

ROSALIN Chipseq解析簡易マニュアル

ROSALIN RNAseq解析を行うには事前の登録が必要です。
必要サンプル数分のチケット購入後にアクセスIDおよびパスワードが送付されます。

株式会社ワールドフュージョン
techsupport@w-fusion.co.jp
03-3662-0521

本ドキュメントの著作権は全てワールドフュージョンに帰属します

データ登録 - プロジェクト作成

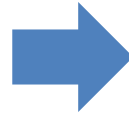


Demonstration Project

This project contains demo experiments for you creating unlimited new comparisons and adding datasets come to life.

1 Experiment(s) Total

ADD NEW PROJECT



新規に解析を開始するには「Add New Project」ボタンをクリックし、プロジェクトタイトルと簡単な説明を記入します。

ONPROJECT

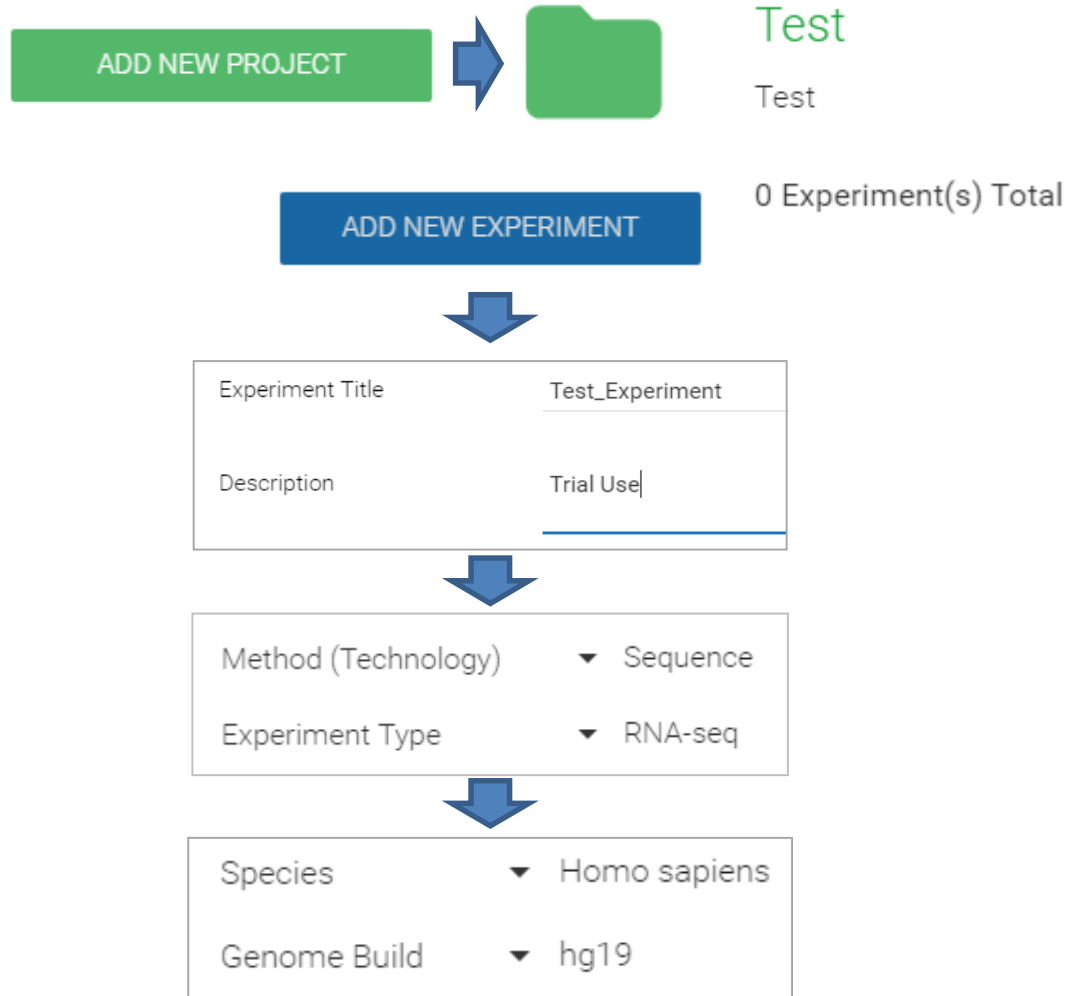
Your first step starts with creating a new project.

