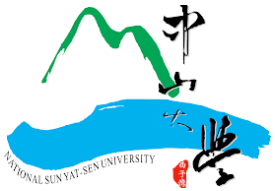
# Genomics- Human genome project

# 基因組學－人類基因體計劃及其應用

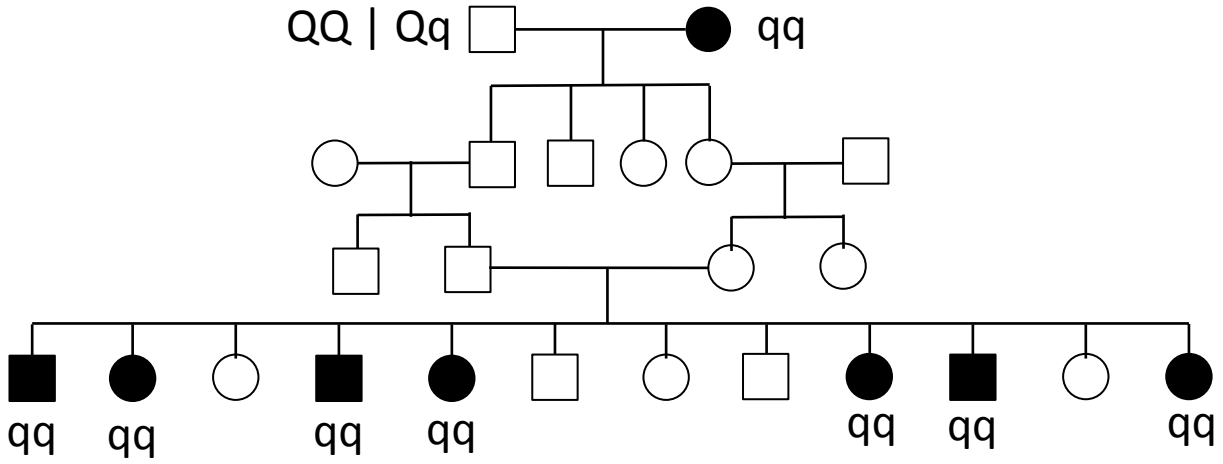



國立中山大學 生物科學系 黃明德

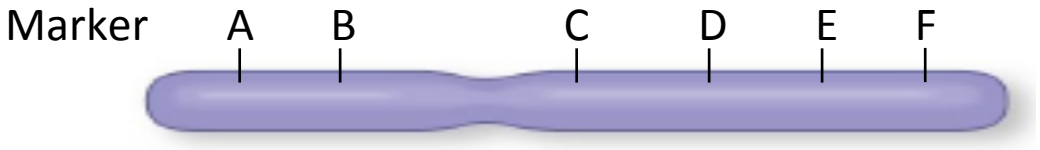
Q： 如果你在研究紫色眼睛基因，你要如何找到標的基因？

- 科學家利用其它性狀或分子標誌(molecular marker)標定眼睛顏色基因

# 家族圖譜與基因定位




| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| #1 | aa | aa | AA | Aa | Aa | AA | aa |
| #2 | Bb | Bb | bb | Bb | Bb | bb | bb |
| #3 | cc | Cc | Cc | cc | Cc | Cc | cc |
| #4 | dd | Dd | dd | dd | Dd | dd | dd |
| #5 | ee | ee | ee | ee | ee | ee | ee |
| #6 | ff | ff | Ff | ff | ff | Ff | ff |




假設: 大寫的基因座都是自於父本 QQ | Qq，而母本qq則是全都是小寫基因座

# Solomon islands blonde (索羅門群島金髮)

Q: 當金髮不再和膚色性狀相連結，你當如何研究？

# 基因組學 (Genomics)

- 基因組(genome)：細胞內所有的DNA，包含核DNA(nuclear DNA)、葉綠體DNA、粒腺體DNA

- 基因組學(基因體學)

  目的：研究基因組結構、基因功能、基因演化

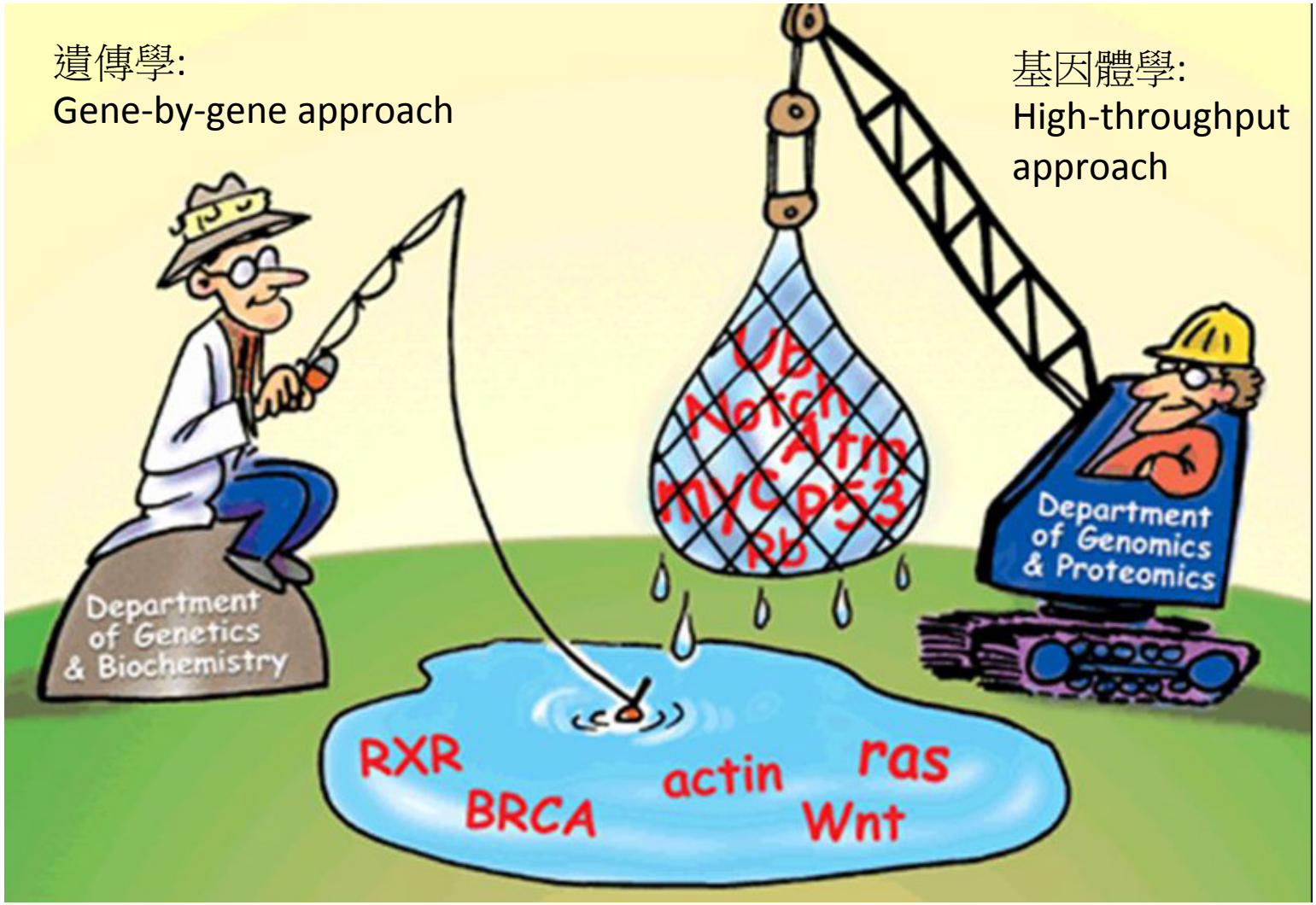
  工具：

  - 基因組定序 – 基因組完整定序
  - 生物資訊學 – 序列組裝及分析
  - 遺傳學 - 基因功能分析

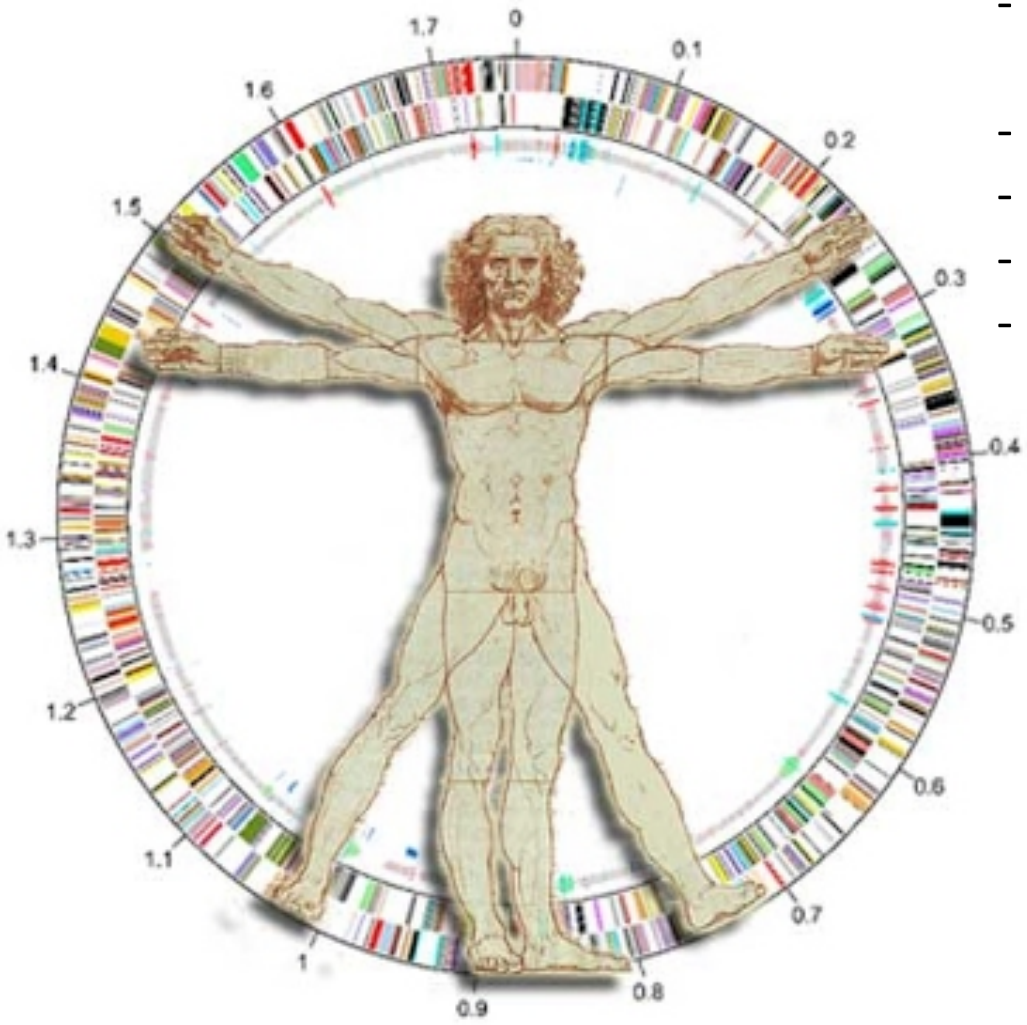
  流程：基因組定序 -> 基因註解 -> 基因功能分析

後基因體時代

- 基因體學與遺傳學相較，為以高通量(high-throughput)策略研究基因功能



# Human genome project




- 目的：將人類基因組序列完全定序並註解所有基因
- 1990計劃啟動
- 2003公佈草圖
- 總經費 $3,000,000,000美元
- 共18個國家參與

# 人類基因組計劃/Human genome project (HGP)

- 1984 – 科學家於美國能源部會議提出構想
- 1986 – 與會科學家再次強調該計劃重要性並討論
- 1988 – 與會科學家一致同意該計劃重要性並準備著手進行
- 1990 - 提出初步構想(為期15年, 經費美金 $3,000,000,000,採用階層式定序法)
- 1992 - 發布低解析度基因組草圖(genome map)
- 1998 – Celera公司宣佈將以霰彈槍定序法於五年內完成基因組定序，經費 $300,000,000，完成後將註冊所有基因
- 1999 – 第一條染色體公布 (chromosome 22)
- 2000 - Celera公司宣佈已完成 ~97%
- 2003 - 人類基因組計劃完成

# 定序金額試算

- Sanger 定序法
  單次定序: 500-1000 bp
  單次定序費用: $ 3

- Human genome: 3,200,000,000 bp
  3,200,000,000 / 500 = 6,400,000 定序次數
  6,400,000 * 3 = $ 19,200,000

**Why need $3,000,000,000?**

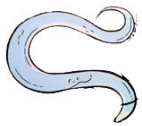
# 基因組大小

- 單位**(bp / base pair)**

  **1** bp = 1 bp ,　1 kb = 1,000 bp,　1MB = 1,000,000 bp,

  1GB = 1,000,000,000 bp

- 基因組大小

| Species | *Porcine circovirus* | *Escherichia coli* | *Caenorhabditis elegans* | *Drosophila melanogaster* | *Homo sapiens* | *Amoeba dubia* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Genome Size | 1759 bp | 4.6 MB | 100 MB | 130 MB | 3.2 GB | 670 GB |
| Common Name |  Virus |  Bacteria |  Nematode |  Fruit fly |  Human |  Ameoba |
| 基因數目 | 3 | 4288 | 19,000 | 13,600 | ~ 20,000 | ? |

C值謎(C-value enigma): 生物的C值（或基因組大小）並不與生物複雜程度相關的現象

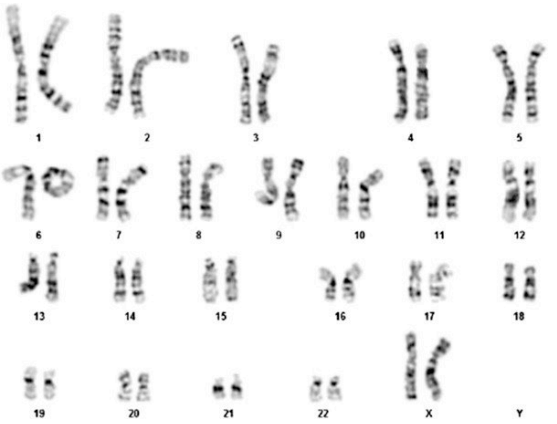
# 人類染色體數目及其大小


Total: 3,234.83 Mb

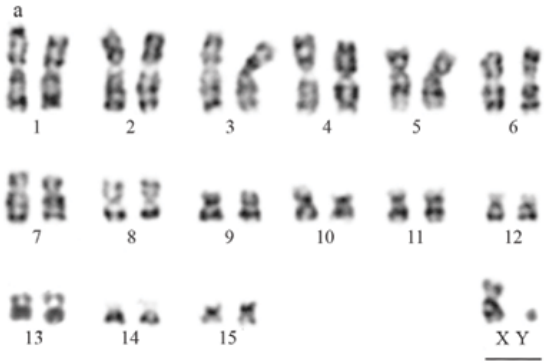
# 染色體條帶技術

- 利用染劑使染色體呈現各自獨特條帶形態，藉以區別染色體的不同

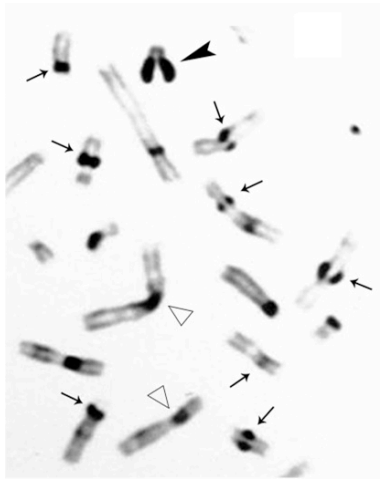
| 技術 | 方法 | 亮帶 | 暗帶 |
|---|---|---|---|
| G 帶 | 胰酶 + Giemsa | GC rich | AT rich |
| R 帶 | 塩處理 + Giemsa | AT rich | GC rich |
| Q 帶 | Quinacrine | GC rich | AT rich |
| C 帶 | $Ba(OH)_2$ + Giemsa | 著絲點以外 | 著絲點 |



