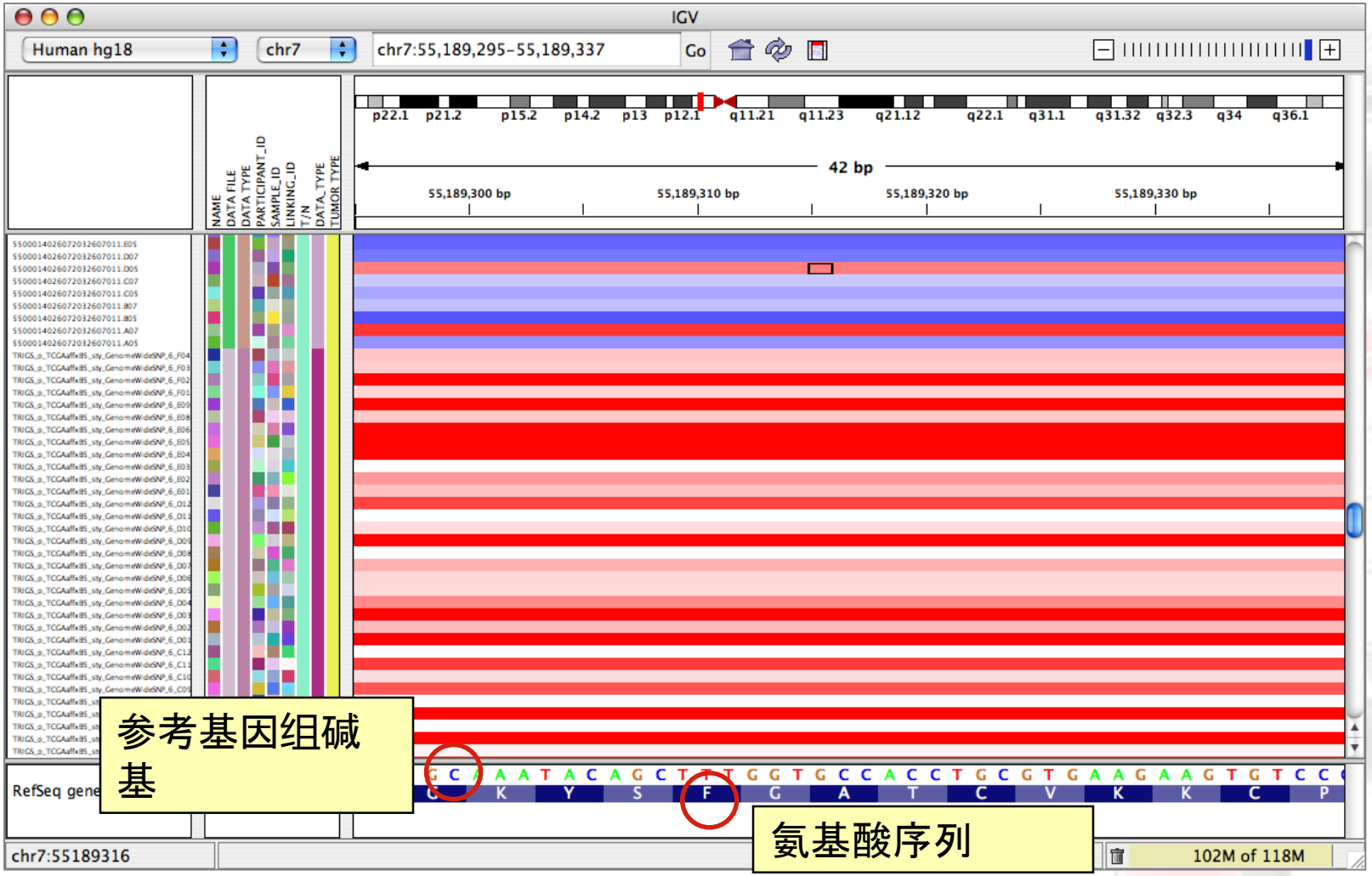
# 数据浏览

## 进一步放大


IGV
chr7:32,402,759-77,950,473
Go
红色标尺展示展示区域在染色体哪个位置
45 mb
40 mb
50 mb
70 mb
展示所示区间的跨度
RefSeq genes
484 tracks loaded
92M of 118M