A project is the place where you will store your experiments. This is the entry point for all analyses related to the project. Let's begin by entering a title as well as a brief description.

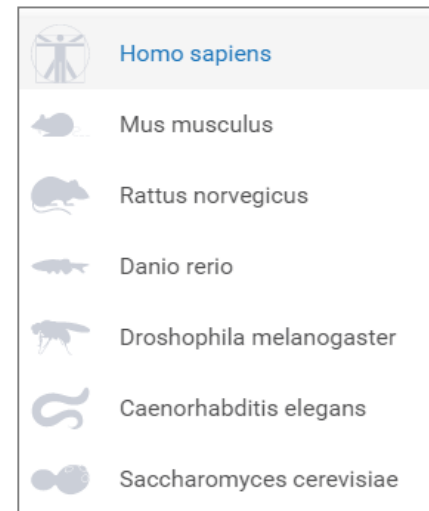
Project Title	<input type="text" value="Test"/>
Description	<input type="text" value="Test"/>

NEXT

データ登録 – Experiment(実験条件)登録



1. プロジェクト作成後、「ADD NEW EXPERIMENT」で実験条件を設定
2. Experiment Title とDescriptionを記入
3. Method > Sequenceを選択
Experiment Type > Chip-seq を選択
4. 生物種と参照配列のゲノムバージョンを設定



現在選択できる生物種

ONEXPERIMENT

Specify your sample kit model(s)

Please select the kit you are using for this experiment and provide the following key details about the overall design of your experiment. Your answers to these questions will help us understand how to gather information on each of your samples.

You have selected the required kits. You may optionally add Auxiliary Kits (i.e. spike-ins, rRNA depletion, etc)

Kit Vendor ▼ Illumina

Kit Model ▼ AmpliSeq™ for Illumina ...

Lot Number REPLACE KIT

Sample Name 29_S4

Description

Extraction Protocol Beads

Your Samples

Grouped & Colored By ▼ None

Name	Extraction Protocol	Lab Id	Barcode
26_S1	Tube		
27_S2	Tube		
28_S3	Beads		
29_S4	Beads		

YES! I HAVE REVIEWED MY SAMPLE DATA

1. Libraryの作成に使用した製造元・キット名を入力
2. Replicateの有無と全サンプルの数を入力
Replicateは同じサンプルの繰り返し試験の有無を指します

Do you have replicates? ▼ No

Total number of samples ▼ 4

3. サンプルの属性情報(Attribute)となるタイトルを設定
4. サンプルの属性情報(Attribute)タイトルに情報を入力
これは後に群わけの指標になります

Select Attribute to Add

- Age
- Biomaterial Provider
- Cell Line
- Cell Type
- Development Stage
- Disease

Cell Line ×

NEXT

5. サンプルの設定の終了

データ登録 –Fastqファイルをアップロード

- 「CREATE NEW COMPARISON」をクリックし比較の組み合わせを設定
先に設定したAttribute情報を元にCondition群とControl群へドラッグアンドドロップで設定する
Attributeに依存せずサンプルごとにドラッグアンドドロップで分けることも可能
SAVEをクリックすると比較設定を保存する

CREATE NEW COMPARISON

Select Category → Select & Drop Items →

Attributes	Extraction Protocol	Tube
Samples		Beads

Condition

0 eligible samples EDIT

Control

0 eligible samples EDIT

Beads vs Tube

- FASTQファイルをアップロードする
Single readかPair readを選択、“LEFT-RIGHT” readをクリックしてアップロードするFastqファイルを設定

Sequencing Strategy Single-End Paired-End

クリック

26_S1	2%	RIGHT READ
27_S2	LEFT READ	RIGHT READ
28_S3	LEFT READ	RIGHT READ
29_S4	LEFT READ	RIGHT READ

EXPERIMENT DETAIL
Test_Experiment

10% Sample Queue

Workflow Start Wed, 14 Mar 2018 18:45:06 GMT

Total Samples 4

NEXTをクリックで解析開始

Chip-seq Fastq upload-2

1、Libraryの作成に使用した製造元・Kit名を入力します。ChipseqではLibraryキットを選択した後、続いてサンプリングキットを選択する必要があります。