G-banding

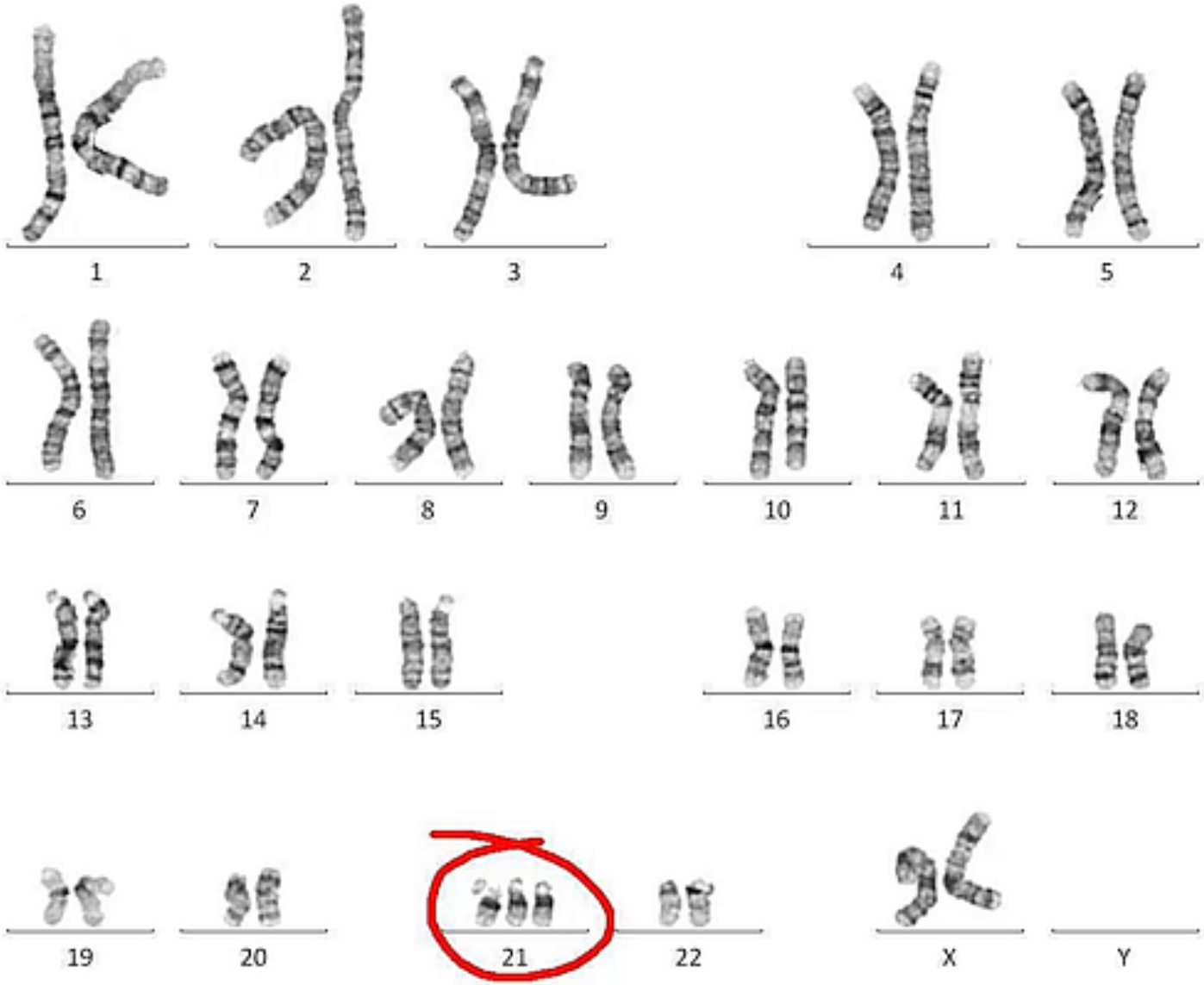



R-banding



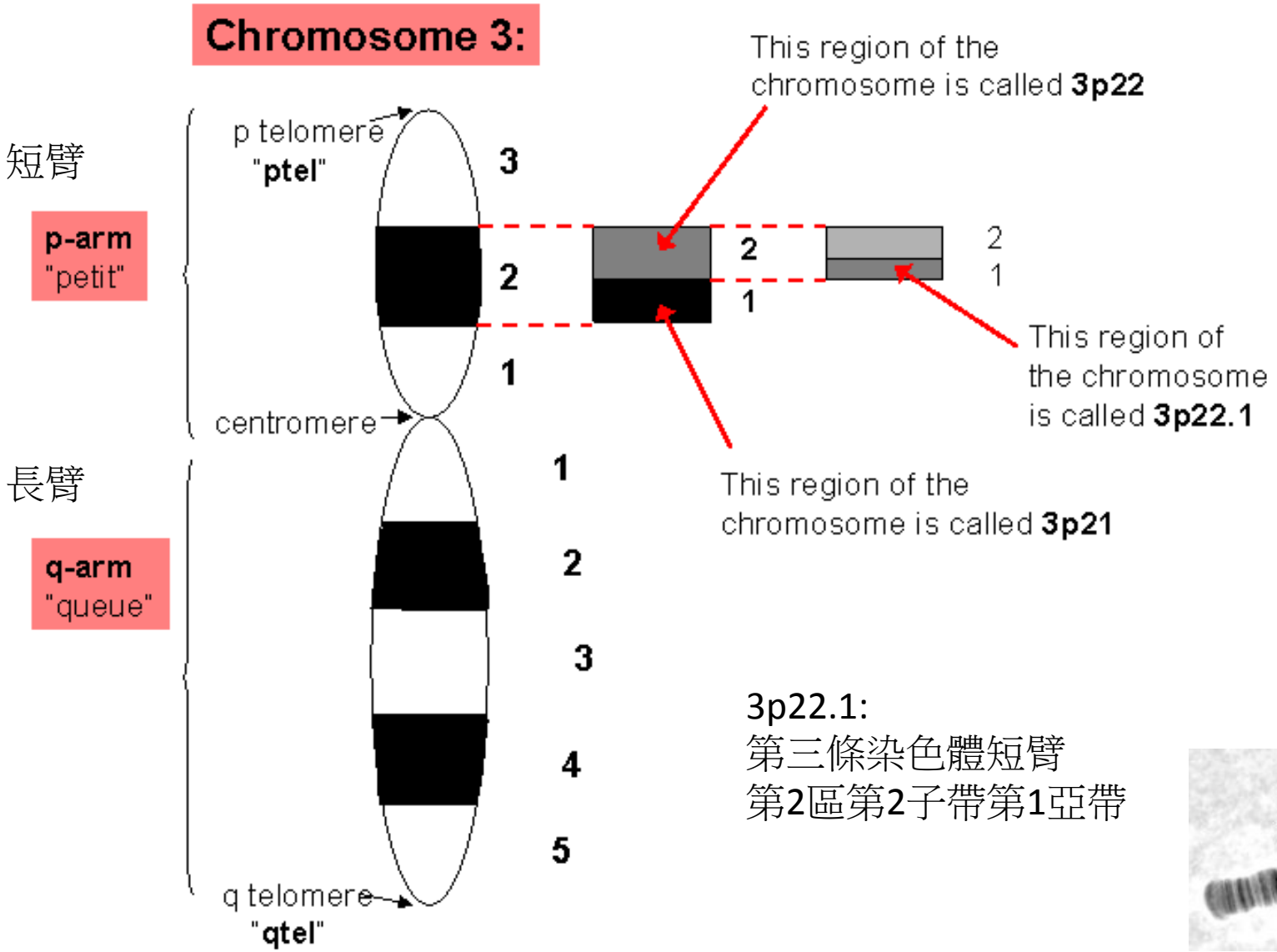
C-banding

# 唐氏症-第21號染色體異常

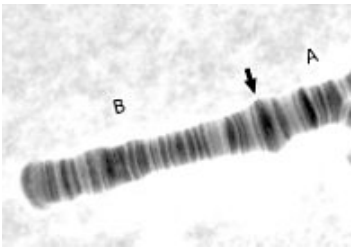



https://www.quora.com/How-does-having-an-extra-chromosome-cause-Down-syndrome

# 細胞遺傳圖譜 (cytogenetic map)

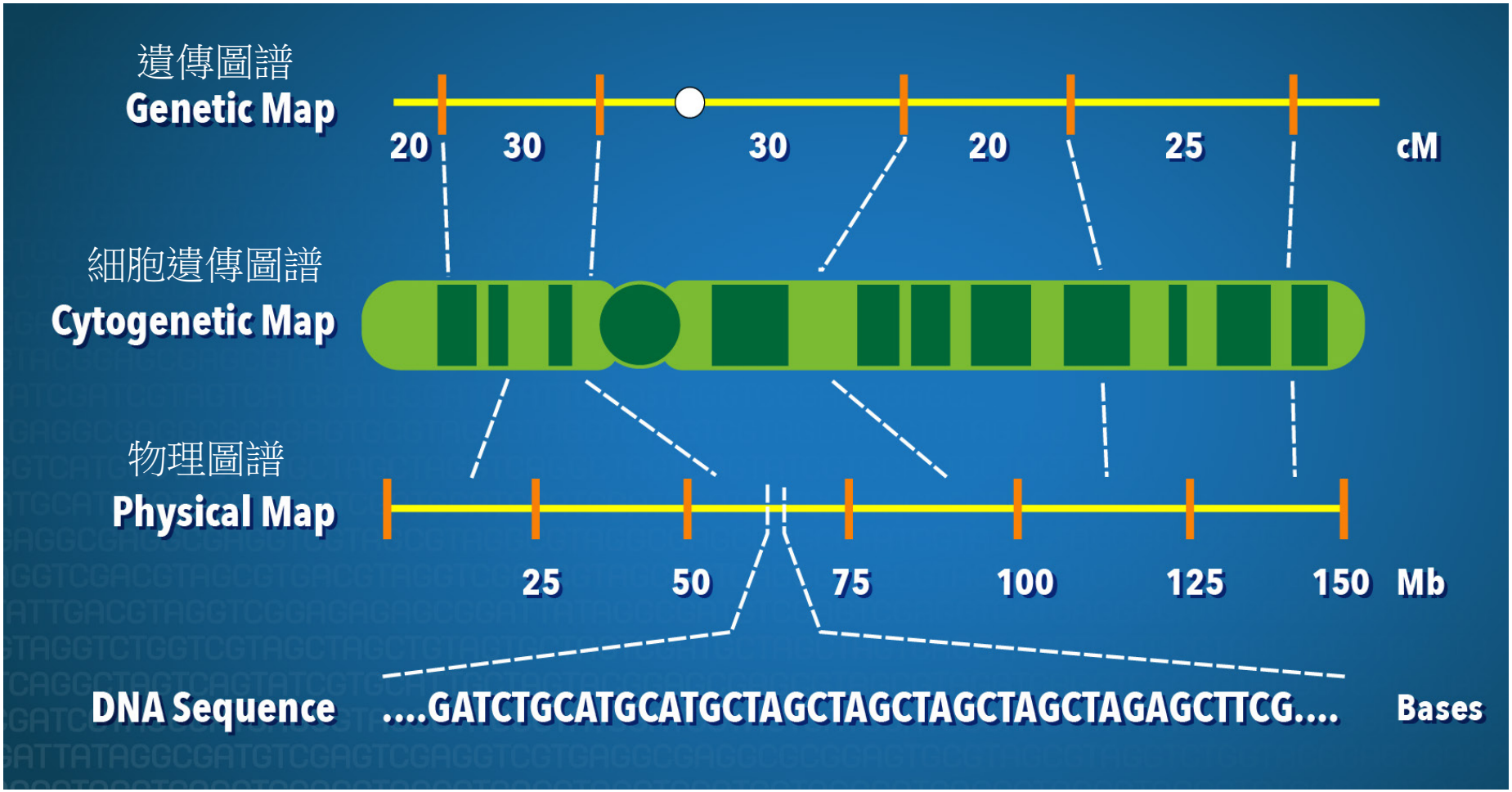



3p22.1:
第三條染色體短臂
第2區第2子帶第1亞帶



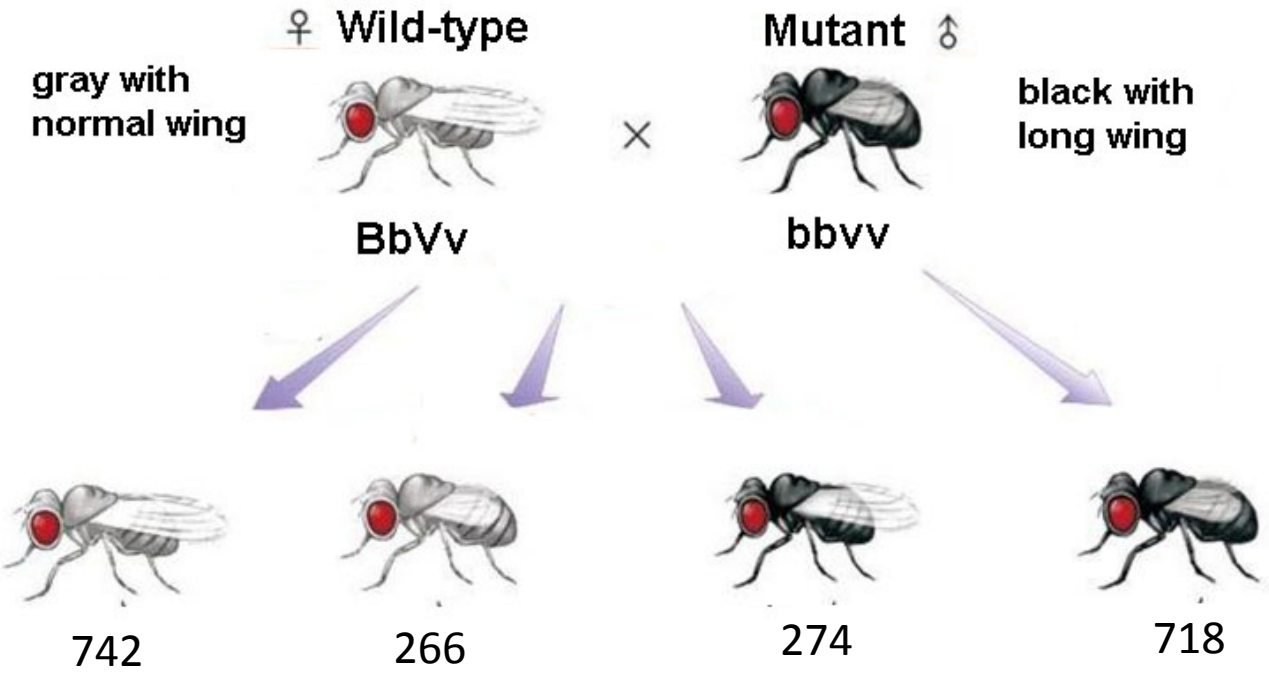
# Genome map (基因組圖譜)

Cytogenetic map: 由染色體染色而來，沒有單位，以區域劃分
Genetic map: 由互換率計算而來，單位cM (centimorgan)
Physical map：由序列定序而來, 單位bp



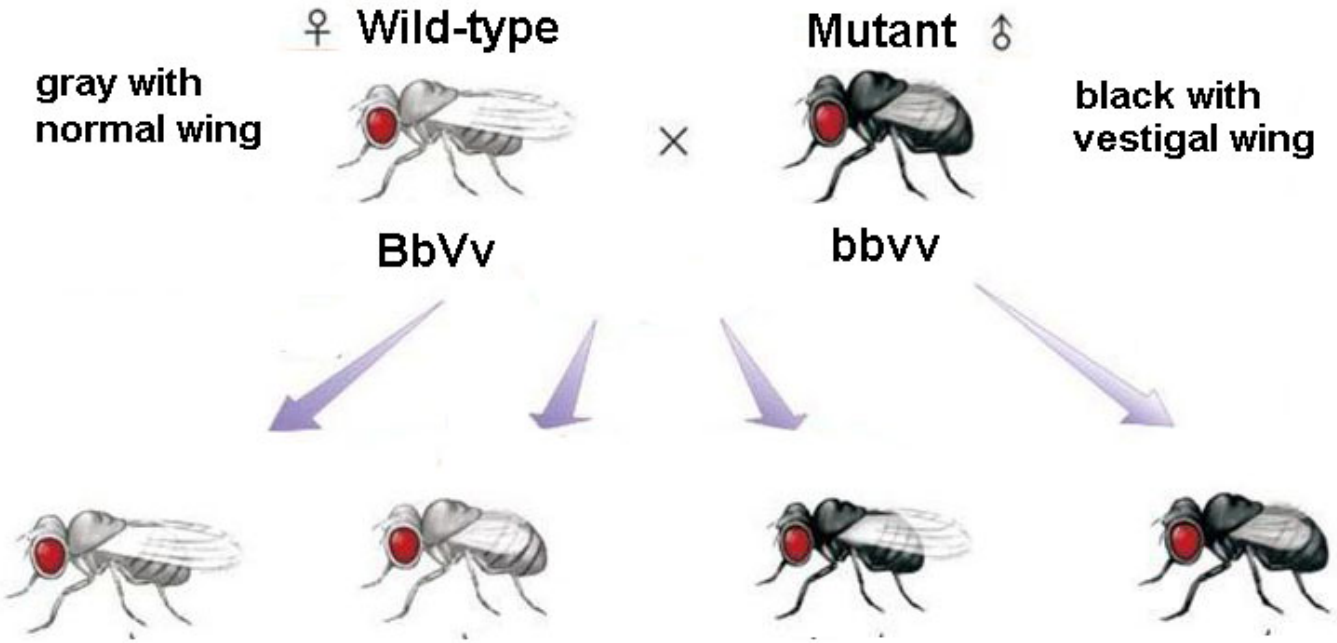
# Chromosome recombination (染色體重組)

野生型果蠅(灰身長翅)和突變果蠅(黑身短翅)交配產生2000隻後代，其中742隻為灰身長翅、266隻為灰身短翅、274隻為黑身長翅，以及718隻為黑身短翅
請問控制體色(B基因)及翅膀長度(V基因)兩基因是否為連鎖？如果是的話，請問其相距多少centimorgan?



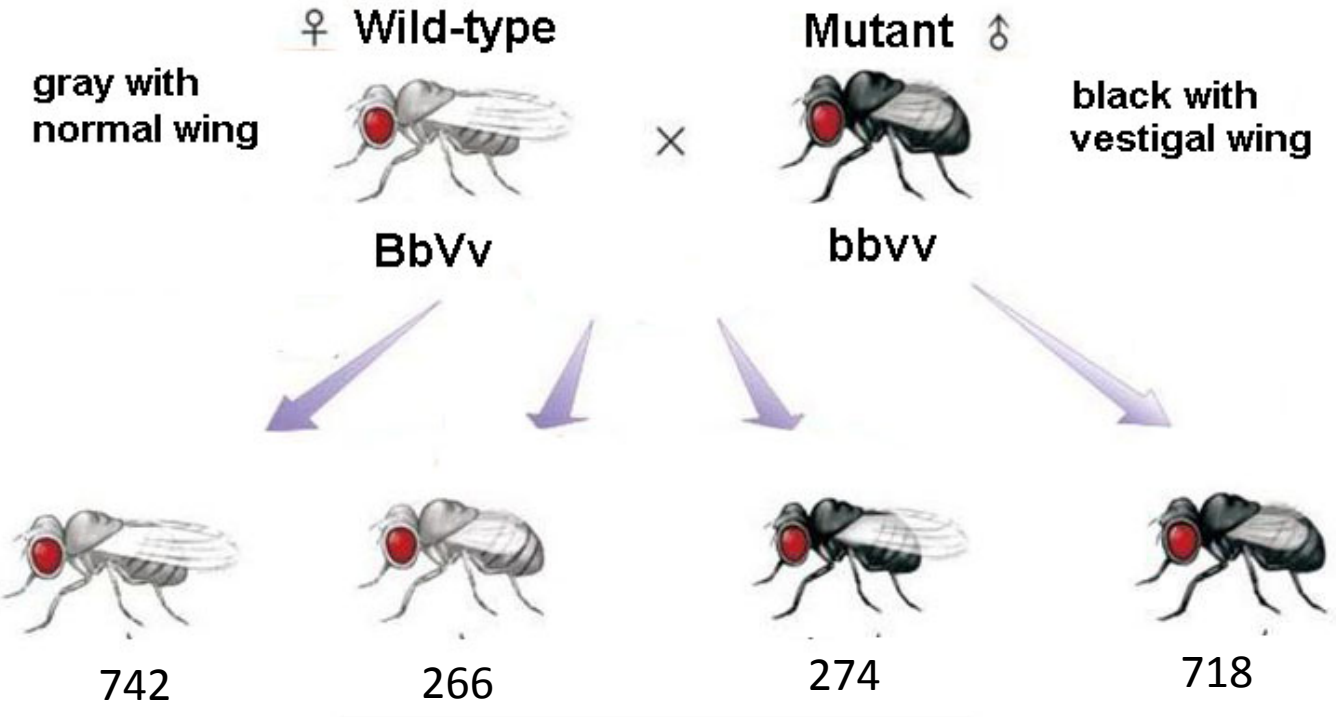

假設：母本BbVv來自於基因型為 BBVV 及 bbvv的後代

# Chromosome recombination (染色體重組)



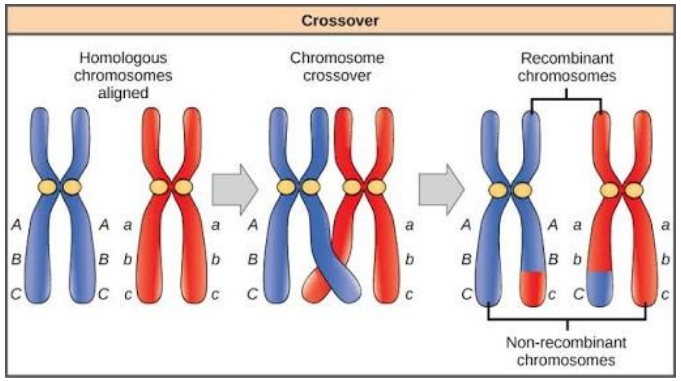

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| $F_1$ 子代 | 742 | 266 | 274 | 718 |
| B, V 非連鎖基因之期望值 | 1125 | 450 | 450 | 125 |
| B, V 為完全連鎖之期望值 | 1000 | 0 | 0 | 1000 |