# 数据浏览

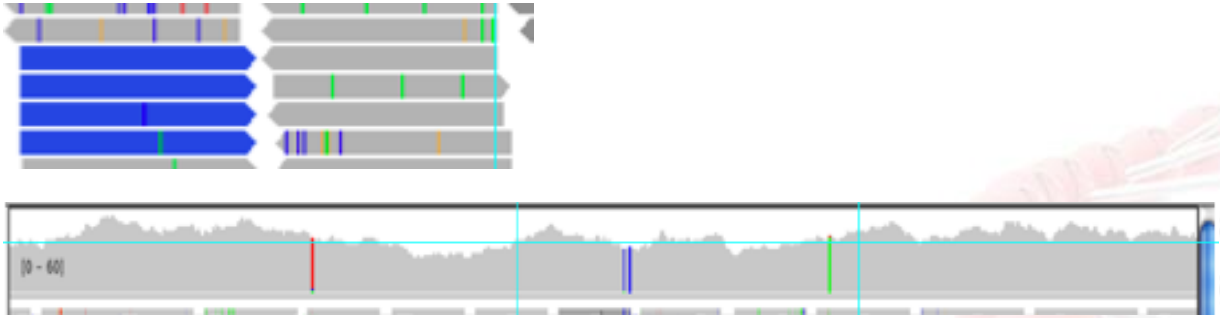
## 放大到单个碱基水平



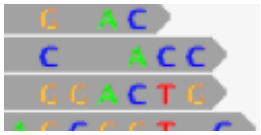
# 缩放大小与分辨率

全染色体—概要信息, e.g. 如覆盖度

~ 50-100 kb -- 局部信息，如基因表达，染色体结构变化，SNPs等

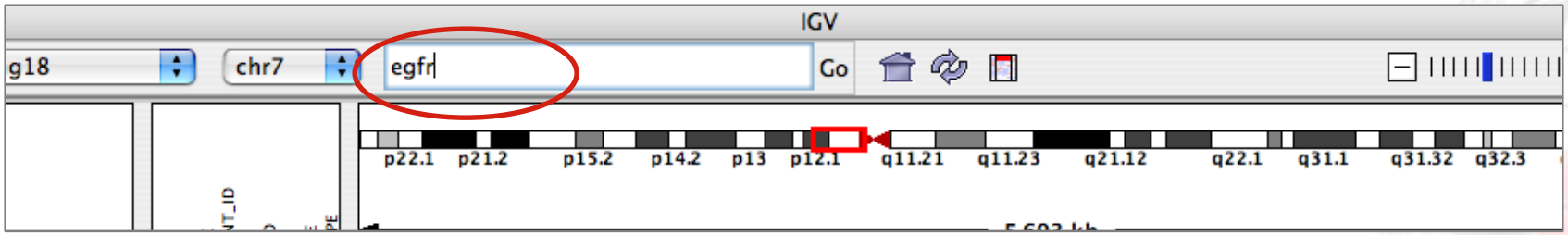


~ 500 bp – 单碱基水平



# 数据浏览

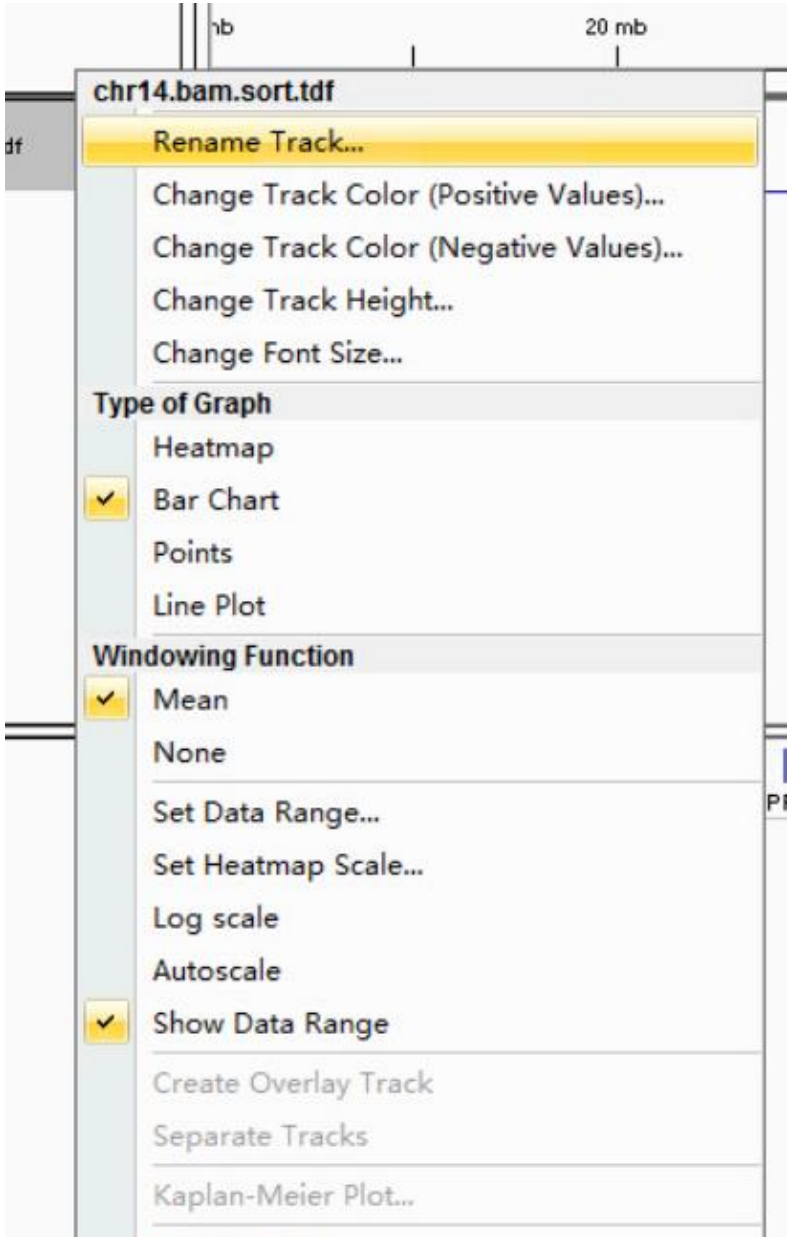
## 直接跳跃到某个基因的位置（填写基因ID）




- 在检索栏可以输入基因的ID来搜索对应的区域。
  - With or without zoom (View > Preferences > General)

- Click on a feature track (e.g. gene track, BED, GFF)
  - Ctrl+F = jump forward to next feature
  - Ctrl+B = jump backward to previous feature