Libraryキットを選択

Sampleキットを選択



- ChIP Kit - One Step
- ChIP Kit Magnetic - One Step
- ChIP-Seq High Sensitivity

キットの候補
L=Library kit
S=Sample kit

Kit Vendor ▾ Abcam

Kit Model ▾ High Sensitivity ChIP Kit

Lot Number

ADD KIT

Do you have replicates? ▾ No

Do you have input controls or IgG controls? ▾ Yes

Total number of antibodies ▾ 1

Total number of samples ▾ 2

3、抗体情報を設定します。使用した抗体が”Antibody Name”にない場合、マニュアル操作で入力後、ピークサイズをBroad/Narrowから選びます。
Broad Domains=H3K9me3などのヒストン修飾
Narrow Peaks=Transcription Factor

ONEXPERIMENT

Describe each antibody used in your experiment

Describe the antibodies you are using in your experiment. In addition to the name and source of your antibodies, identify the type of genomics regions expected to be enriched. The two possible types of enrichment are **broad domains**¹ and **narrow peaks**². To help you in this choice, you will be able to select commonly used antibodies where the type of enrichment is already setup.

¹For example: histone modifications such as H3K9me3 that cover entire gene bodies

²For example: a transcription factor bound to a promoter or enhancer

Antibody Name	Vendor	SKU	
m6a			<div style="border: 1px solid gray; padding: 2px;">Broad Domains</div> <div style="border: 1px solid gray; padding: 2px; background-color: #f0f0f0;">Narrow Peaks</div>

← NEXT

ADD ANTIBODY

4、サンプルが1対1のコントロール(=BackGround)を持つか設定します。
You have indicated that you are utilizing **input controls** or **IgG controls**.
a matching control for each sample in your experiment. If you do, please

ONSAMPLE

Enter basic identifier information for each of your samples

We recommend the use of descriptive sample names and reserve laboratory identifiers for easy-to-use short names in a lab environment. Barcode is provided for your convenience and is an **optional** field.

Sample Name	Laboratory Identifier	Tube/Plate Barcode
m6a		
Control		

1、 入力したサンプルの名前がリスト表示されるので、ControlもしくはIgG Controlになるサンプルにチェックを入れます。

Choose your **input controls** or **IgG controls** by placing a checkbox able to link each of your controls to their corresponding samples

Sample Name	Is This a Control?
m6a	<input type="checkbox"/>
Control	<input checked="" type="checkbox"/>

2、 サンプルのControl (=BackGround)もしくはIgG Controlを”Select the Control”に設定します。

This feature allows you to assign your samples to their 1:1 relationship with a sample. The left column is a list control in the right column.

Sample Name	Select the Control
m6a	▼ Control

3、 サンプルごとに属性情報を設定します。

Sample Name	m6a
Description	Test
Antibody	▼

4、 サンプルとControl(=BackGround)の組み合わせの設定や属性情報を確認後、Yes〜ボタンをクリックします。

Samples
Grouped & Colored By ▼ None

Name	Antibody	Lab Id	Barcode	Input Control
m6a				Control

Input / IgG Controls

Name	Lab Id
Control	

YES! I HAVE REVIEWED MY SAMPLE DATA

EDIT SAMPLE DATA EDIT CONTROLS

5、 Fastqファイルを空欄へドラッグアンドドロップしてアップロードします。

Sequencing Strategy

Single-End Paired-End

m6a	WAITING...	shALKBH5-rep1-IPR1.fastq
Control	7%	shALKBH5-rep2-input.R1.fastq

NEXT

アップロード終了後、Nextボタンが有効になり解析が開始可能になります。

Chip-sea Result View



Demonstration Project

This project contains demo experiments for you to explore. Feel free to test out Rosalind by creating unlimited new comparisons and adding filters to see how quickly these genomic datasets come to life.

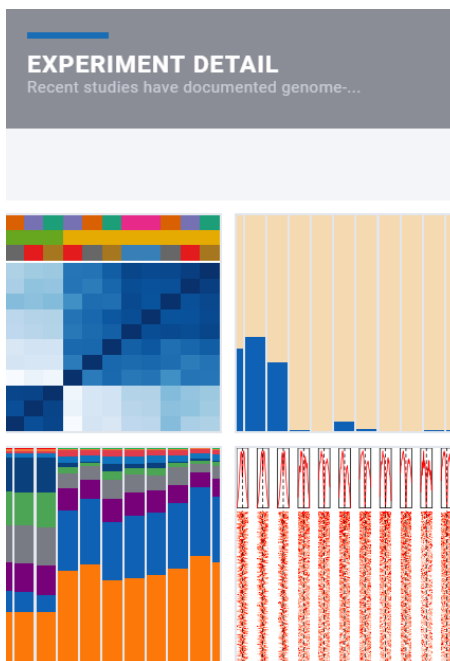
2 Experiment(s) Total



Establishment of Enhancer Repertoires that Orchestrate the Mye...