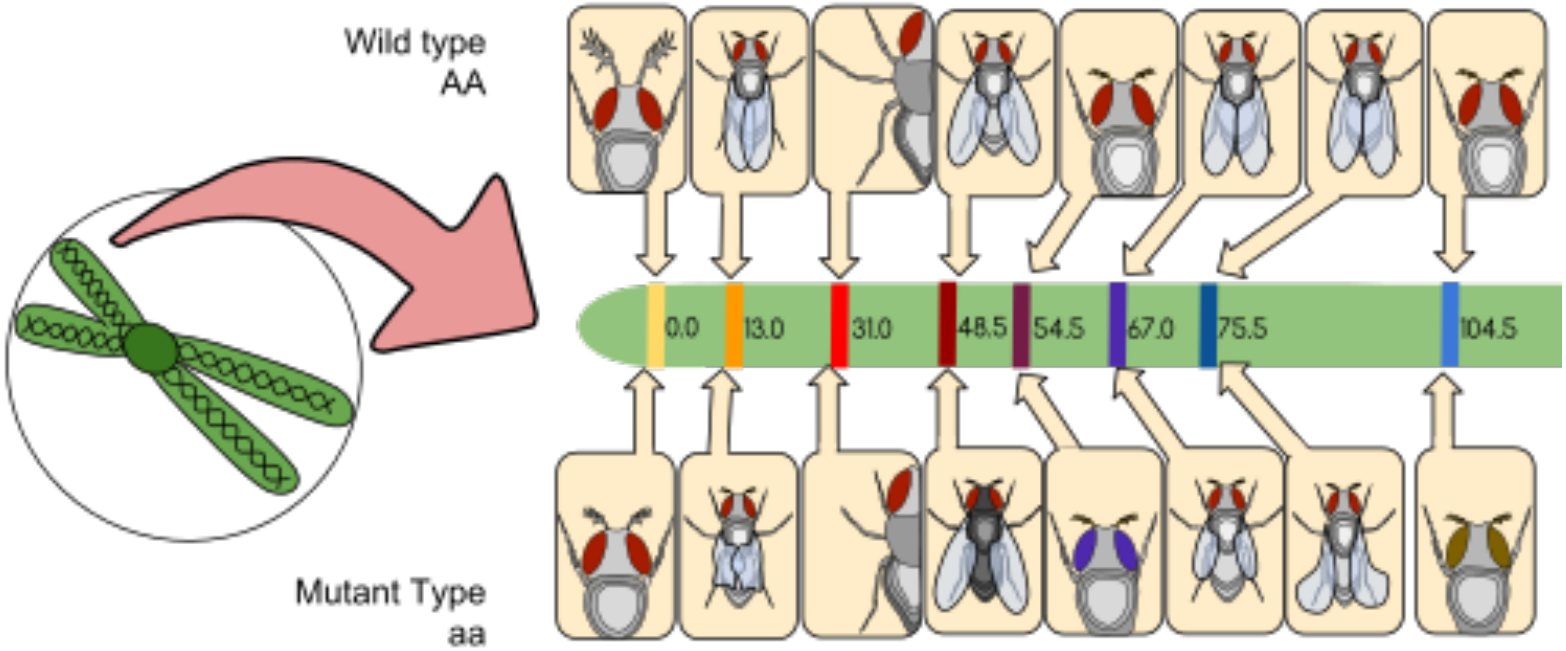
# Recombination rate (重組率)



# 遺傳圖譜

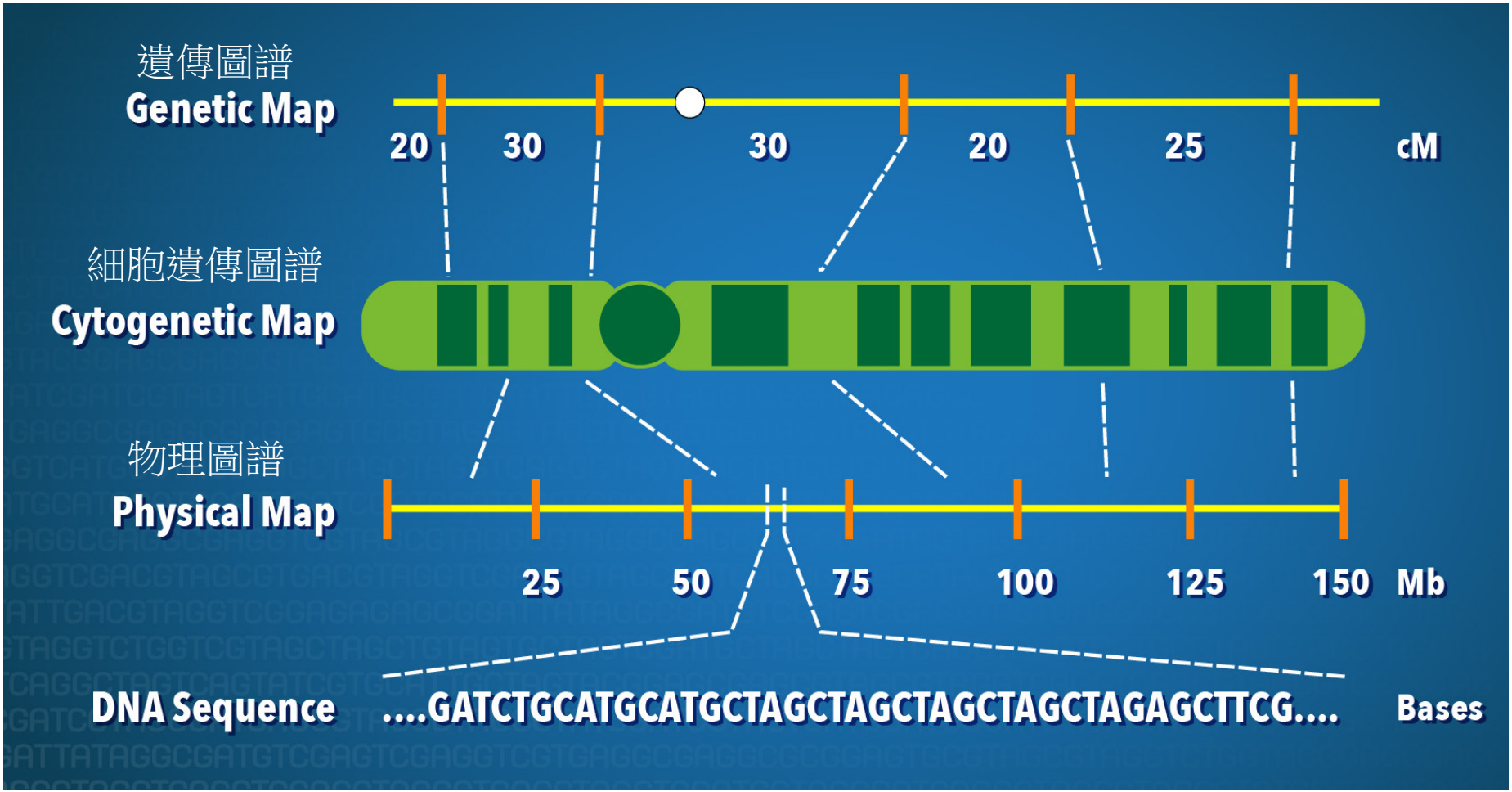
- 1% 重組率 = 1 cm (centimorgan)
- 重組率 < 50% --> ”連鎖”
- 重組率 = 0% --> “完全連鎖”
- 在人類細胞中 1 cM 約 1 Mb



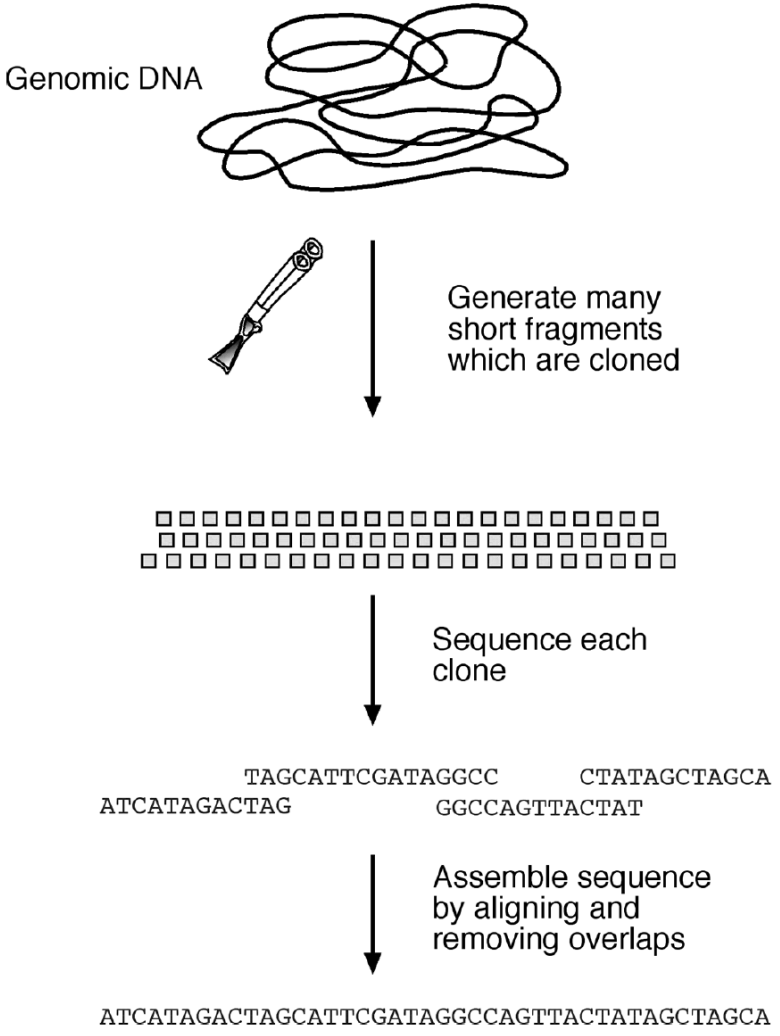
# Genome map (基因組圖譜)

Cytogenetic map: 由染色體染色而來，沒有單位，以區域劃分
Genetic map: 由互換率計算而來，單位cM (centimorgan)
Physical map：由序列定序而來, 單位bp

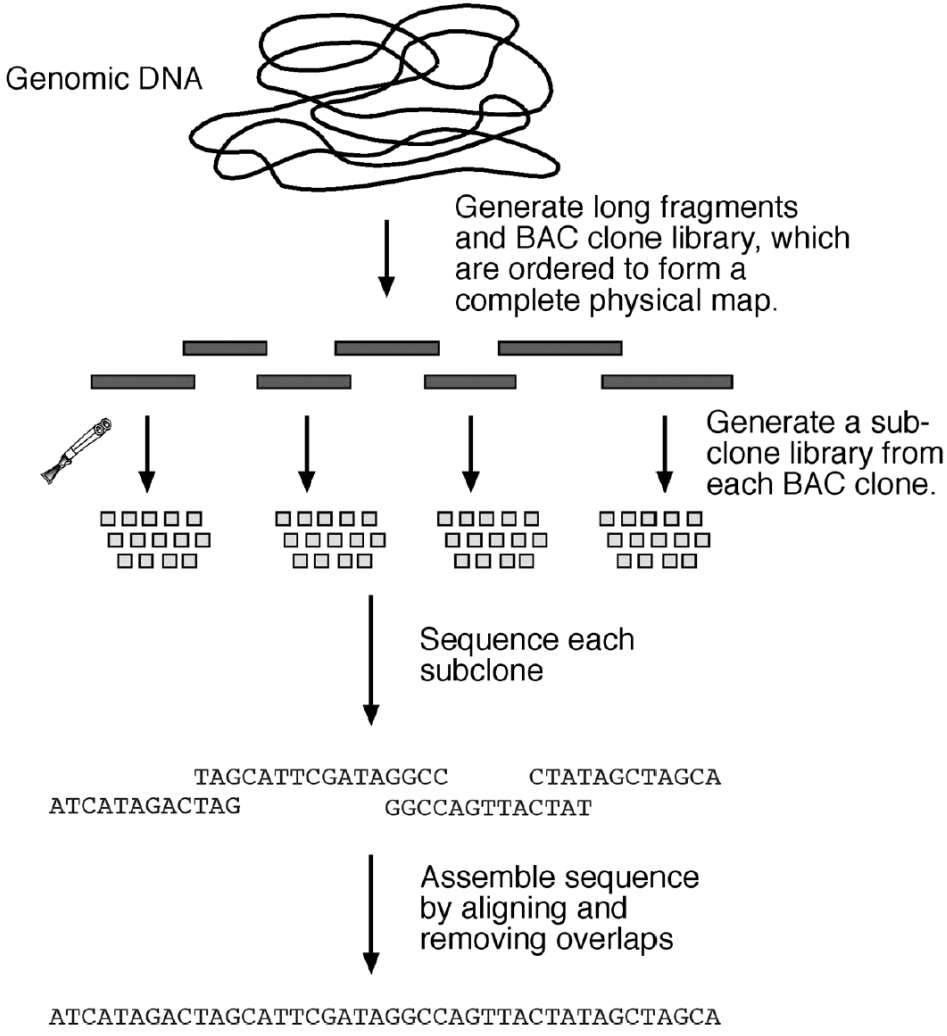


# 全基因組定序策略

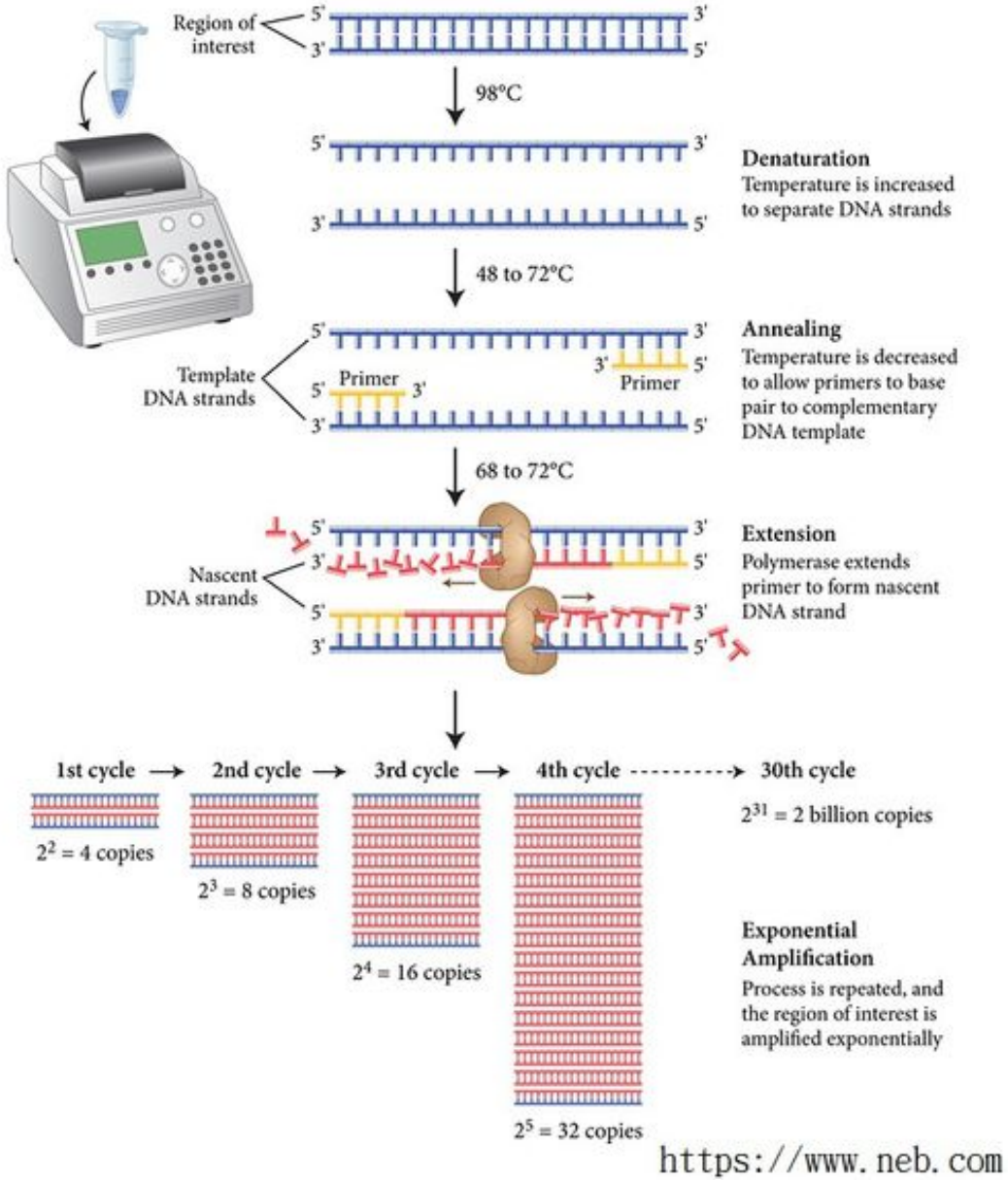
**Shotgun sequencing approach**
**(霰彈槍定序法)**

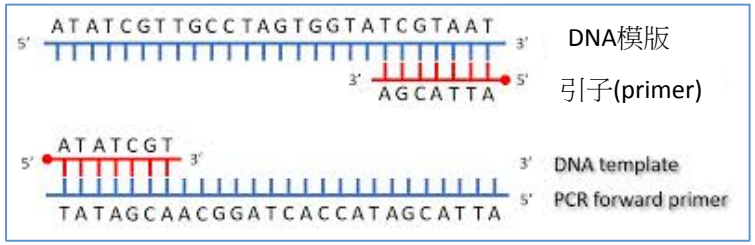



**Hierarchical sequencing approach**
**(階層式定序法)**



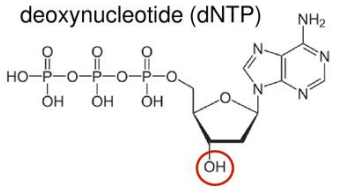
# PCR (聚合酶連鎖反應)

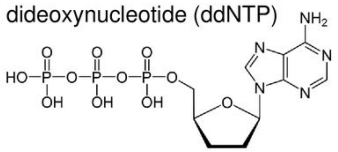

Region of interest
5'
3'
98°C
Denaturation
Temperature is increased to separate DNA strands
48 to 72°C
Annealing
Temperature is decreased to allow primers to base pair to complementary DNA template
Template DNA strands
Primer
68 to 72°C
Extension
Polymerase extends primer to form nascent DNA strand
Nascent DNA strands
1st cycle
2nd cycle
3rd cycle
4th cycle
30th cycle
$2^2$ = 4 copies
$2^3$ = 8 copies
$2^4$ = 16 copies
$2^5$ = 32 copies
$2^{31}$ = 2 billion copies
Exponential Amplification
Process is repeated, and the region of interest is amplified exponentially
https://www.neb.com

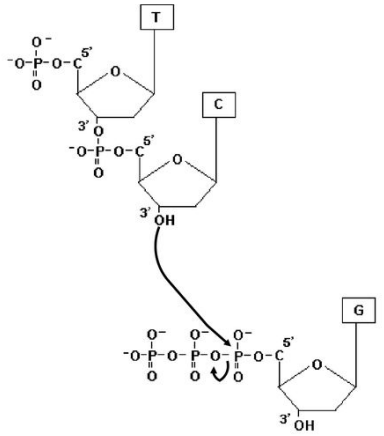

ATATCGTTGCCTAGTGGTATCGTAAT
AGCATTA
DNA模版
引子(primer)
ATATCGT
TATAGCAACGGATCACCATAGCATTA
DNA template
PCR forward primer