# （4）设置track 属性

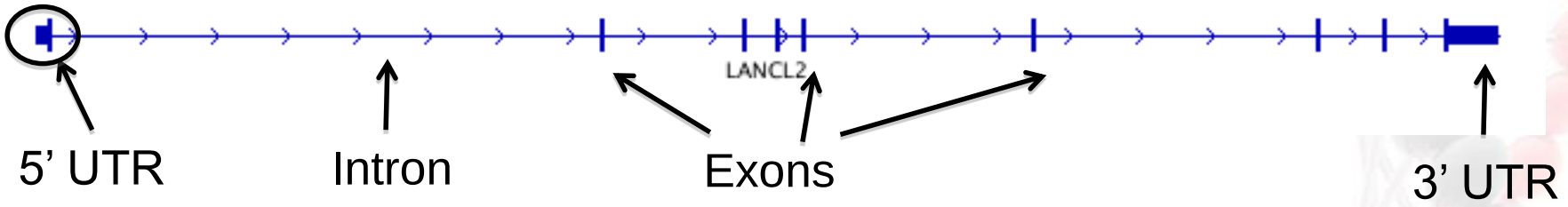



右键点击track,出现的下拉菜单可以显示选择项：

1. Track颜色，高度等；
2. 呈现形式：热图、柱形图等；
3. 取值的方式（均值，标准化等）
4. 删除、保存图片

# 注释的track

基因注释

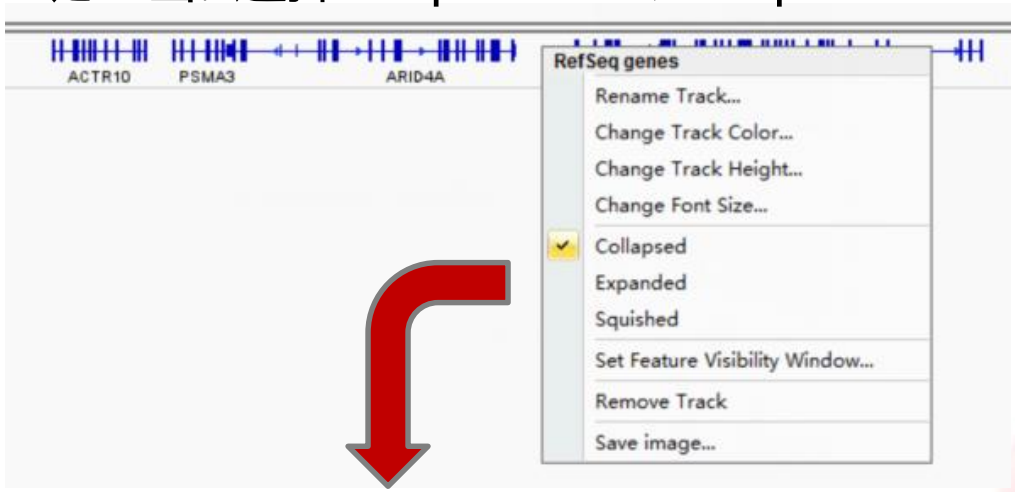



Zoomed in views


# 注释的展示模式

1. 注释的track，默认是单行显示


2. 右键点击，选择“Expanded”或 “squished”可以展开track。

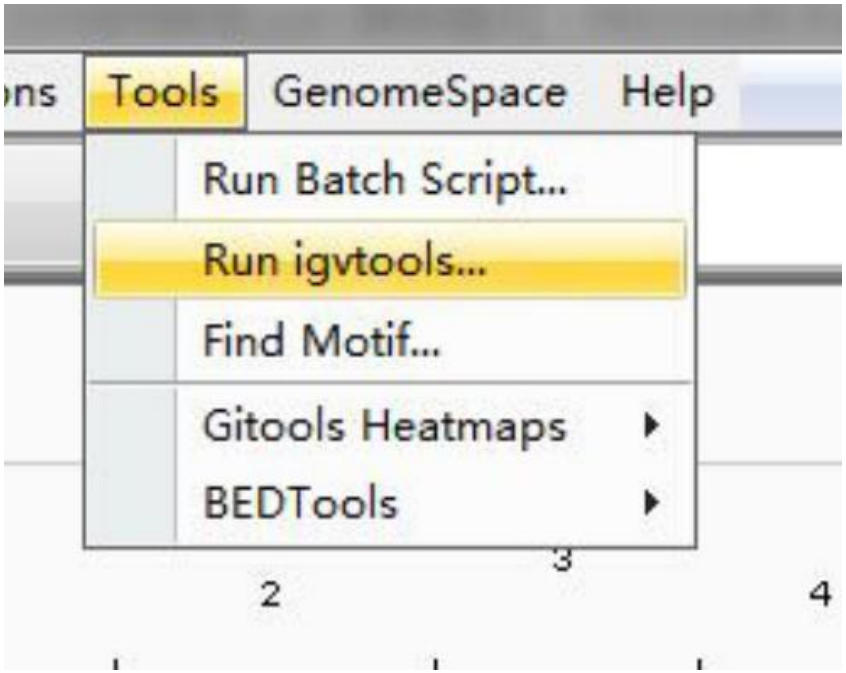


# 提纲

- 软件介绍与安装启动
- 数据导入与文件格式介绍
- IGV tools
- 数据练习

# IGVTools

某些文件输入前需要预处理，以便IGV可以正确读取。



# IGVTools

Integrative Genomics Viewer

## 有4个功能。

**count:** 计算将已排序的比对文件，转化为包含深度信息的TDF文件。
支持的输入格式：sam, .bam, .aligned, .sorted.txt, .bed
备注：count的输出文件也是TDF格式的。这个命令主要针对比对文件设计。

**sort:** 将输入注释或比对文件，根据行的起始位点排序。
支持的输入格式 .cn, .igv, .sam, .aligned, and .bed.

**index:** 给输入文件加索引。
支持的输入格式: .sam, .aligned, .sorted.txt

**toTDF:** 将sorted后的文件，转为二进制的TDF文件 (.tdf)
支持的输入格式: .wig, .cn, .snp, .igv, .gct

# TDF的优势

1.数据被压缩，文件更小，便于导入和分享。

# Count 得到的TDF文件

Count命令主要用于比对文件转化为只含有密度信息的TDF文件,. 例如 ChIP-Seq数据、RNA-Seq 等.

**这个命令才是对我们有用的命令。**


比对文件

格式：bam/sam,
.aligned, or bed format.