Recent studies have documented genome-wide binding patterns of transcriptional regulators and their associated epigenetic marks in hematopoietic cell lineages. In order to determine how epigenetic marks are established and maintained dur...

先に実行したProject名のついたフォルダ、もしくは“Demonstration project”をクリックするとChipseqの解析結果が表示されます(下記図)。



表示する情報を切り替え

Establishment of Enhancer Repert...

Recent studies have documented genome-wide binding patterns of transcriptional regulators and their associated epigenetic marks in hematopoietic cell lineages. In order to determine how epigenetic marks are established and maintained dur...

Method (Technology)	Sequence
Experiment Type	
Species	Mus musculus
Genome Build	mm10
Kit	Homebrew
Number of Samples	12
Attributes	Antibody, Time Course, C



サンプルごとのリード数、QC通過リード数、重複リード%などの情報を表示



サンプル情報



Fastqファイル, BAMファイル, Wigファイルのダウンロード



統計解析を実施します

Chip-seq Result View

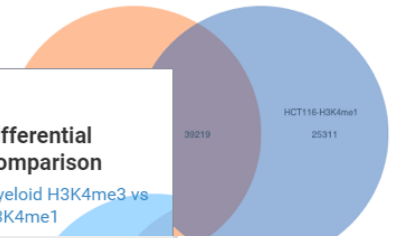


Interactive Analyses

You will find below all the analysis resulting from the design phase. Please select a specific analysis to start e

1、 ボタンをクリックし、“CREATE NEW COMPARISAON”をクリックすることで比較するサンプルと群を設定できます。

Differential Comparisonをクリックするとすでに行った Chipseq解析結果を閲覧できます。



ADD GROUPをクリックすると3つ目以降の群を設定できます。

Chip-seq Result View

1、Differential Comparisonをクリックし、解析結果を開きます。

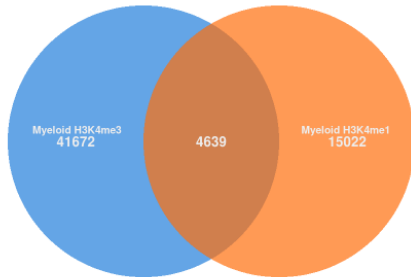


2、解析結果が表示されます。

チェックを入れた群(or Sample)について検出されたピークに関する結果が表示されます。
 Intersect=ベンズにおいて交差する領域のピークに関する解析結果が表示されます(下記例の場合4639ピーク)。
 Only Myeloid H3K4me3 = 当該群でのみ検出されたピークに関する結果(41672ピーク)。
 Myeloid H3K4me3= Myeloid H3K4me3で検出されたピークに関する結果(46311ピーク)。



数字はピークの数を示します



- Intersect
- Everything
- Only Myeloid H3K4me1
- Only Myeloid H3K4me3
- Myeloid H3K4me1
- Myeloid H3K4me3

Peak Results

ChIP peaks identified in your comparison are listed in the table below, sorted by best score. Click on any row to launch the Tracks Plot page to further explore peak shapes and gene positioning.

Position	Best Score	Max Height	Annotation	Distance	Gene Name	Description
chr13:35647856-35649154	6.89147	19.9575	Intergenic	-11357	Cdyl	chromodomain protein, Y...
chr11:18969987-18971279	6.69005	15.7115	intron	48336	Meis1	Meis homeobox 1
chr2:125131003-125132474	6.16101	1.6644	Intergenic	-4954	Ctxn2	cortexin 2

Best Scoreは群を構成するサンプルの中で最も高いScoreを示したサンプルのScore(=-log10 P value)