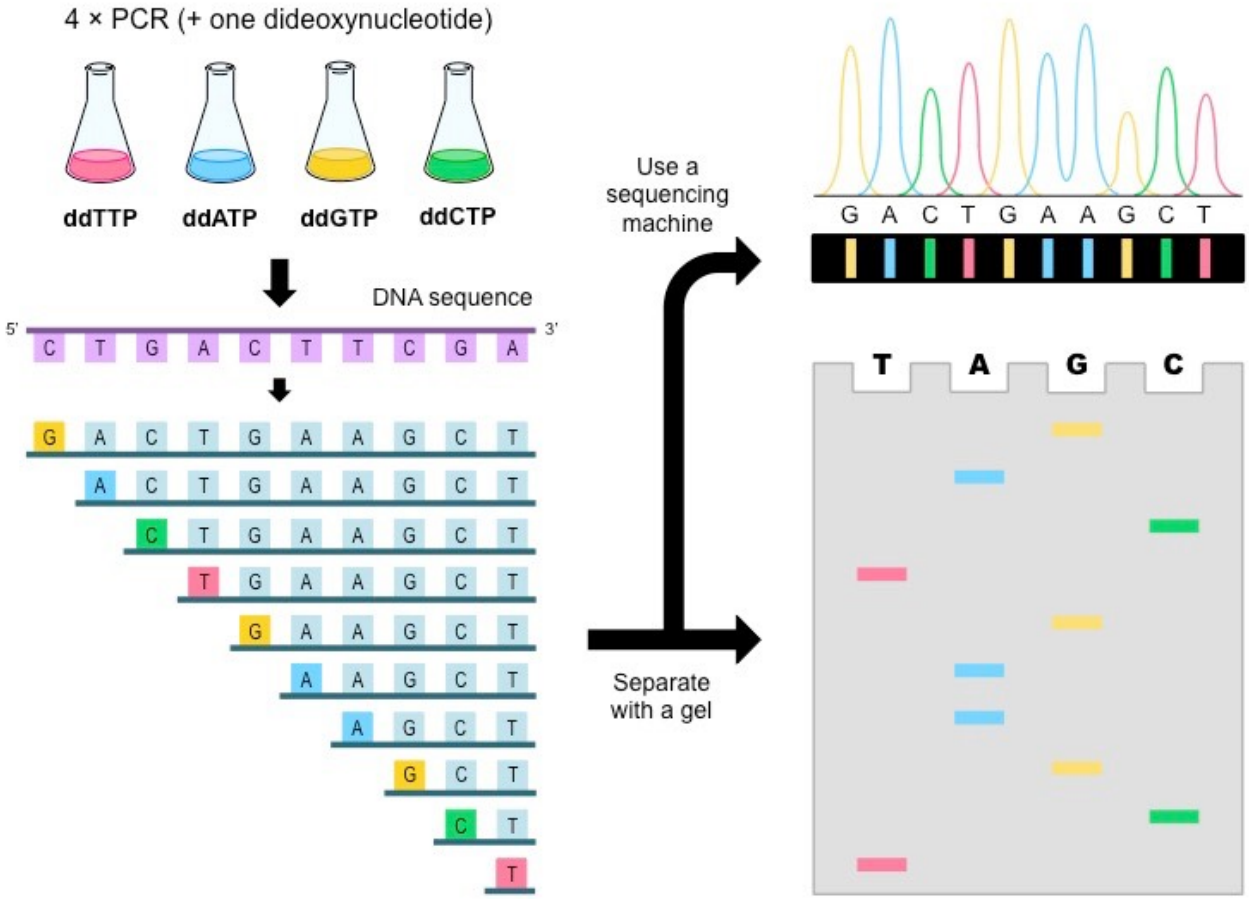
# Sanger sequencing

- 藉由螢光標定ddNTP(雙脫氧核苷酸,五碳糖缺乏3端OH基)使PCR反應停止
- 定序長度 500-1200 bp



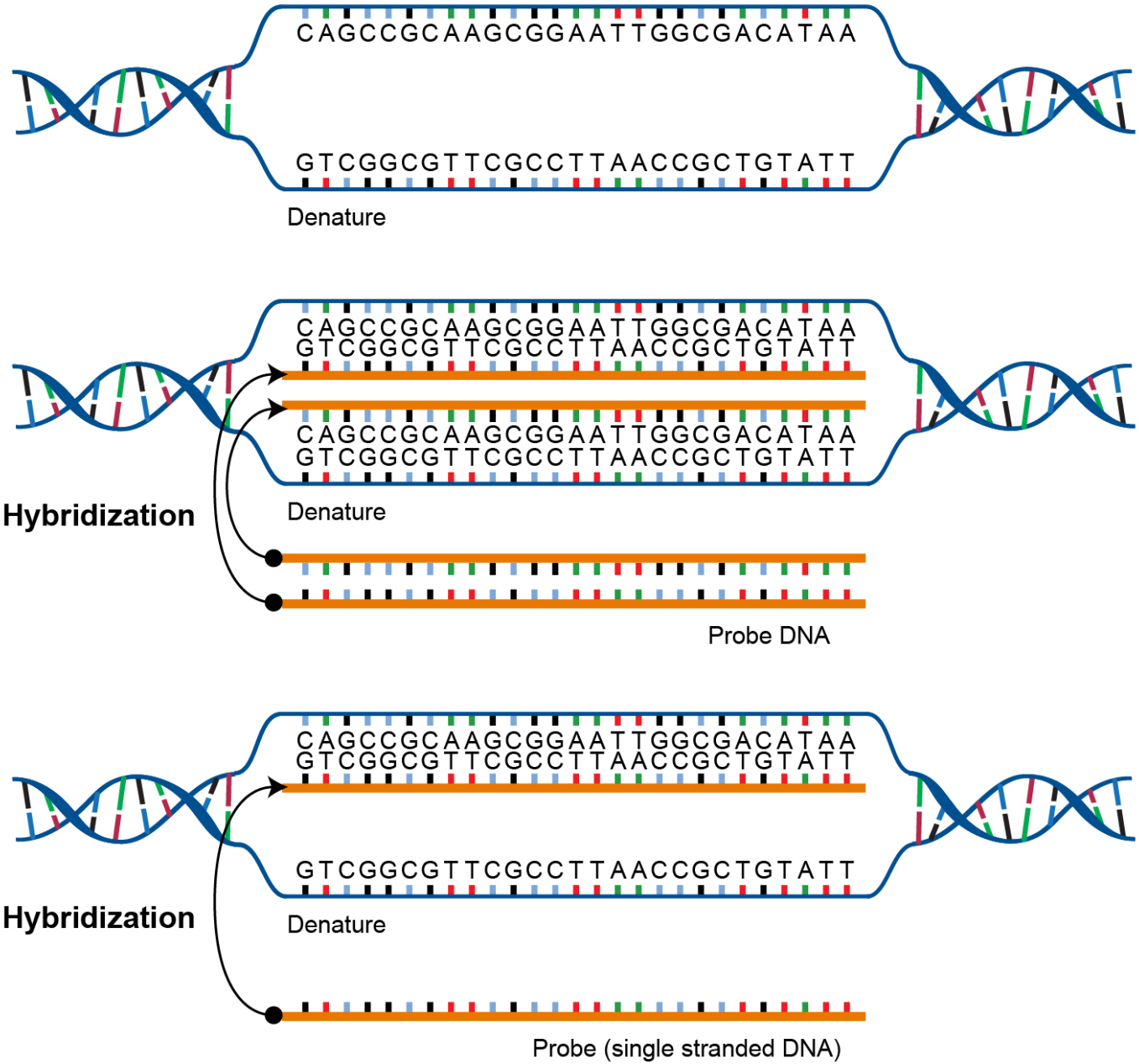




PCR

跑膠，螢光分析

# 核酸雜合反應 (Nucleic acid hybridization)

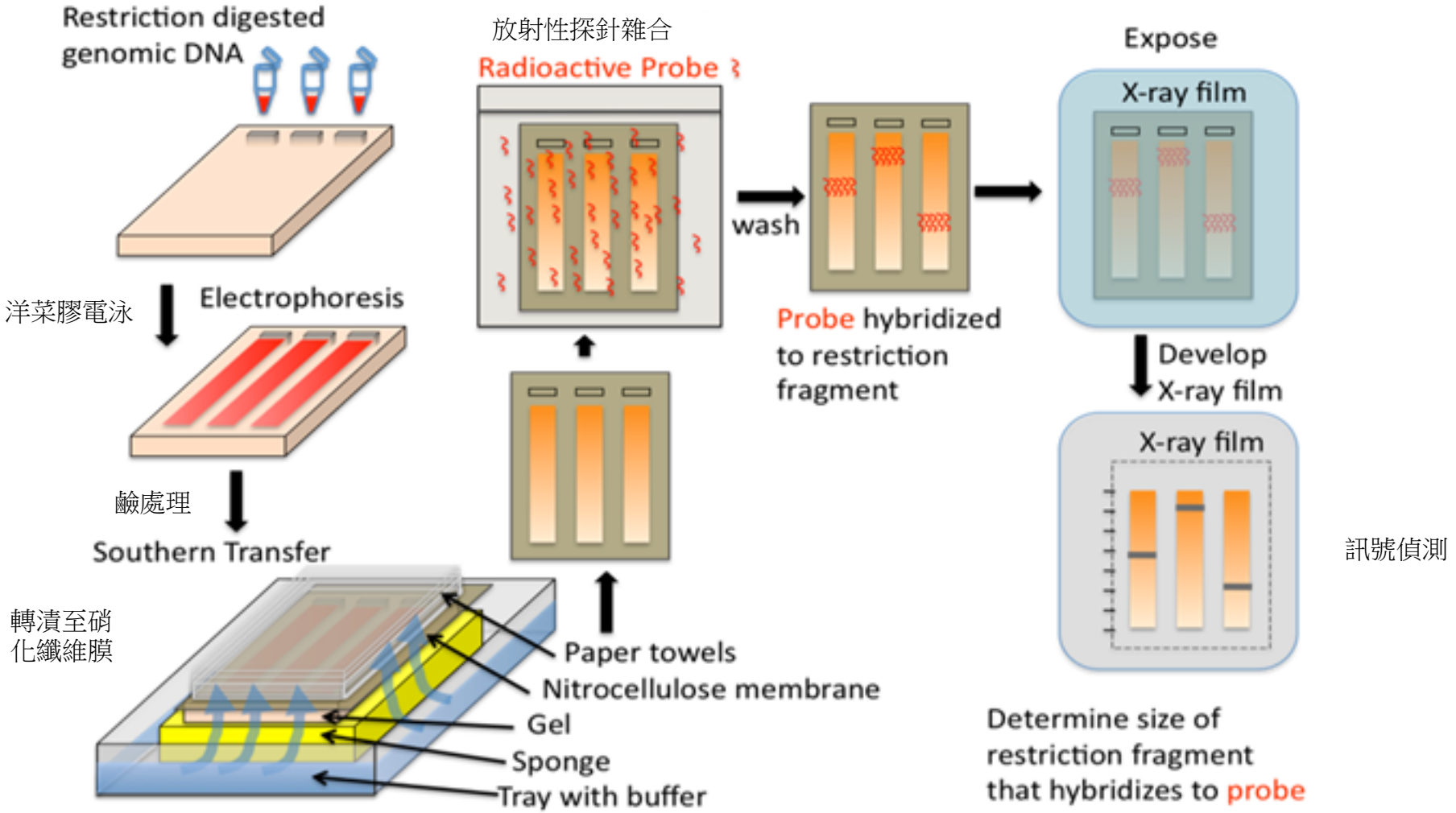



熱處理、鹼破壞或其它化學溶液使雙股DNA變成單股(變性，denature)

DNA探針來源若為雙股需先變成單股才能進行雜合 ，探針上可標定放射線或其它螢光物質

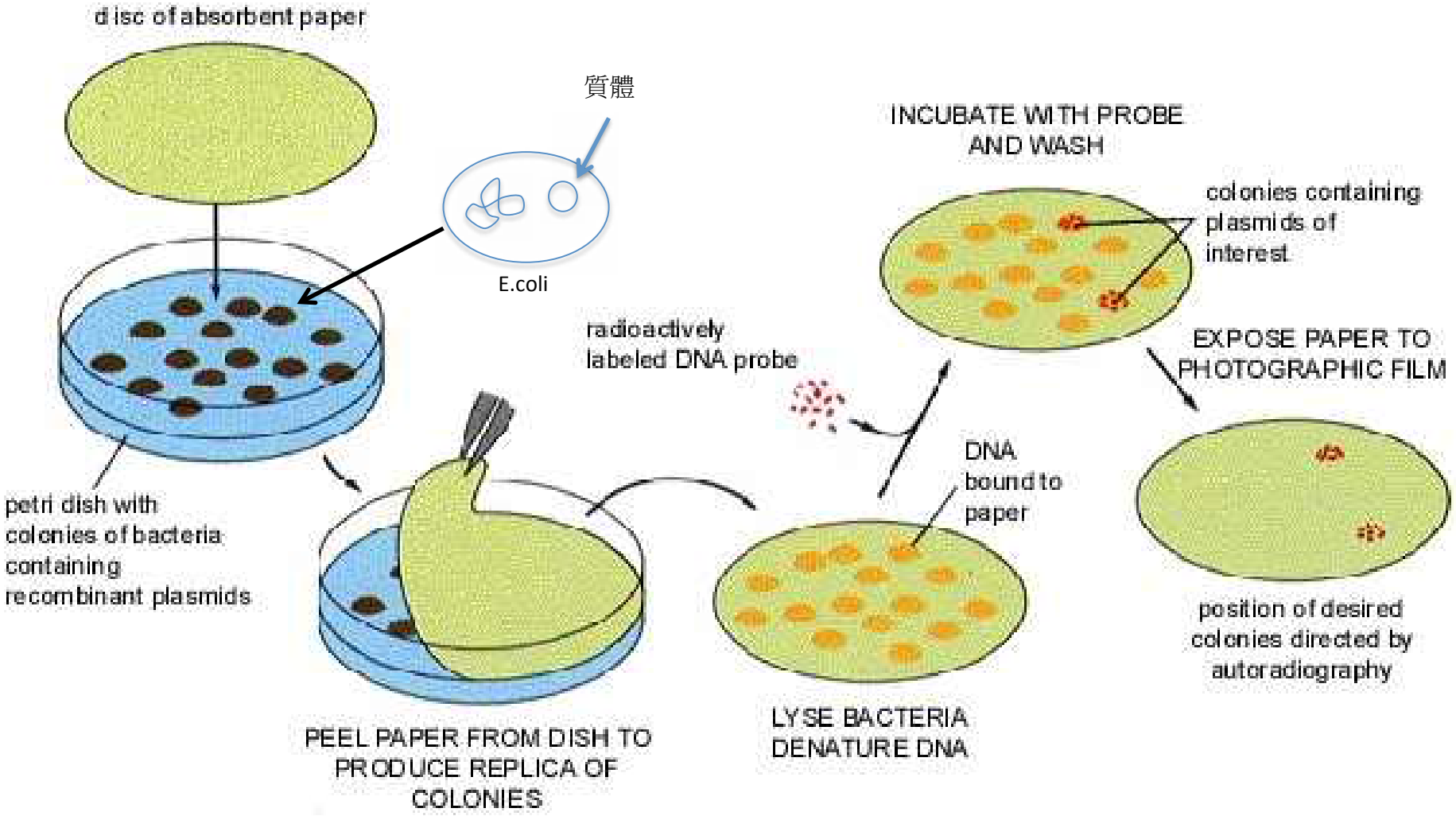
# 南方墨點法 (Southern blotting )

- 主要原理為單股DNA可和放射性探針(probe,單股DNA)結合
- 酵素作用後DNA -> 洋菜膠電泳 -> 鹼處理使DNA成單股 -> 轉漬至硝化纖維膜 ->放射性探針雜合 -> 訊號偵測



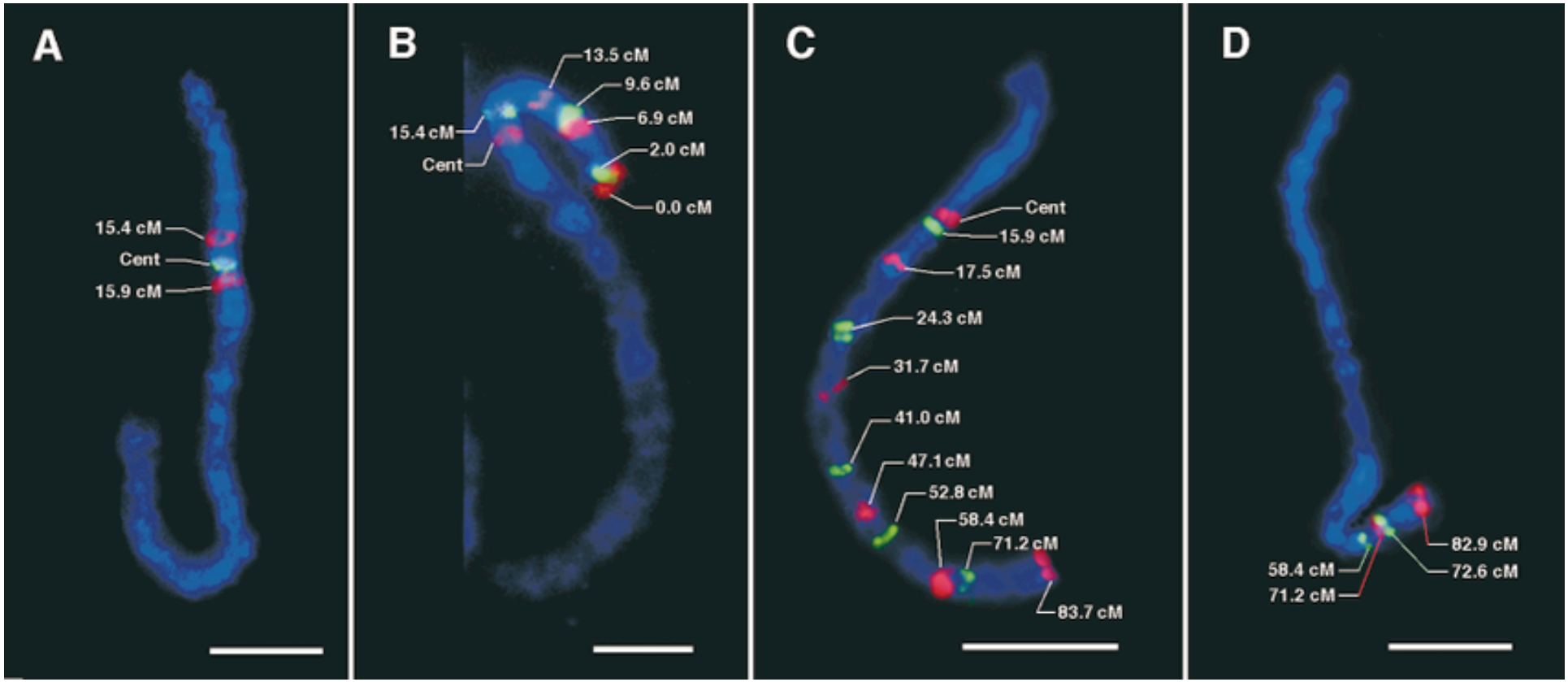
# Colony hybridization(菌落雜交)

- 主要原理為單股DNA可和放射性探針(probe,單股DNA)結合
- 目的為尋找含有特定序列的菌落
- 培養菌落 → 拓印至硝化纖維膜 → 鹼破壞打破細胞並使DNA變性 →放射性探針雜合 -> 訊號偵測