Read 密度

格式：TDF

# IGVTools index

可以给注释文件加索引。

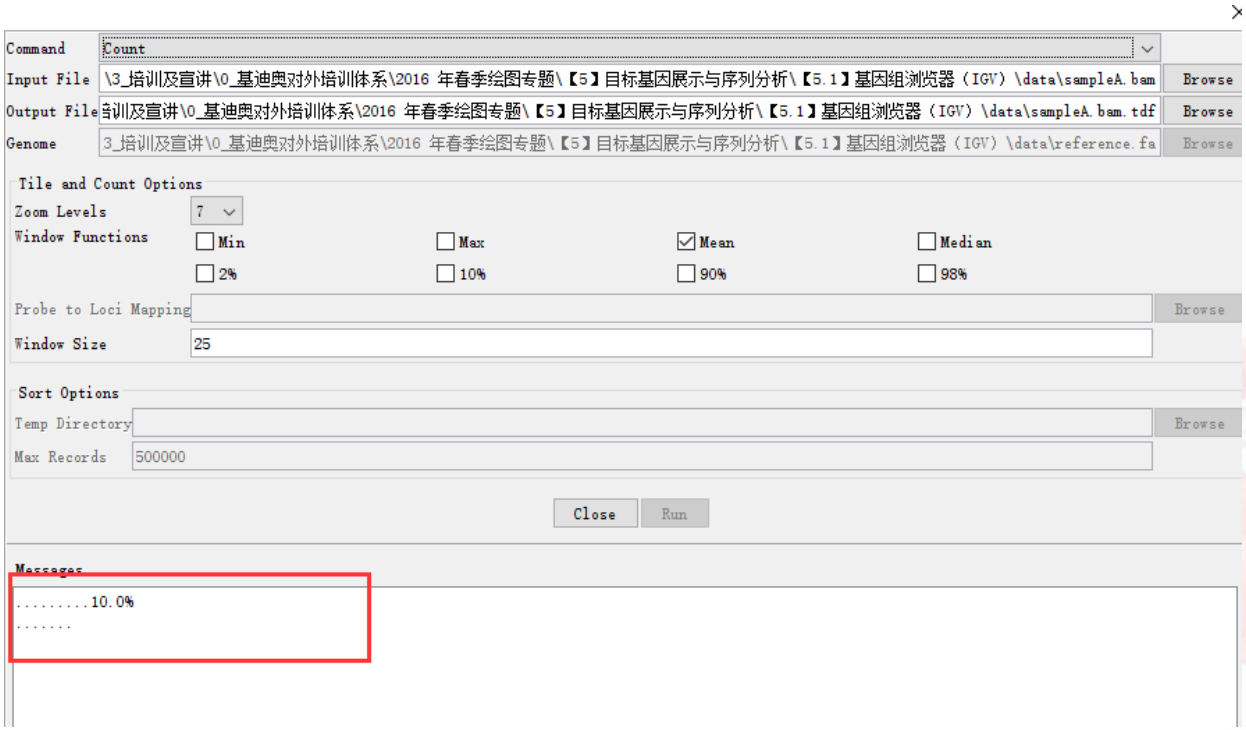
如果是比对文件，只能对SAM文件加索引。(not BAM)

Note: 不要与 *samtools* index 混淆。Samtools用于给 BAM 文件加索引。

SAM => igvtools
BAM => samtools

# 演示

这里我们给出了 这个两个样本比对结果的bam文件，只有count命令可以处理（其他命令只能处理sam文件）



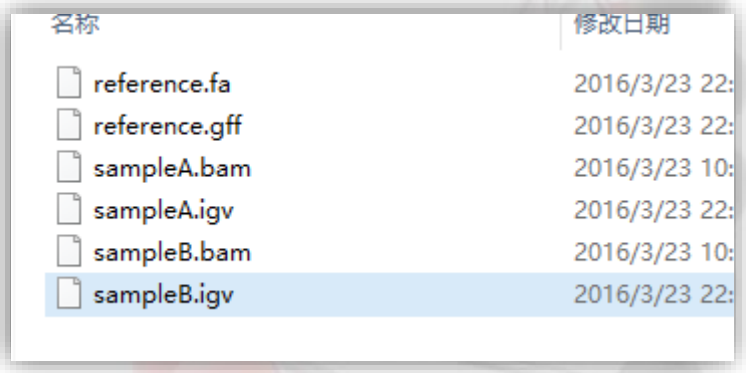

填写好输入文件的bam文件，按照默认设置，就可以输出TDF文件了

# 提纲

- 软件介绍与安装启动
- 数据导入与文件格式介绍
- IGV tools
- 数据练习

# 样本信息与操作

1. 参考序列 reference.fa （文件夹中有）
2. 其他文件
   - 2.1 注释文件（gtf文件）
   - 2.2 比对结果（bam文件）
   - 2.3 甲基化数据（igv文件）
3. 找到目标基因
4. 优化图片