テーブルをダウンロード



ピークで高頻度に検出される既知のモチーフ (Known)と新規に高頻度に検出されるモチーフ (de novo)配列

Known Motif Enrichment Results



de novo Motifs



Term

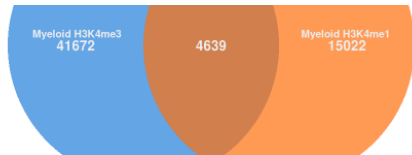
Term	pValue	# of genes in term	# of genes in target
intracellular	8.67e-85	12941	5217
intracellular part	1.79e-81	12834	5168

Match	% peaks with motif (% background)	pValue
Etv2(ETS)	11.98% (8.41%)	1.00e-121
ETS1(ETS)	13.35% (9.61%)	1.00e-119
Match <th>% peaks with motif (% background)</th> <th>pValue</th>	% peaks with motif (% background)	pValue
ERG(ETS)	15.76% (11.06%)	1.00e-165



Chip-seq Result View

1、表に出ている領域をクリックするとピークが閲覧できるページへ飛びます。



Position	Best Score	Max Height	Annotation	Distance	Gene Name	Description
chr13:35647856-35649154	6.89147	19.9575	Intergenic	-11357	Cdyl	chromodomain protein, Y...
chr11:18969987-18971279	6.69005	15.7115	intron	48336	Meis1	Meis homeobox 1



Myeloid H3K4me3 vs H3K4me1

Chromosome 1

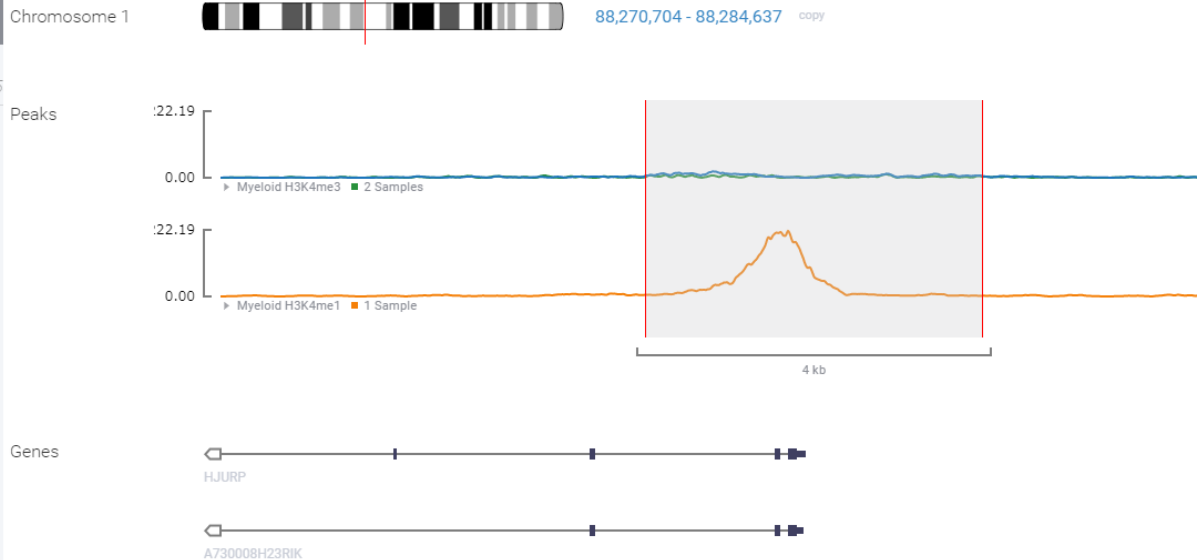
Peaks

Gene Name or chr13:11905

Peak Display

- Myeloid H3K4me3
 - H3K4me1-Myeloid Rep 1
 - H3K4me1-Myeloid Rep 2
- Myeloid H3K4me1
 - H3K4me3-Myeloid

ADD TRACK / GROUP



群ごとのピーク、ピークラインはサンプルごとに表示されています(画面左のサンプル名チェックで変更可)。

遺伝子コード領域情報

Significant Peaks **Nearby Peaks**

選択したSignificant Peakの近傍で検出されたピークを表示します。

Position	Best Score	Max Height	Annotation	Distance	Gene Name	Description
chr1:88275704-88279637	344.362	222.194	promoter-TSS	-91	Hjurp	Holliday junction recog...
chr12:113422554-113427222	318.703	205.55	Intergenic	-64677	Adam6b	a disintegrin and metal...

クリックで表示する領域を変更できます。