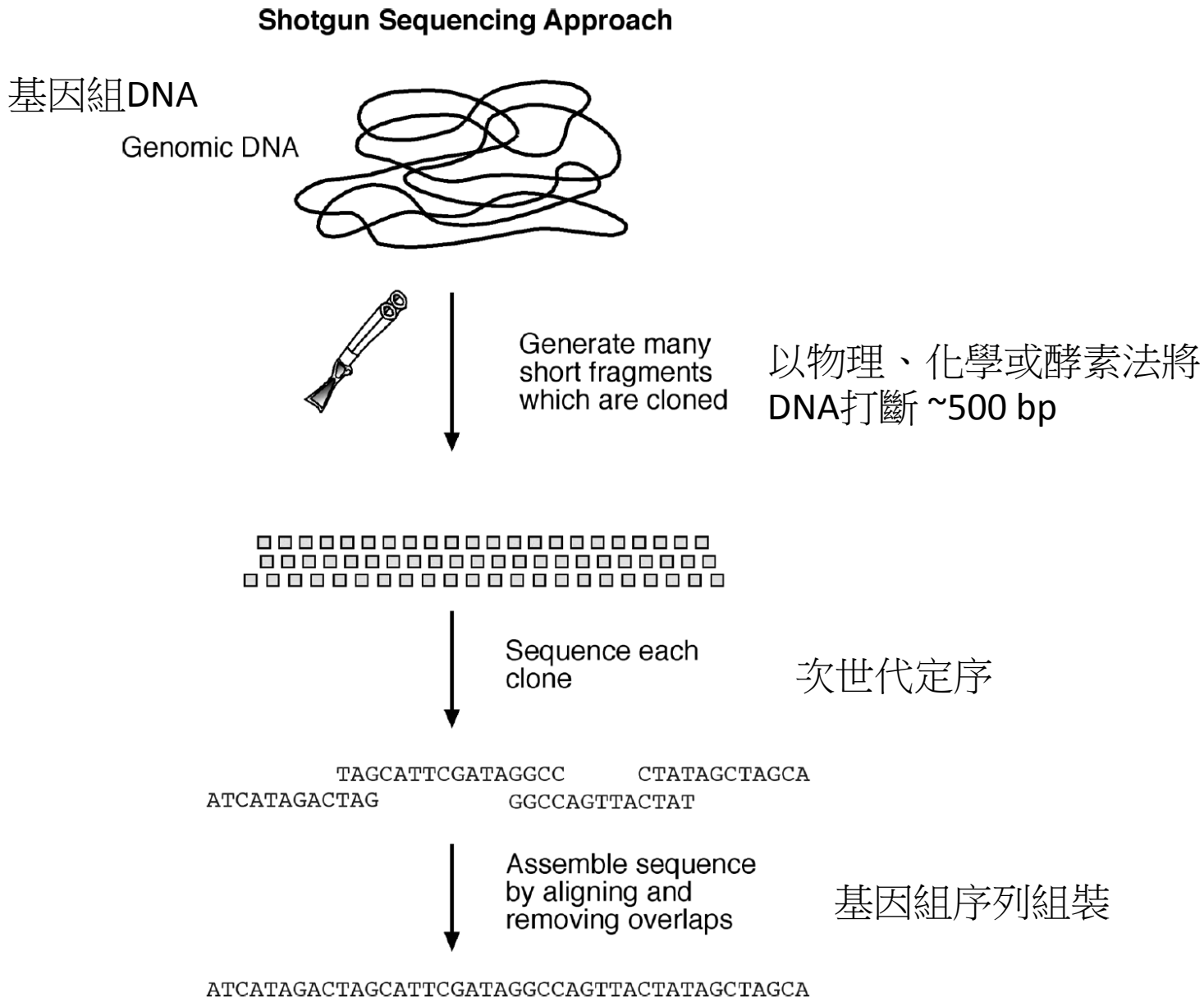
# 螢光原位雜合**FISH** (Fluorescence in situ hybridization)

- 主要原理為單股DNA可和螢光標定探針(probe,單股DNA)結合
- 目的為確認目標序列在染色體上的位置
- 細胞固定於玻片 → 以formamide將染色體變性 →螢光標定探針雜合 →螢光顯微鏡觀察




BMC Genomics2011**12**:639

# 霰彈槍定序法 (Shotgun sequencing approach)



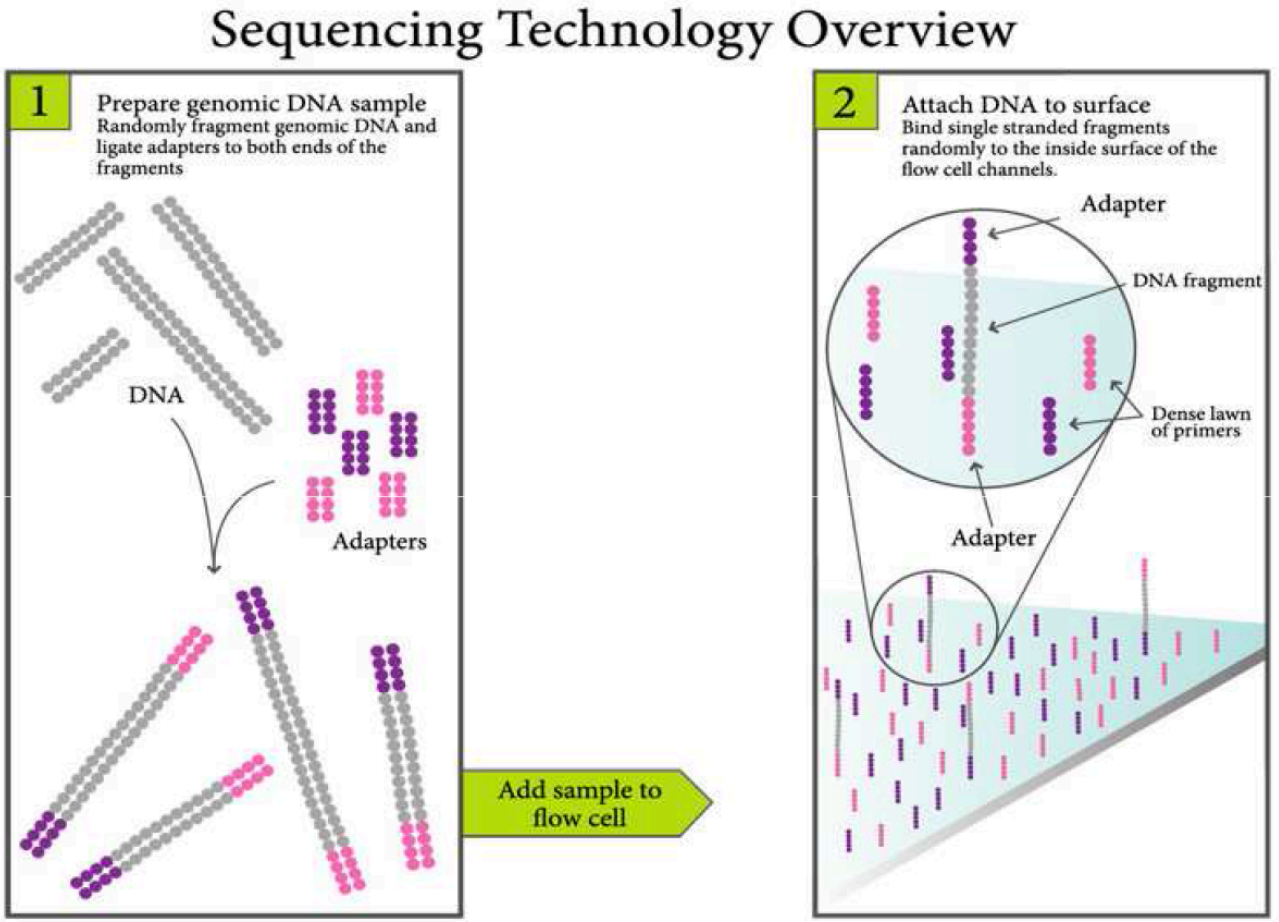
# DNA定序 (DNA sequencing)

- 傳統定序法 Sanger sequencing
  ー定次定序長度 ~ 500bp - 1 kb
  ー每次上機 96 samples
  ー 1977年發明

- Next generation sequencing (次世代定序, NGS)
  - 又稱**大規模並行測序** (Massive parallel sequencing)
  - ~ 100 - 500 bp /read (依定序技術不同)
  - 每次上機可獲得 > 100 Gb資料量
  - 不同公司技術不同，目前以illumina開發的SBS技術為主流 (2006年發明)
  - 可用於基因體、轉錄體、基因甲基化及環境微生物定序

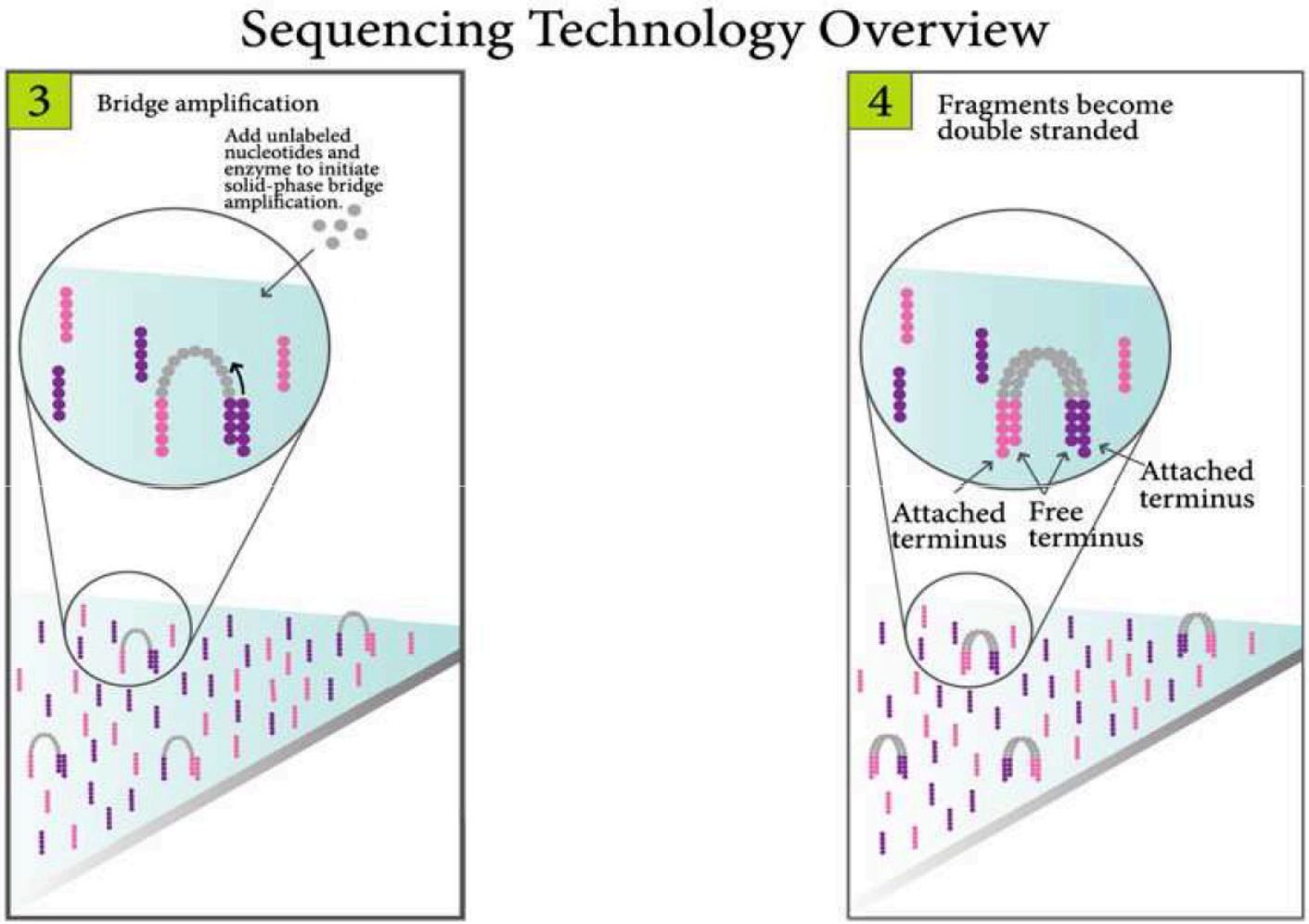
# SBS (sequencing by synthesis)

- 將Genomic DNA打斷為約 ~500 bp, 並接上adapter
- 將DNA變性並固定在含有引子的定序盤
- 引子的序列為根據adapter設計

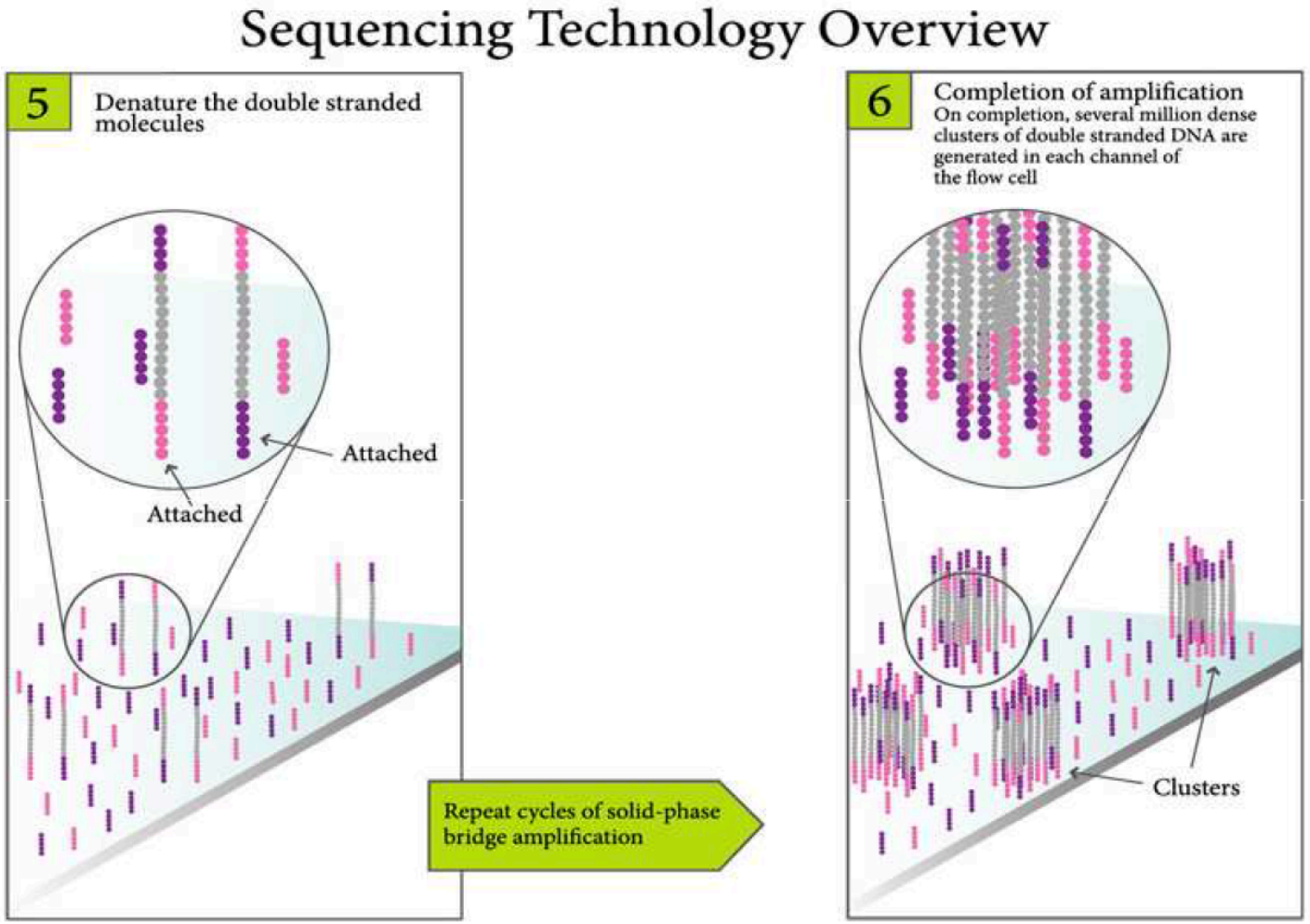


# SBS

- 利用引子進行PCR，將單股的標的序列複制為雙股

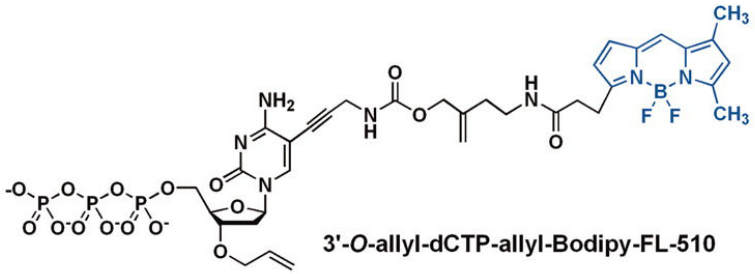


- 將複制的雙股變性成單股，並重覆PCR步驟，序列數目將以2次方成長
- 複制的目的為擴大定序訊號

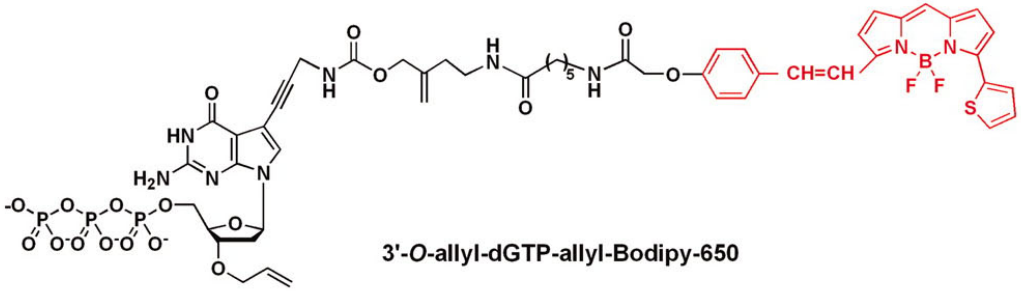


# SBS －反應用特殊核苷酸

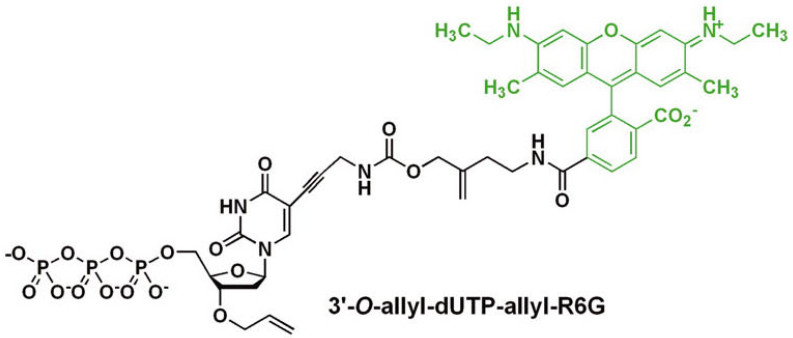
- SBS所使用的核苷酸為特殊鹼基，上頭帶有發色基，可在激光後發出不同顏色
- 核苷酸五碳糖3端上帶有烯丙基(allyl group), 可使PCR反應無法進行
- 發色基及五碳糖3端的烯丙基可以鈀(pd)反應將其移除，使PCR反應繼續