# 操作步骤

1. 导入参考基因组

Genomes → load geome from file → 选择“reference.fa”文件

2. 导入注释文件

file → load geome from file → 选择“reference.gff” 文件

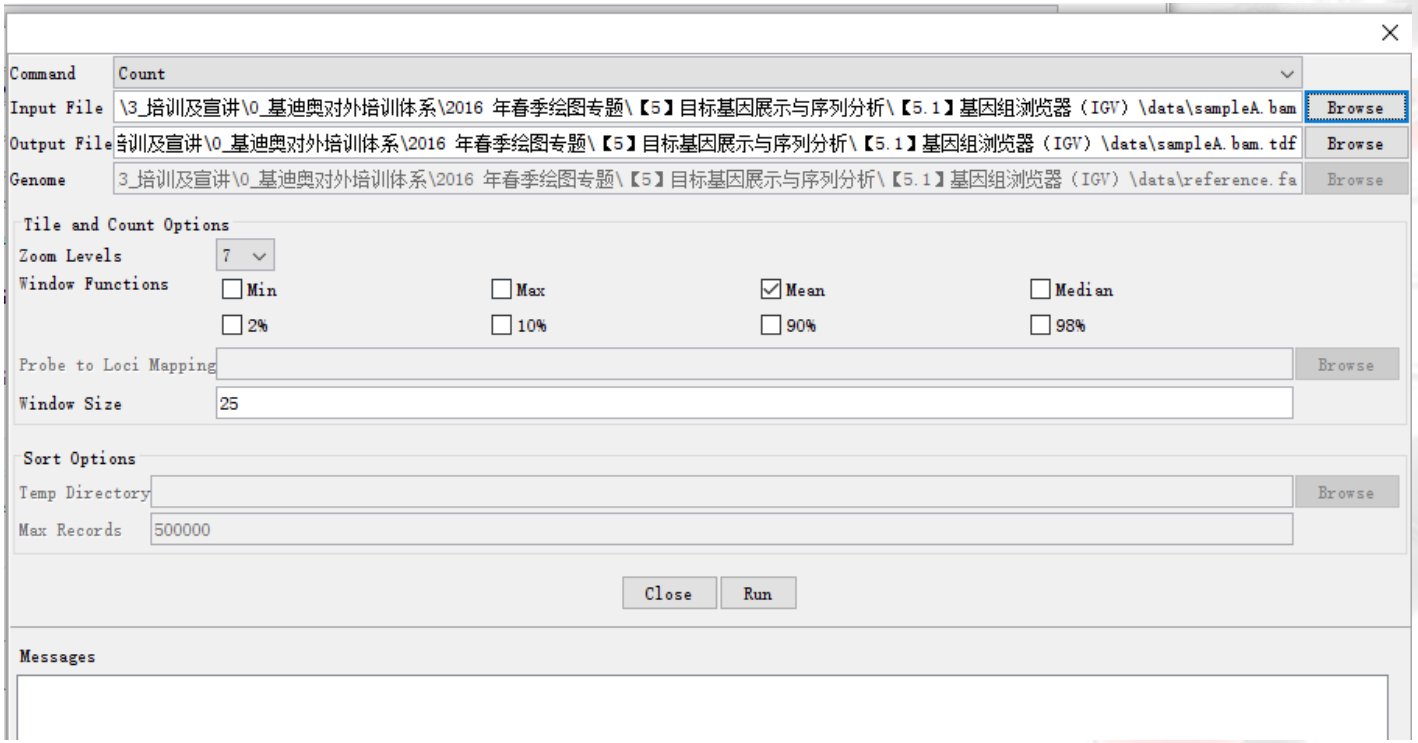
备注：由于gff文件已经是按坐标顺序排列的，因此不需要重新排序。

# 操作步骤

3. 将bam文件转化为TDF文件

Tools → run IGV tools → command界面内选择

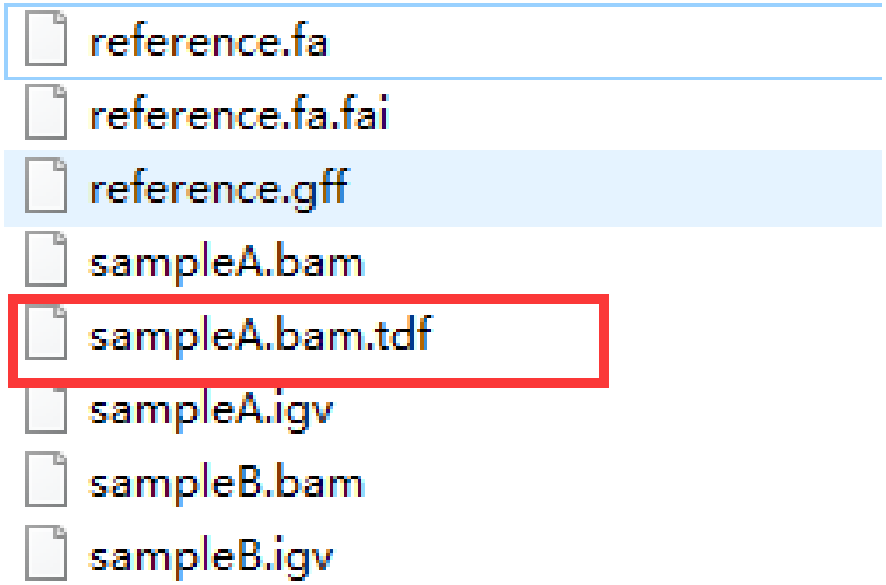
“count” → input界面选择输入bam文件→ 点击run



# 操作步骤

3. 将bam文件转化为TDF文件

- 目录下多出tdf文件。依此生成另一个样本的tdf文件。
- 然后通过file → load from file 导入。



# 操作步骤

3. 输入甲基化数据（IGV格式）

建议先打开IGV文件（使用notepad ++），理解数据的内容。

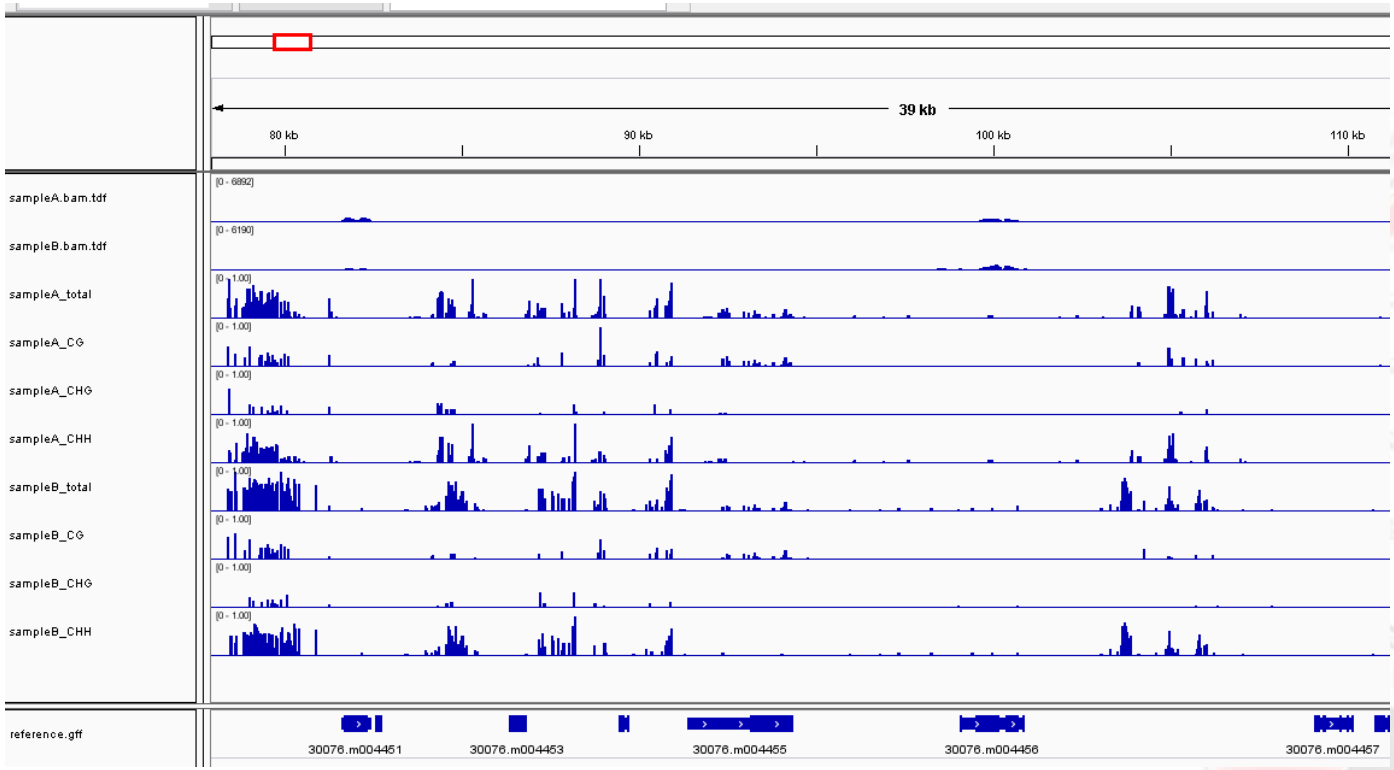
| Chromosome | Start | End | Feature | sampleA_total | sampleA_CG | sampleA_CHG | sampleA_CHH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 30076 | 3 | 3 | methy | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 30076 | 7 | 7 | methy | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 30076 | 14 | 14 | methy | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 30076 | 18 | 18 | methy | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 30076 | 19 | 19 | methy | 0.000 | 0.00 | 0.000 | 0.00 |
| 30076 | 21 | 21 | methy | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 30076 | 24 | 24 | methy | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 30076 | 25 | 25 | methy | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 30076 | 30 | 30 | methy | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 30076 | 41 | 41 | methy | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

文件包含这个scaffolding 所有C位点的甲基化率。后四列，分别是所有C，CG位点，CHG位点，和CHH位点的甲基化率。因为，在植物中非CG的位点甲基化，依然起到很重要的作用。