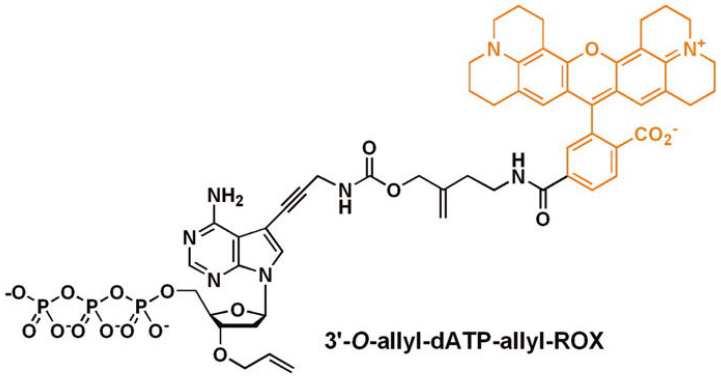
3'-*O*-allyl-dCTP-allyl-Bodipy-FL-510



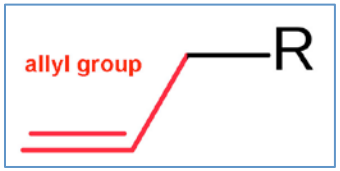
3'-*O*-allyl-dGTP-allyl-Bodipy-650



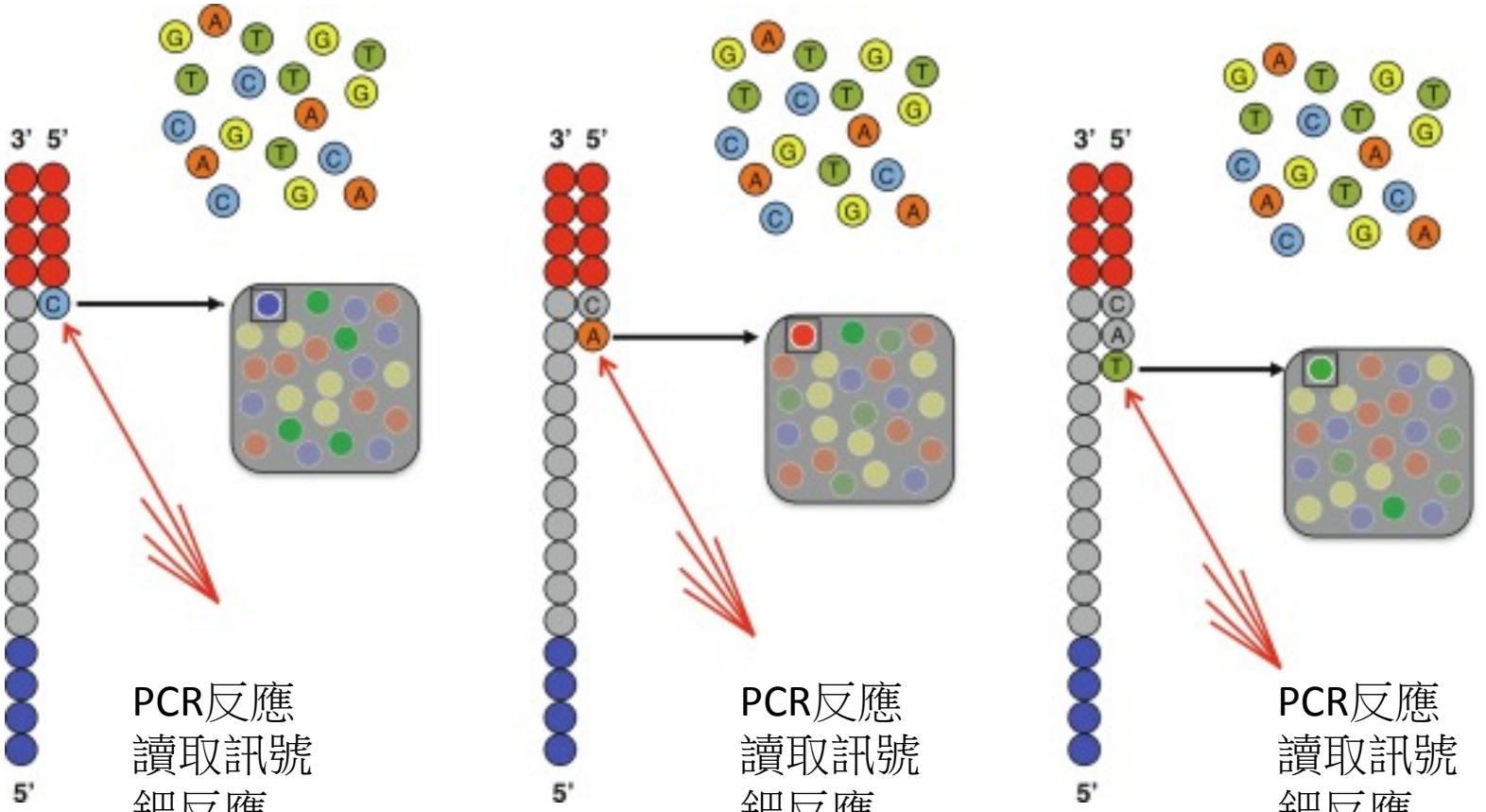
3'-*O*-allyl-dUTP-allyl-R6G



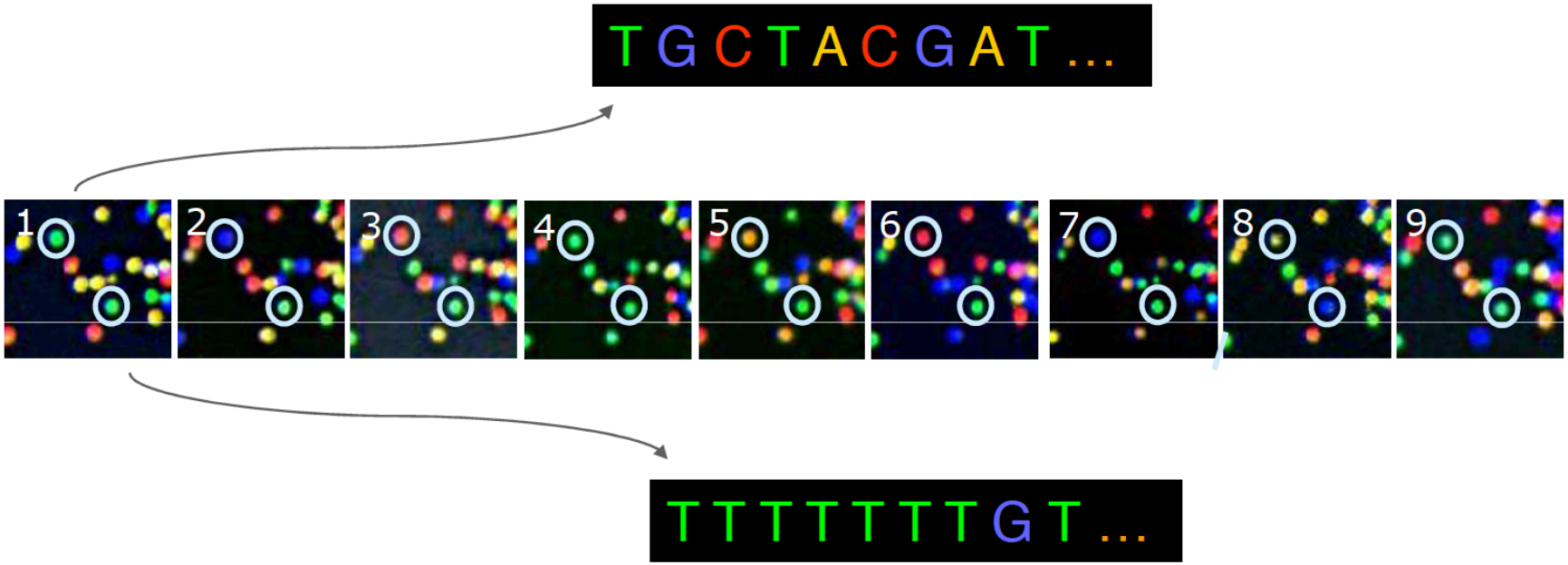
3'-*O*-allyl-dATP-allyl-ROX



# SBS – PCR 反應及訊號讀取



# SBS－訊號解讀 (base calling)



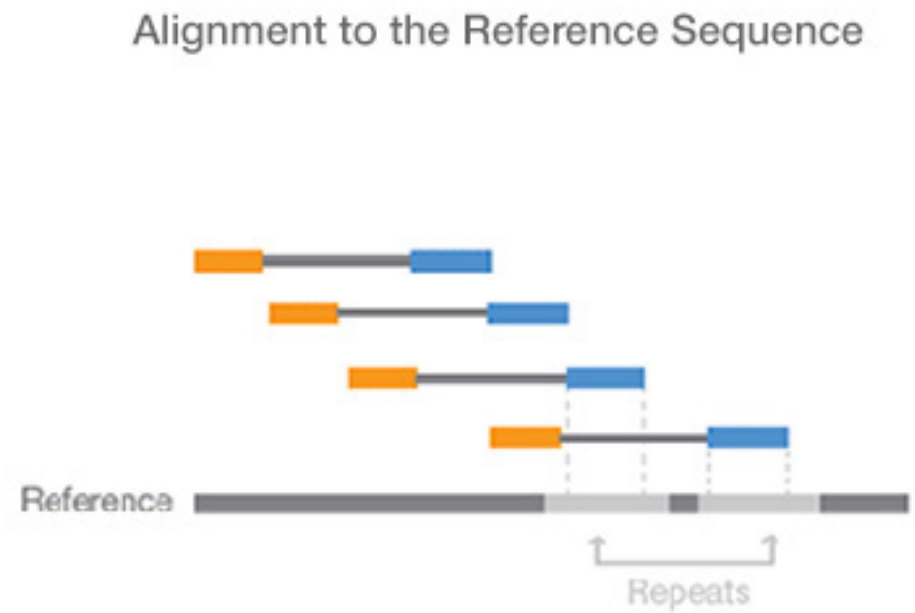

The identity of each base of a cluster is read off from sequential images.



illumina®

# Genome assembly (基因組序列組裝)

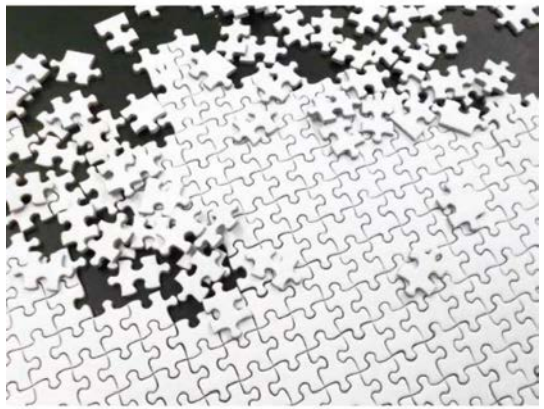
- 定序時目標序列為 ~500 bp，每次由其兩端讀取 150 bp，這些定序小片段稱之為read
- 序列的中間部份為未被定序區域
- 同一目標序列上會有二條read，可幫助序列組裝正確性
- 組裝原理為具有重覆序列的片段即可能位在基因體同一位置

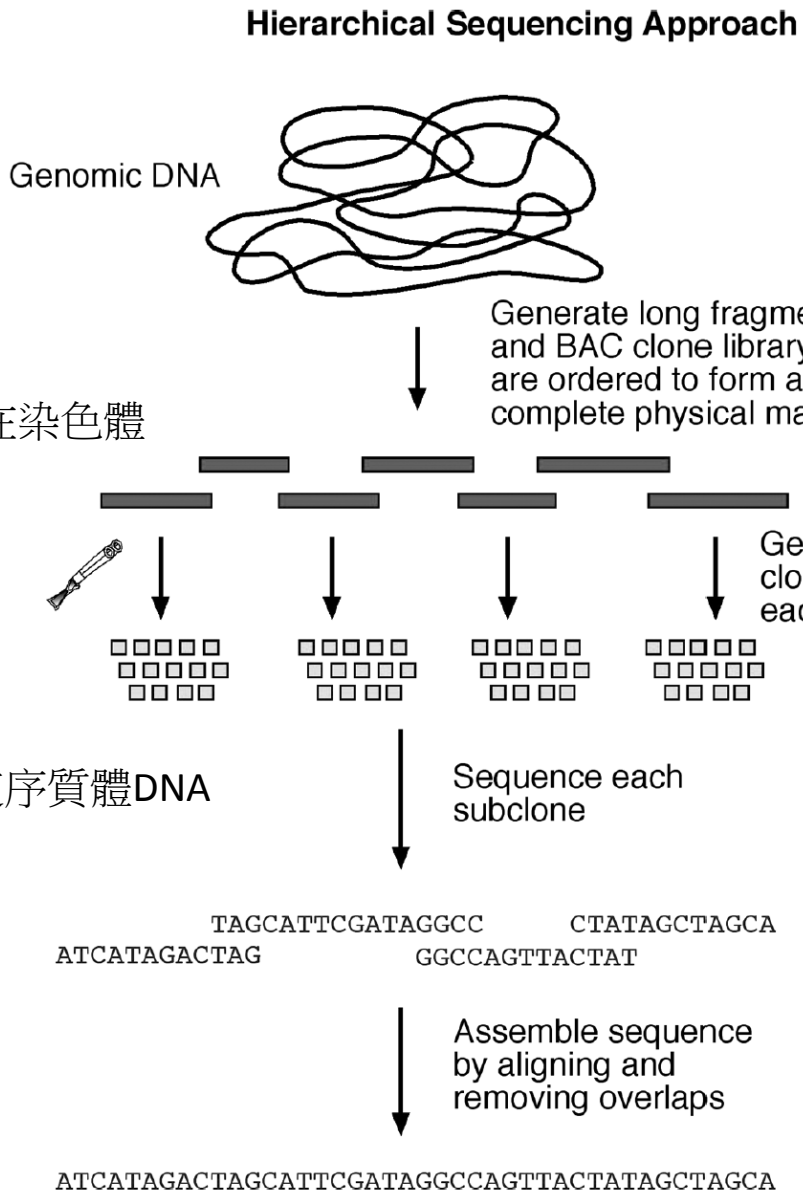
# 定序組裝(assembly)的難題

- 人類基因組為3G(30億個鹼基)，假設定序時每次只能讀 150 bp，那麼至少要有2百萬條reads，若考慮重疊性，那至少要六百萬條reads才能完整涵蓋基因組。

- 每條序列都如同一塊小拼圖，如何把六百萬條序列完整地對到染色體？尤其是染色體不同位置但序列卻即為相似或序列多次重覆之位置。
  -- > 將染色體分為大片段，並得知每大片段是由染色體那一區域而來

# Hierarchical sequencing approach (階層式定序法)




以物理、化學或酵素法將DNA打斷 ~ 150-300 Kb, 並接在BAC

將BAC以FISH定位在染色體

將BAC (150 kb) 片段亞克隆至質體 (plasmid, 2 kb)

以sanger定序質體DNA

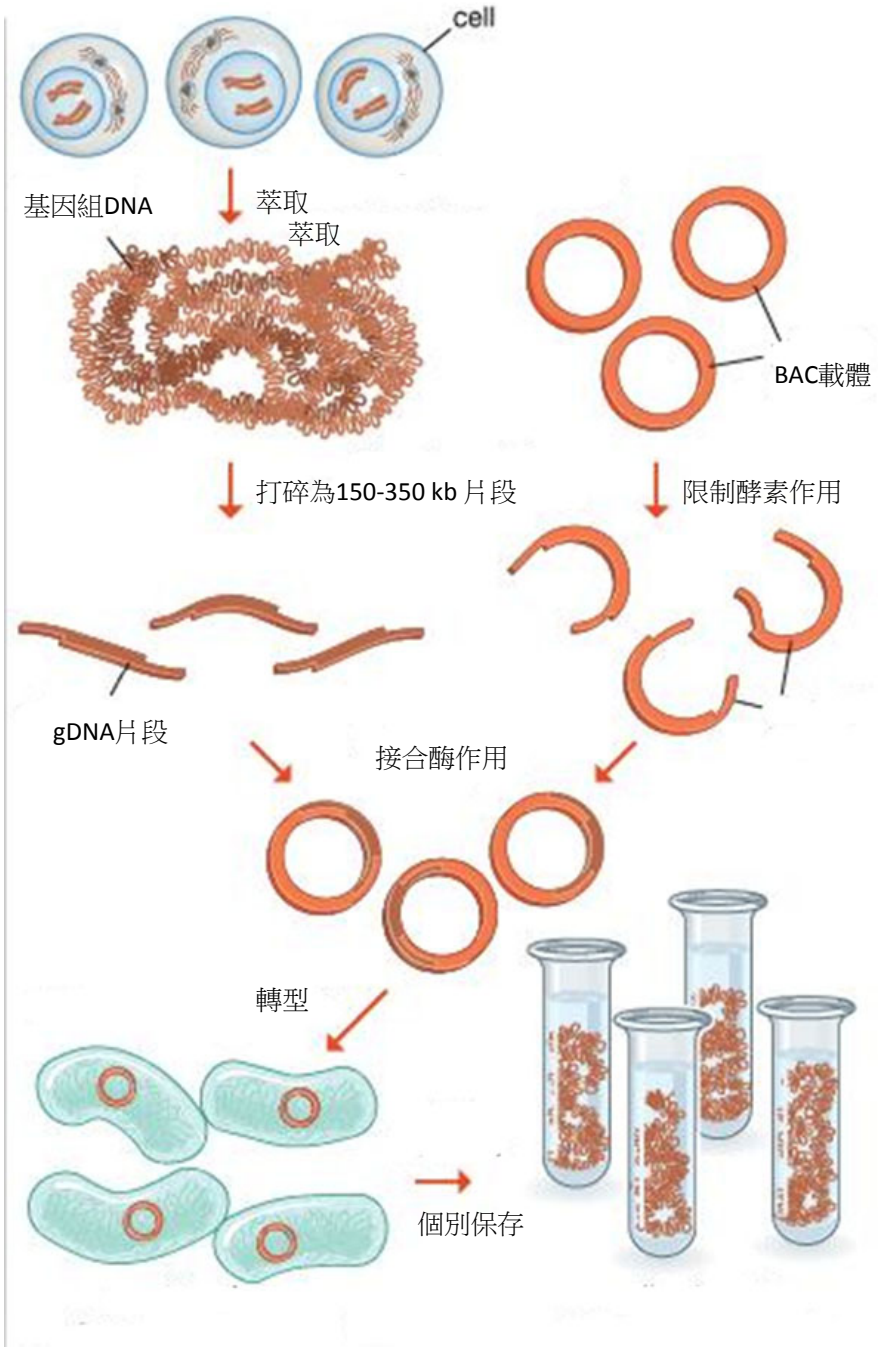
序列組裝

# DNA 載體

| 載體 | 承載量 | 宿主細胞 |
|---|---|---|
| 人類人造染體 (HAC) | 6000 - 10000 Kb | human cell |
| 酵母人造染色體 (YAC) | 100 - 3000 kb | Yeast |
| 細菌人造染色體(BAC) | 150 ~ 350 kb | E. Coli |
| 噬菌體載體 (PAC) | 100- 300 kb | E. Coli |
| 黏質體 (Cosmid, 噬菌體載體/質體之複合體) | 35-45 kb | E. Coli |
| 質體 (plasmid) | <= 15kb | E. Coli |

如果以一倍的覆蓋率計算，人類基因組 (3,200,000 kb) 需要
320 HAC
1,066 YAC
9,142 BAC
10,666 PAC
71,111 Cosmid
213,333 plasmid

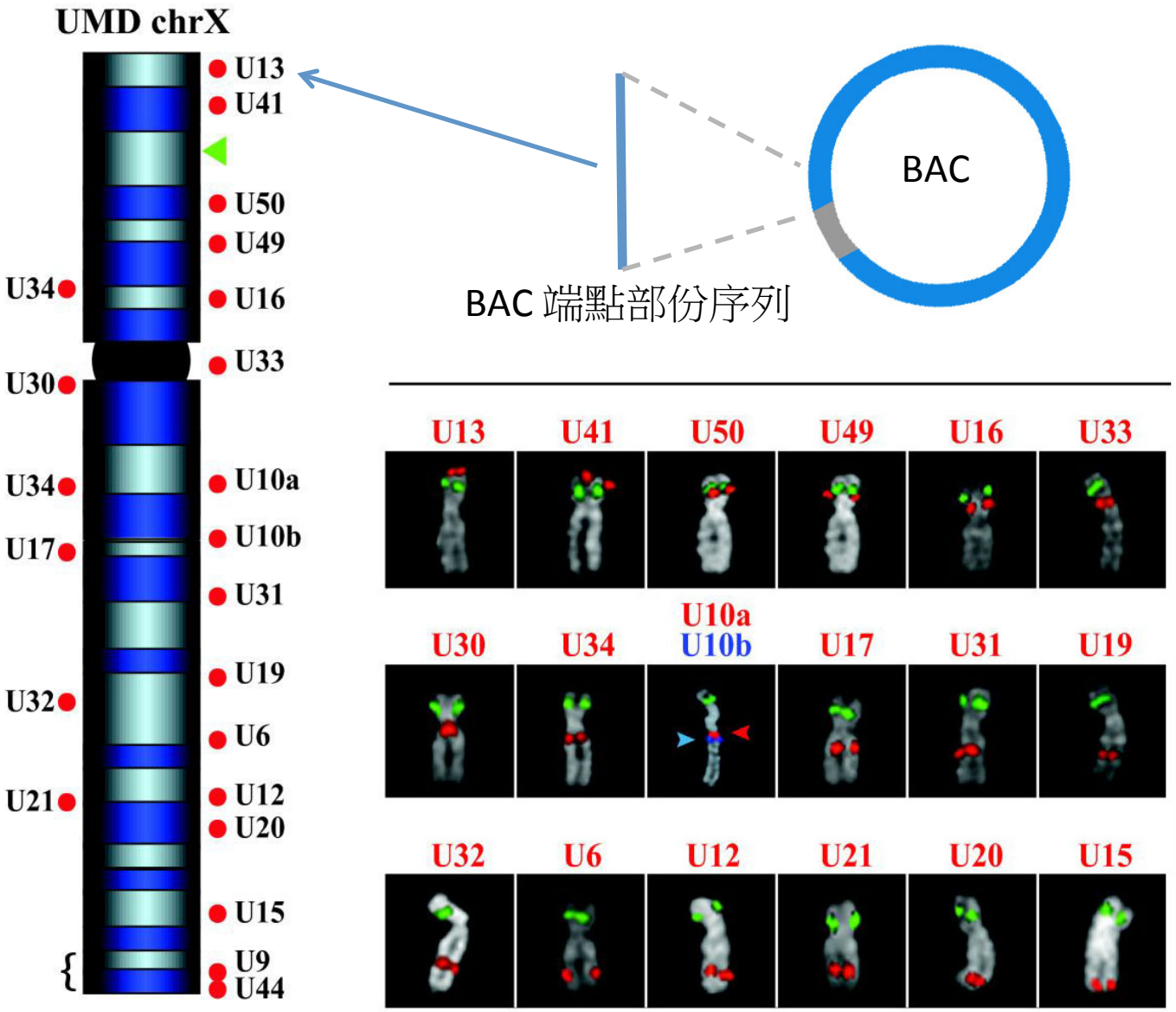
* 通常一個基因組庫的要求為6倍覆蓋率以上




# 基因組庫建構 (Genomic Library Construction)

如果一個BAC可承載150kb,對於人類基因組3.2 Gb而言，9,142個BAC為一倍的覆蓋率，而若要達到90%以上的覆蓋率，至少要6倍的BAC數目(54,852個)

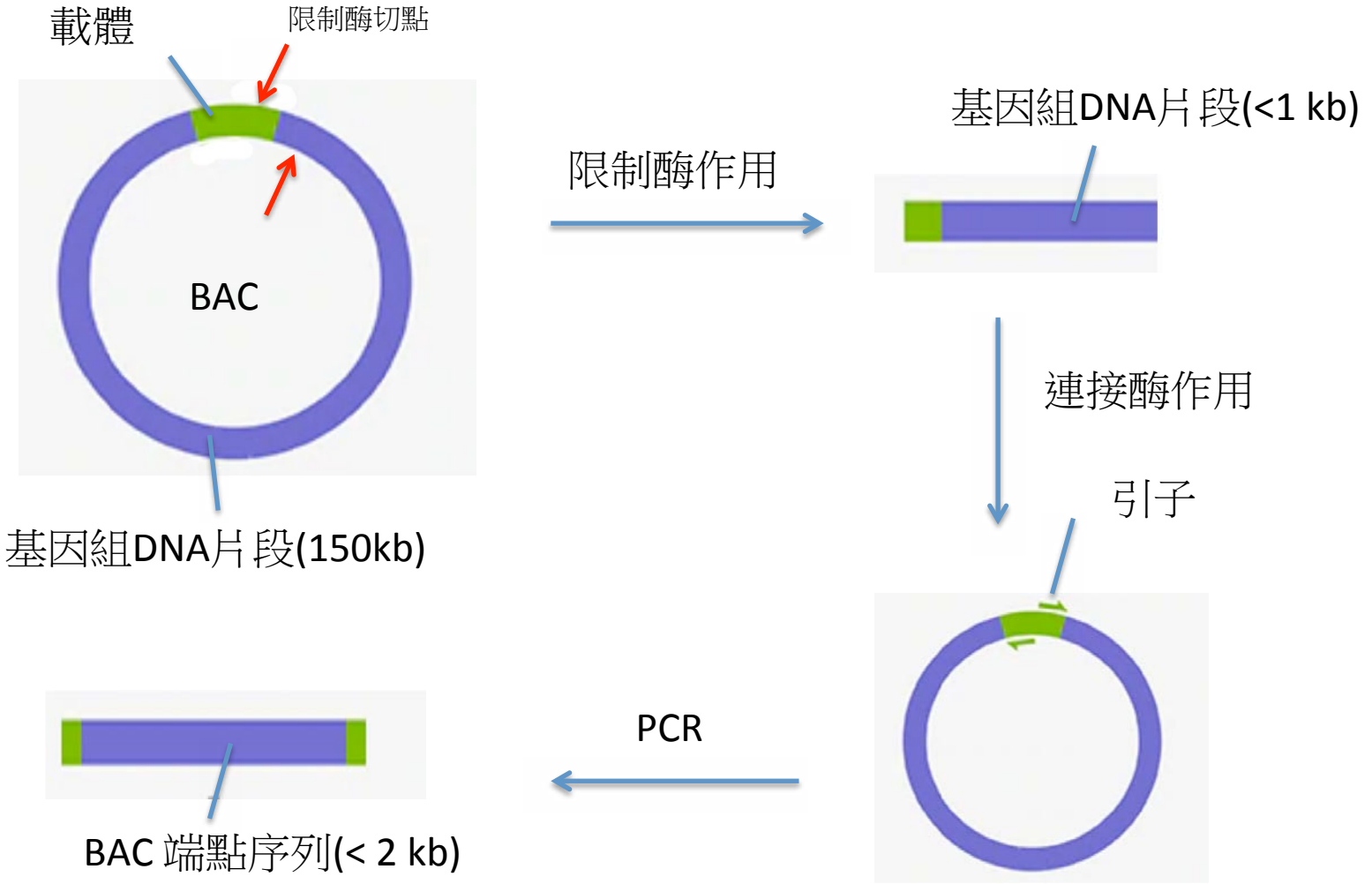
# 以螢光原位雜合法(FISH)將BAC定位在染色體上定位



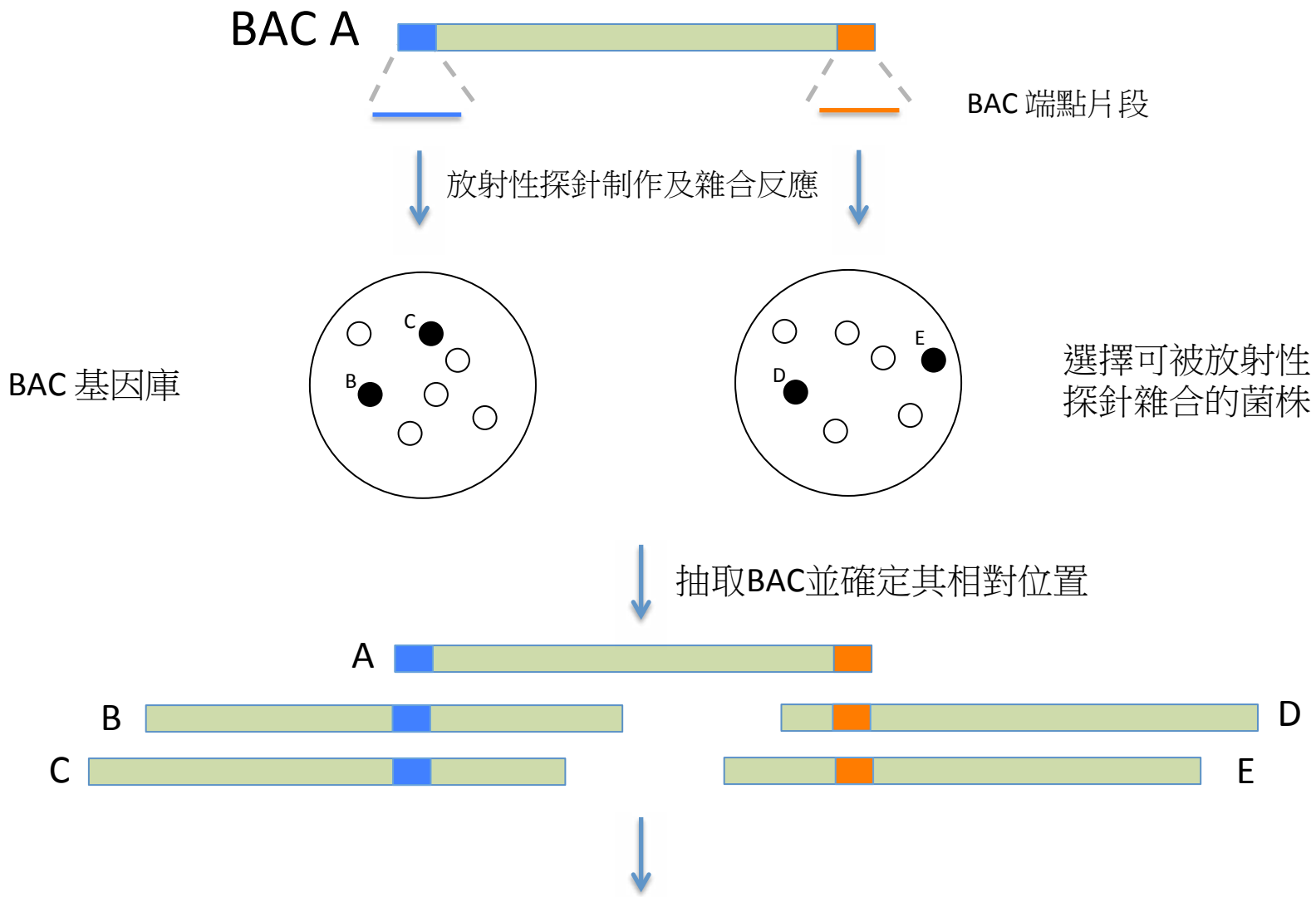

BMC Genomics 2011, **12**:639

# Inverse PCR (反向PCR)

- 最好聚合酶最長可做到30kb，但很貴，成功率也很低。大部份聚合酶僅能做到 ~ 2 kb
- 基因組DNA片段為未知，無法設計引子。引子只能設計在載體序列
- 目的為擴增BAC端序列，以進行FISH或BAC library screening



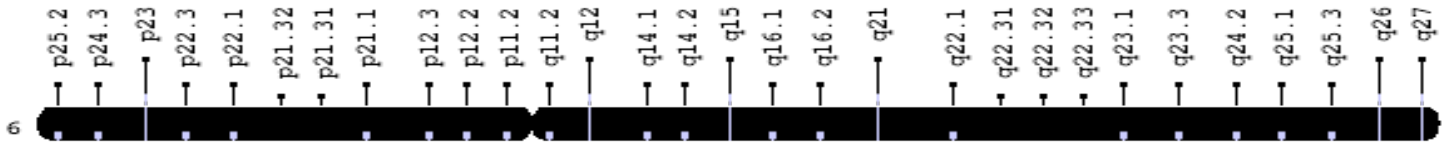
# BAC基因庫篩選



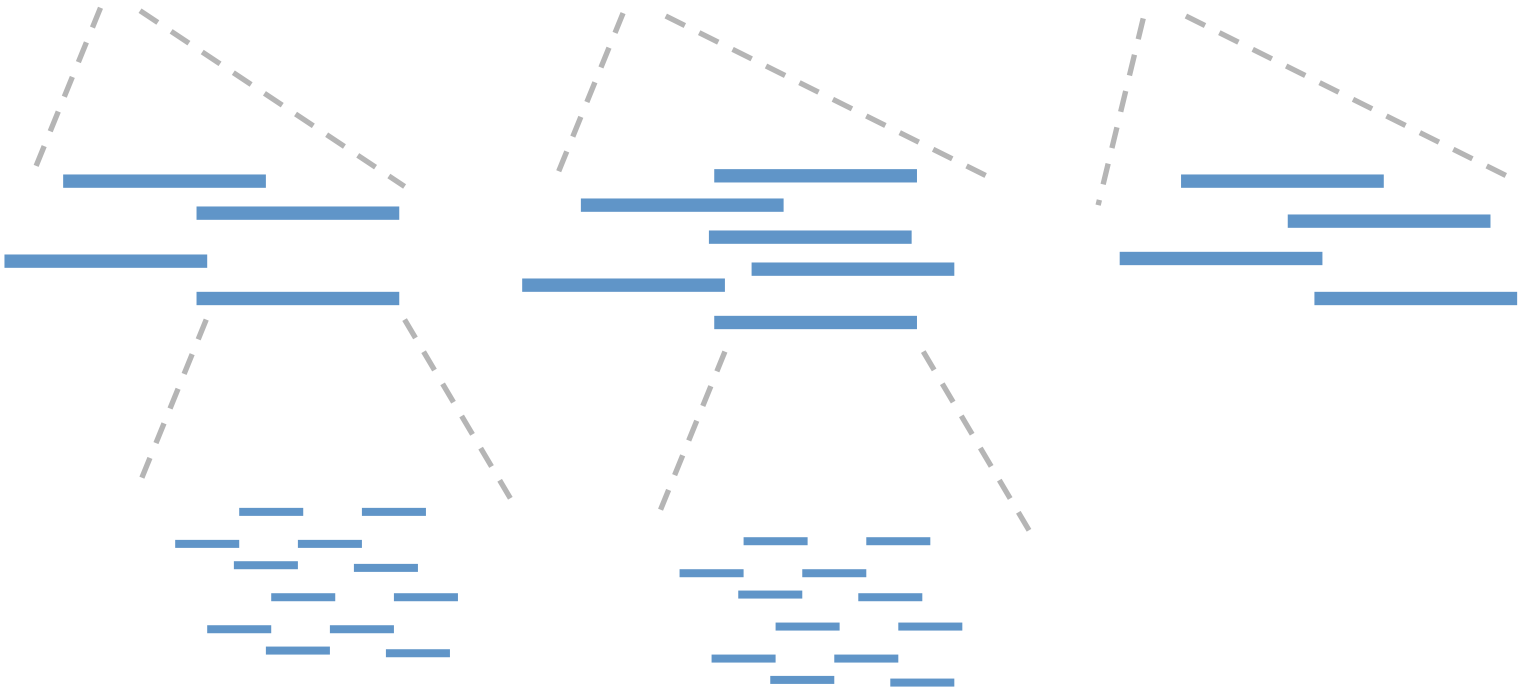

以BAC B, C, D, E端點片段重覆以上實驗以找到上下游BAC

# 階層式定序

基因組
DNA




BAC
基因庫



質體
基因庫

# 霰彈式定序及階層式定序比較

| | 霰彈式定序 | 階層式定序 |
|---|---|---|
| 時間 | 短 | 長 |
| 經費 | 少 | 多 |
| 人力 | 少 | 多 |
| 空缺區域(gap) | 大 | 小 |

- 當第一個物種以階層式定序出來後，可作為其它物種基因組參考圖譜，因此其它物種即使使用霰彈式定序法，也可以得到較精確的基因組圖譜。
- 目前已有公司號稱只要1,000美元即可完成個人定序

人類基因體計劃共識－所有基因為人類共享，不可註冊

# 定序後的挑戰－基因註解

Q:人類基因組約3.2G，含有約20,000-25,000個基因，如果以每個基因平均長度10 kb 計算，那麼這些基因約佔基因組8% (250,000 kb)。那麼我們要如何知道基因的位置？

1. 軟體預測：由基因的特質預測，如果有參考基因庫會較準確
   a. ORF finder: 尋找開放讀序框架
      對原核生物較有用，因為沒有內含子(intron)
      缺點：對真核較無用
   b. 比對已知基因，並對現有基因進行預測
      Softberry – FGENESH+
      缺點：對變異較大的基因較難進行預測

2. 轉錄體定序(RNA-seq)：定序RNA的序列，並將其對回至基因組相對位置，該方法較準確，但部份表現量較低的基因不一定會被定序

Q：假設你有一條來自大腸桿菌序列如下，請問你要如何以尋找ORF的方式預測該片段是否含有基因片段？

aaacggctcatcgtcttaaaggcgtatttgccatgctaaatctggtacccggcaagcagtta
tgtgaaacgctggaacatctgattcgtgagaaggatgttccaggaatagaaaaatacatc
agcgacattgacagttatgtcaagagcttgctgtagcaaggtagcctattacatgaacaat
atgaacgtaattattgccgatgaccatccgatagtcttgttcggtattcgcaaatcacttgag
caaattgagtgggtgaatgttgtcggcgaatttgaagactctacagcactgatcaacaacc
tgccgaaactggatgcgcatgtgttgattaccgatctctccatgcctggcgataagtacggc
gatggcattaccttaatcaagtacatcaagcgccatttcccaagcctgtcgatcattgttctg
actatgaacaacaacccggcgattcttagtgcggtattggatctggatatcgaagggatcgt
gctgaaacaaggtgcaccgaccgatctgccgaaagctctcgccgcgctgcagaaaggga
agaaatttaccccggaaagcgtttctcgcctgttggaaaaaatcagtgctggtggttacggt
gacaagcgtctctcgccaaaagagagtgaagttctgcgcctgtttgcggaaggcttcctggt
gaccgagatcgctaaaaagctgaaccgcagtattaaaaccatcagtagccagaagaaat
ctgcgatgatgaagctgggtgtcgagaacgatatcgccctgctgaattatctctcttcagtg
accttaagtccggcagataaagactaatcacctgtaggccagat