# 操作步骤

3. 输入甲基化数据（IGV格式）

然后通过file → load from file 导入，结果如下图：



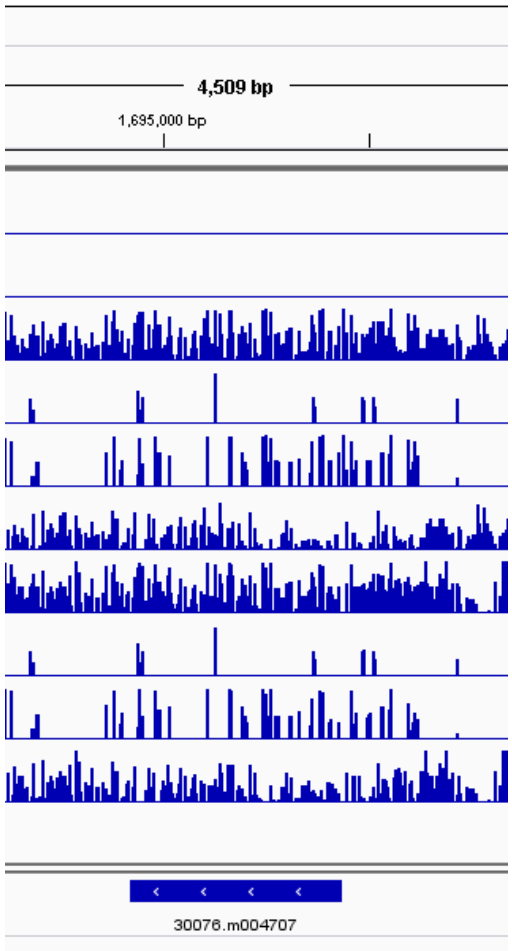
# 目标基因查询

- 查询以下四个基因，看其有什么特点：

30076.m004707
30076.m004684
30076.m004513
30076.m004451

# 目标基因查询

- 30076.m004707



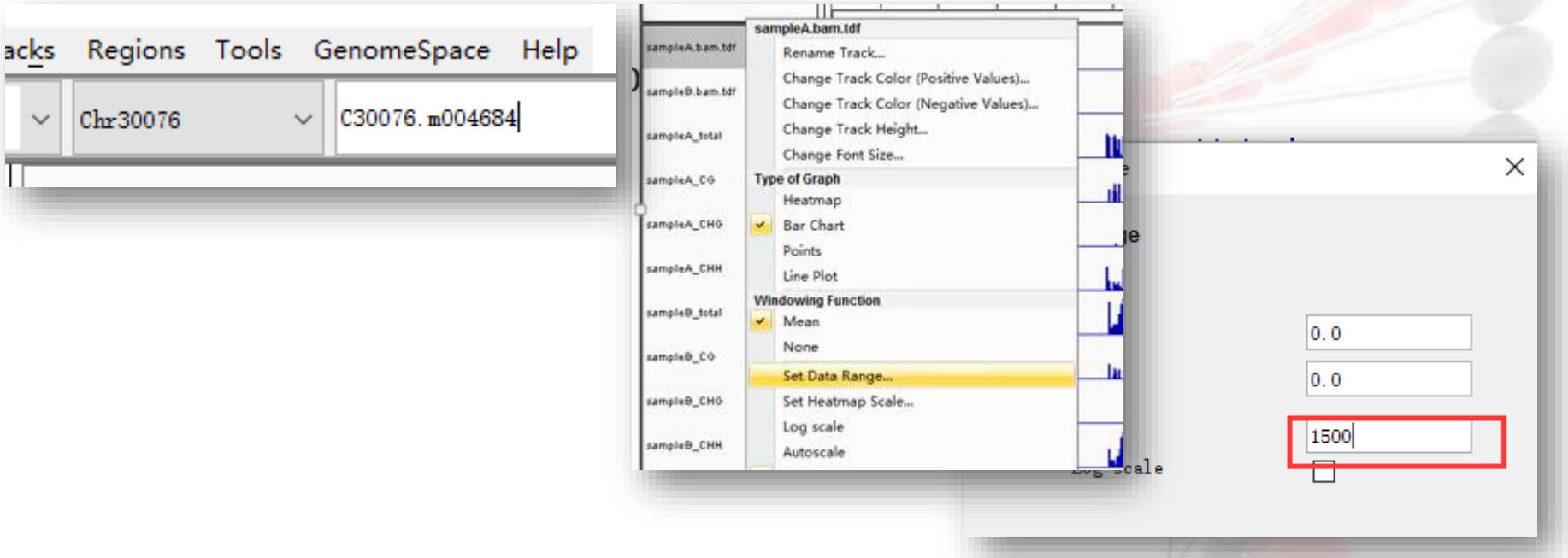

这个基因在两个样本完全不表达，
其甲基化状态如何？

# 目标基因查询

- 基因30076.m004684：

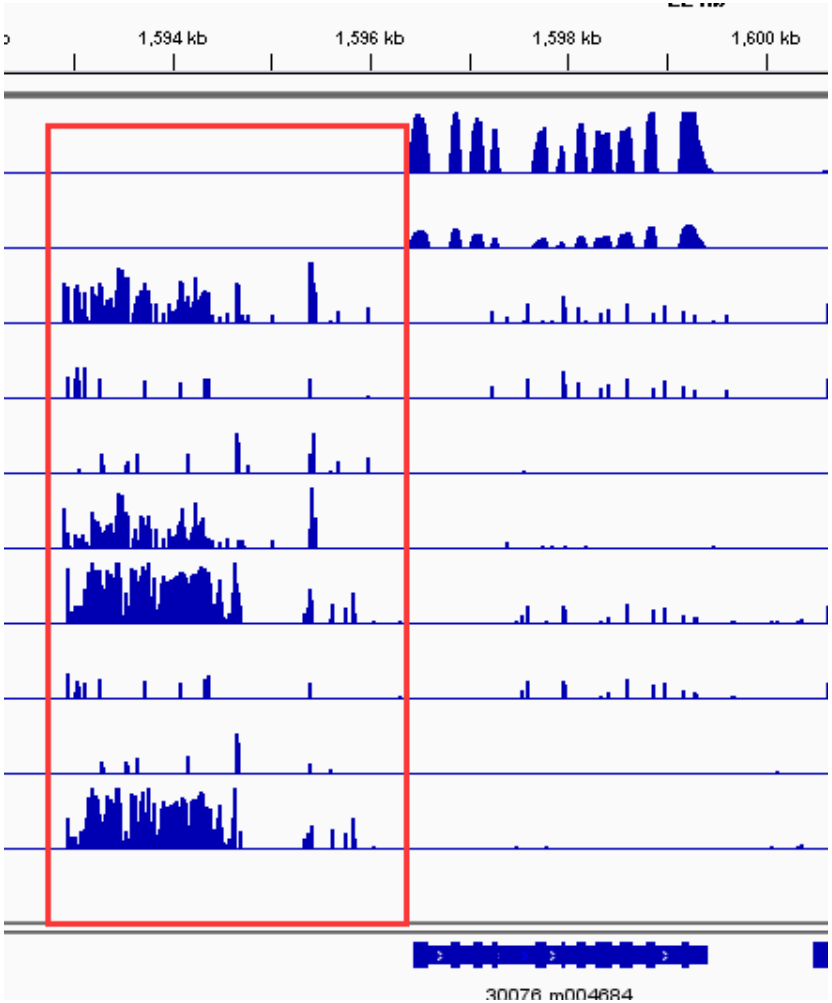
在地址栏直接填写基因名称跳到相应位置。

由于表达量过低，需要修改TDF的显示范围。右键点击sampleA.tdf.bam的名称，选择set data range，改到1500.



# 目标基因查询

- 基因30076.m004684：




- 这个基因在两个样本表达量是否有差异？
- 基因上游是否有甲基化的差异，属于哪种甲基化类型（CG、CHG or CHH）

# 目标基因查询

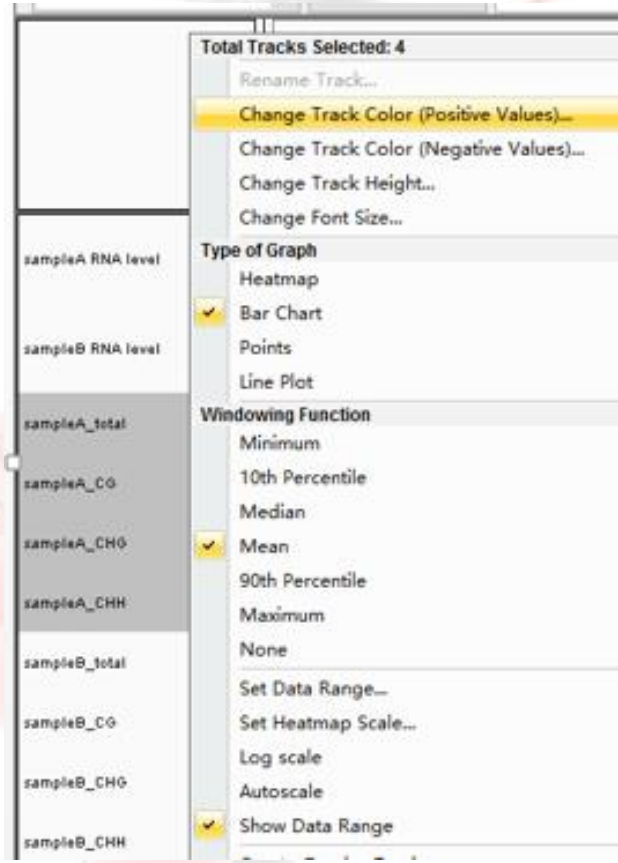
- 类似的，查询以下两个基因，其基因表达与甲基化是否潜在存在关联？（重点查看5’启动子端）

  30076.m004513

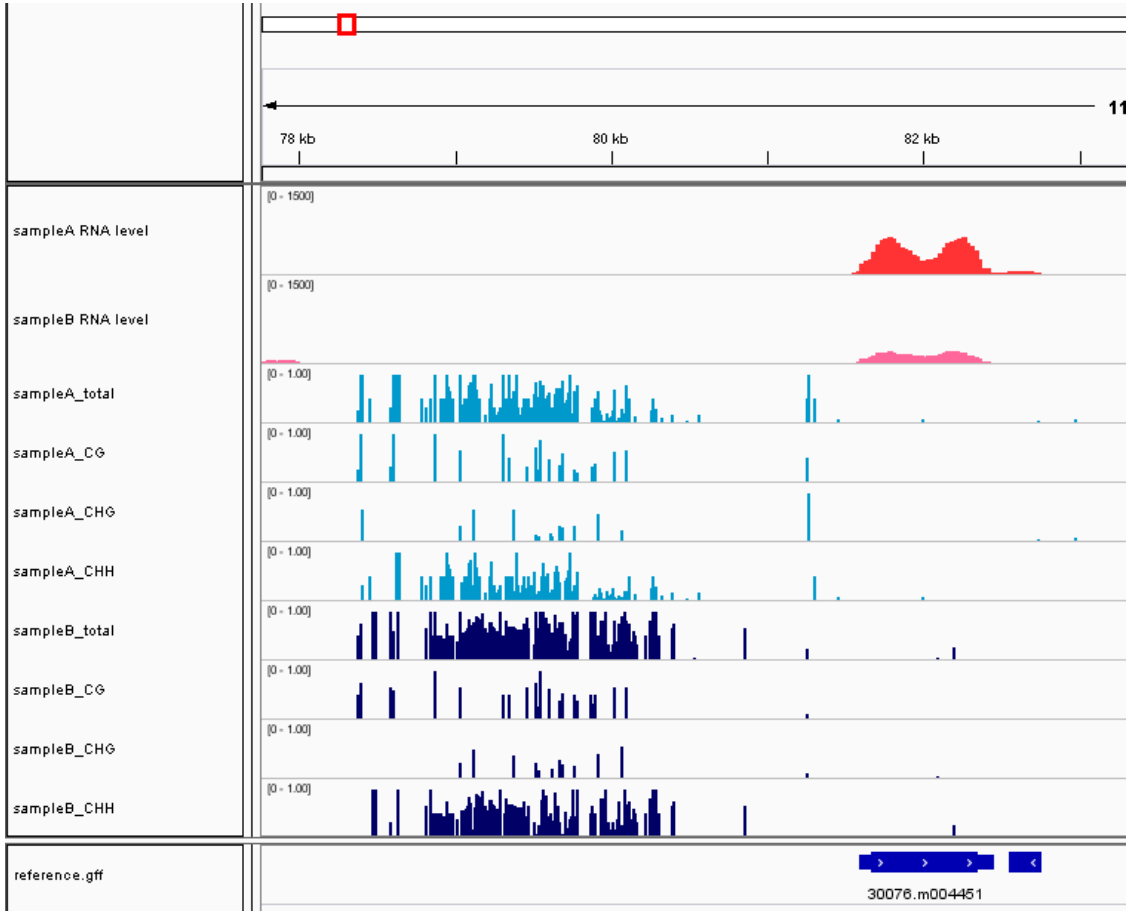
  30076.m004451

# 修改属性

1. 找到30076.m004451这个基因。
2. Bam文件的track名称改为“sample* RNA level”，track height改为60。
3. RNA表达改为红色，甲基化改为蓝色。
4. 高表达组采用深色，低表达组改用浅色。
5. 输出图片。



# 效果图




- 最终反映了甲基化和基因表达潜在的负调控关系。
- CHH的甲基化在这里起到主导作用。

# 谢谢&问题