Open reading frame(ORF): 開放讀序框架

- 基因組中能被轉譯成氨基酸序列的DNA片段
- 一條DNA序列共含有六種可能性的讀取框架(reading frame)
- 框架讀取： 每3個鹼基為一組
- 若讀取框架中，含有起始(ATG, Methionine)及終止碼(TAA, TAG, TGA),且該讀取框架夠長，則其可能為一個基因

－若讀取框架片段沒有包含起始或終止碼，則該片段則有可能是某基因片段


Frame 1 -> K P C – I W – A S S C E

Frame 2 -> N H A K S G R Q A V V K

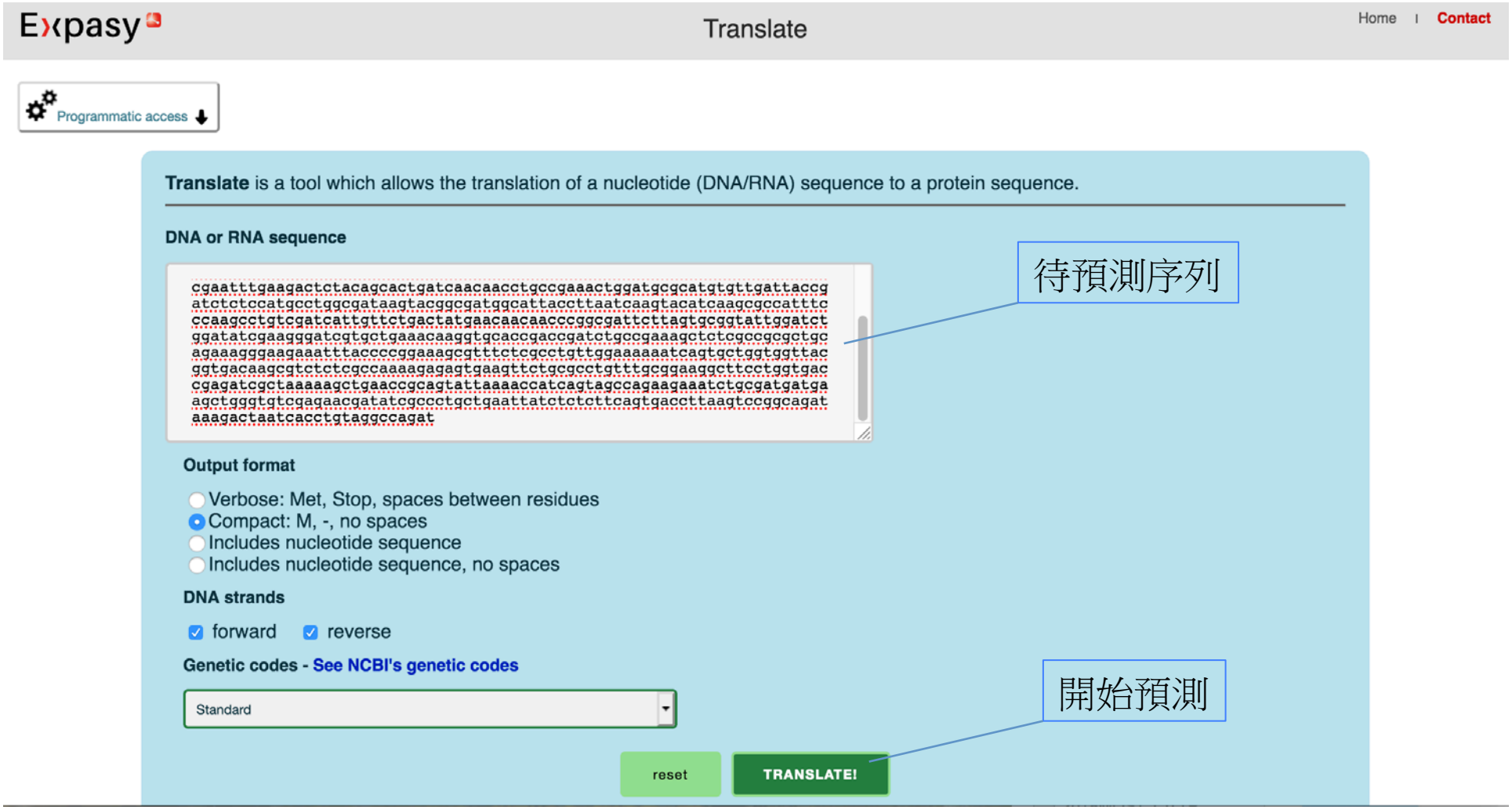
Frame 3 -> T M L N L V G K Q L – K

G H – I Q Y A L L Q S F <- Frame 4

V M S F R T P L C N H F <- Frame 5

F W A L D P L C A T T F <- Frame 6

# ORF預測軟體 — translate tolls in Expasy



# ORF預測結果


5'3' Frame 1
KRLIVLKAYLPC-IWYPASSYVKRWNI-FVRRMFQE-KNTSATLTVMSRACCSKVAYYMNNMNVIIADDHPIVLFGIRKSLEQIEWVNVVGEFEDSTAL
INNLPKLDAHVLITDLSMPGDKYGDGITLIKYIKRHFPSLSIIVLTMNNNPAILSAVLDLDIEGIVLKQGAPTDLPKALAALQKGKKFTPESVSRLLEK
ISAGGYGDKRLSPKESEVLRLFAEGFLVTEIAKKLNRSIKTISSQKKSAMMKLGVENDIALLNYLSSVTLSPADKD-SPVGQ
5'3' Frame 2
NGSSS-RRICHAKSGTRQAVM-NAGTSDS-EGCSRNRKIHQRH-QLCQELAVAR-PIT-TI-T-LLPMTIR-SCSVFANHLSKLSG-MLSANLKTLQH-
STTCRNWMRMC-LPISPCLAISTAMALP-SSTSSAISQACRSLF-L-TTTRRFLVRYWIWISKGSC-NKVHRPICRKLSPRCRKGRNLPRKAFLACWKK
SVLVVTVTSVSRQKRVKFCACLRKASW-PRSLKS-TAVLKPSVARRNLR--SWVSRTISPC-IISLQ-P-VRQIKTNHL-AR
5'3' Frame 3
TAHRLKGVFAMLNLVPGKQLCETLEHLIREKDVPGIEKYISDIDSYVKSLL-QGSLLHEQYERNYCR-PSDSLVRYSQIT-AN-VGECCRRI-RLYSTD
QQPAETGCACVDYRSLHAWR-VRRWHYLNQVHQAPFPKPVDHCSDYEQQPGDS-CGIGSGYRRDRAETRCTDRSAESSRRAAEREEIYPGKRFSPVGKN
QCWWLR-QASLAKRE-SSAPVCGRLPGDRDR-KAEPQY-NHQ-PEEICDDEAGCRERYRPAELSLFSDLKSGR-RLITCRPD
3'5' Frame 1
IWPTGD-SLSAGLKVTEER-FSRAISFSTPSFIIADFFWLLMVLILRFSFLAISVTRKPSANRRRTSLSFGERRLSP-PPALIFSNRRETLSGVNFFPF
CSAARAFGRSVGAPCFSTIPSISRSNTALRIAGLLFIVRTMIDRLGKWRLMYLIKVMPSPYLSPGMERSVINTCASSFGRLLISAVESSNSPTTFTHSI
CSSDLRIPNKTIGWSSAIITFILFM--ATLLQQALDITVNVADVFFYSWNILLTNQMFQRFT-LLAGYQI-HGKYAFKTMSR
3'5' Frame 2
SGLQVISLYLPDLRSLKRDNSAGRYRSRHPASSSQISSGY-WF-YCGSAF-RSRSPGSLPQTGAELHSLLARDACHRNHQH-FFPTGEKRFPG-ISSLS
AARRELSADRSVHLVSARSLRYPDPIPH-ESPGCCS-SEQ-STGLGNGA-CT-LR-CHRRTYRQAWRDR-STHAHPVSAGC-SVL-SLQIRRQHSPTQF
AQVICEYRTRLSDGHRQ-LRSYCSCNRLPCYSKLLT-LSMSLMYFSIPGTSFSRIRCSSVSHNCLPGTRFSMANTPLRR-AV
3'5' Frame 3
LAYR-LVFICRT-GH-REIIQQGDIVLDTQLHHRRFLLATDGFNTAVQLFSDLGHQEAFRKQAQNFTLFWRETLVTVTTSTDFFQQARNAFRGKFLPFL
QRGESFRQIGRCTLFQHDPFDIQIQYRTKNRRVVVHSQNNDRQAWEMALDVLD-GNAIAVLIARHGEIGNQHMRIQFRQVVDQCCRVFKFADNIHPLNL
LK-FANTEQDYRMVIGNNYVHIVHVIGYLATASS-HNCQCR-CIFLFLEHPSHESDVPAFHITACRVPDLAWQIRL-DDEPF

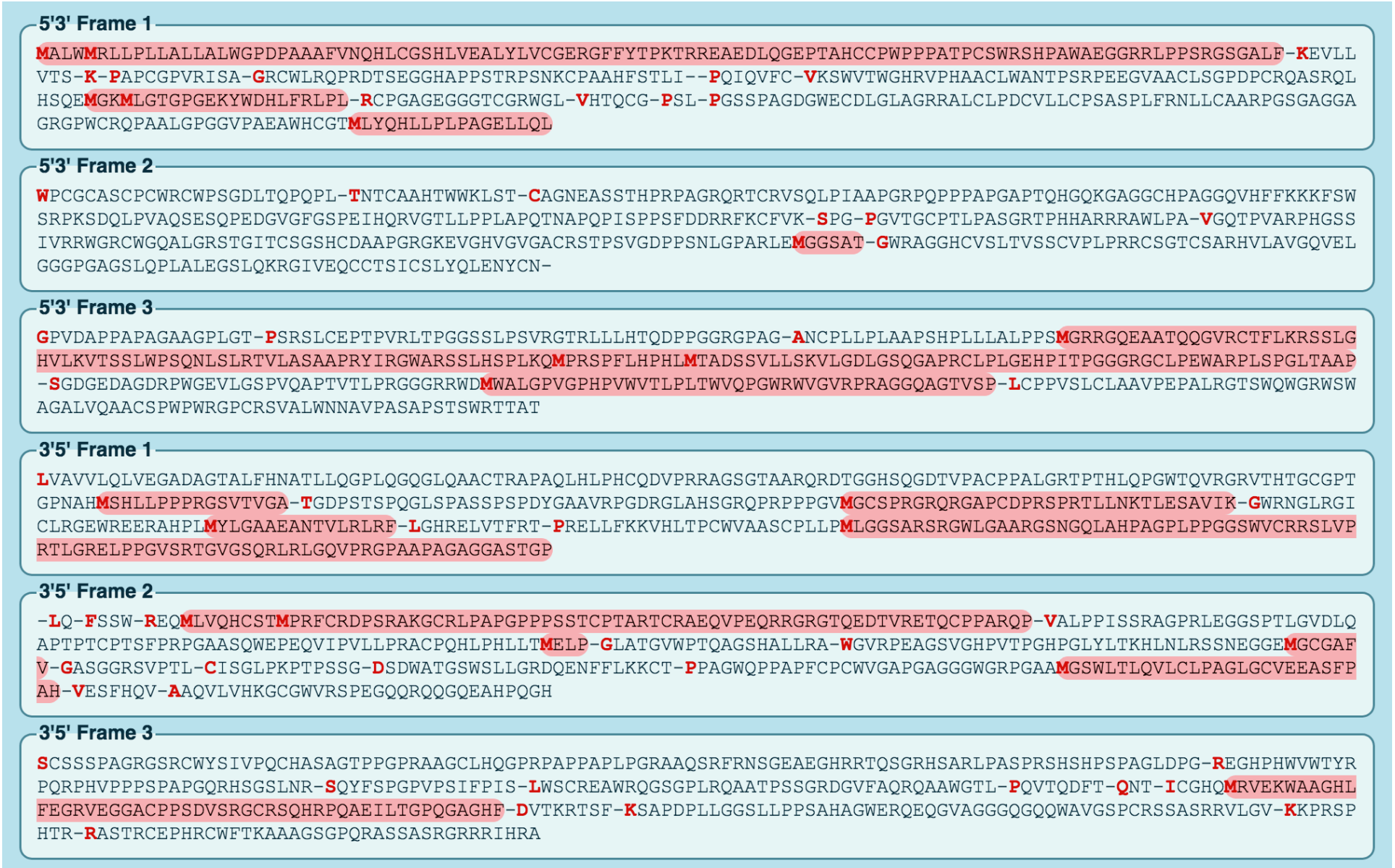
# 由已知基因進行基因預測

- 真核生物基因含有內含子，較難以真核生物基因含有內含子，較難以ORF finder的方式預測，因此可以已知蛋白或RNA序列進行預測
- 範例： 人類胰島素基因片段 1120 bp, 蛋白質序列 110 a.a.

ATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCCTCTGGGGACCTGACCCAGCCGCAGCCTTTGTGAACCAAC
ACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGGAAGCTCTCTACCTAGTGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTCTACACACCCAAGACCCGCCGGG
AGGCAGAGGACCTGCAGGGTGAGCCAACTGCCCATTGCTGCCCCTGGCCGCCCCCAGCCACCCCCTGCTCCTGGCGCTCCCACC
CAGCATGGGCAGAAGGGGGCAGGAGGCTGCCACCCAGCAGGGGGTCAGGTGCACTTTTTTAAAAAGAAGTTCTCTTGGTCACG
TCCTAAAAGTGACCAGCTCCCTGTGGCCCAGTCAGAATCTCAGCCTGAGGACGGTGTTGGCTTCGGCAGCCCCGAGATACATCA
GAGGGTGGGCACGCTCCTCCCTCCACTCGCCCCTCAAACAAATGCCCCGCAGCCCATTTCTCCACCCTCATTTGATGACCGCAGAT
TCAAGTGTTTTGTTAAGTAAAGTCCTGGGTGACCTGGGGTCACAGGGTGCCCCACGCTGCCTGCCTCTGGGCGAACACCCCATCA
CGCCCGGAGGAGGGCGTGGCTGCCTGCCTGAGTGGGCCAGACCCCTGTCGCCAGGCCTCACGGCAGCTCCATAGTCAGGAGAT
GGGGAAGATGCTGGGGACAGGCCCTGGGGAGAAGTACTGGGATCACCTGTTCAGGCTCCCACTGTGACGCTGCCCCGGGGCG
GGGGAAGGAGGTGGGACATGTGGGCGTTGGGGCCTGTAGGTCCACACCCAGTGTGGGTGACCCTCCCTCTAACCTGGGTCCAG
CCCGGCTGGAGATGGGTGGGAGTGCGACCTAGGGCTGGCGGGCAGGCGGGCACTGTGTCTCCCTGACTGTGTCCTCCTGTGTC
CCTCTGCCTCGCCGCTGTTCCGGAACCTGCTCTGCGCGGCACGTCCTGGCAGTGGGGCAGGTGGAGCTGGGCGGGGGCCCTGG
TGCAGGCAGCCTGCAGCCCTTGGCCCTGGAGGGGTCCCTGCAGAAGCGTGGCATTGTGGAACAATGCTGTACCAGCATCTGCTC
CCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAG

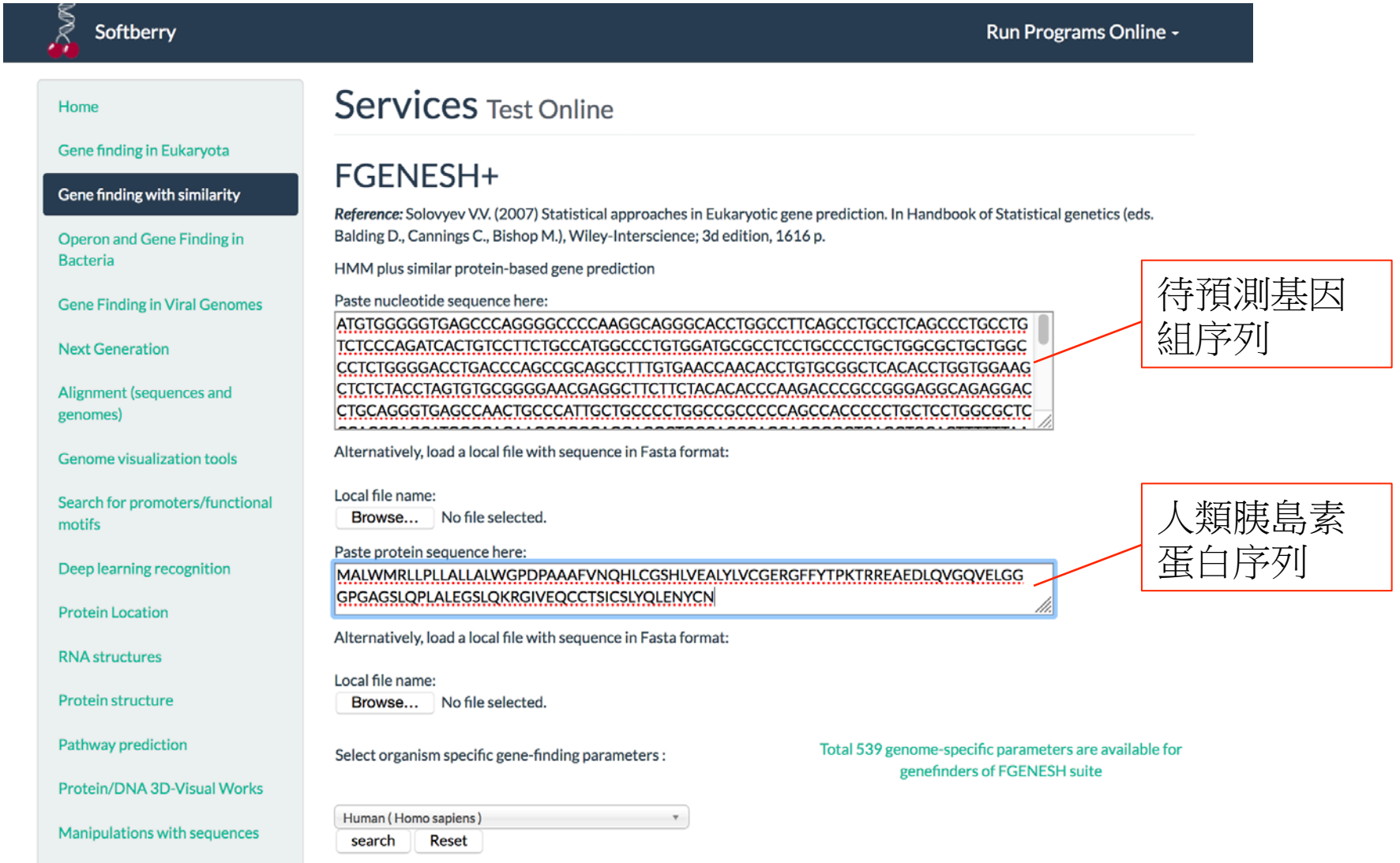
MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVE
LGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

若以ORF預測軟體預測人類胰島素基因，會發現無法預測出完整基因片段

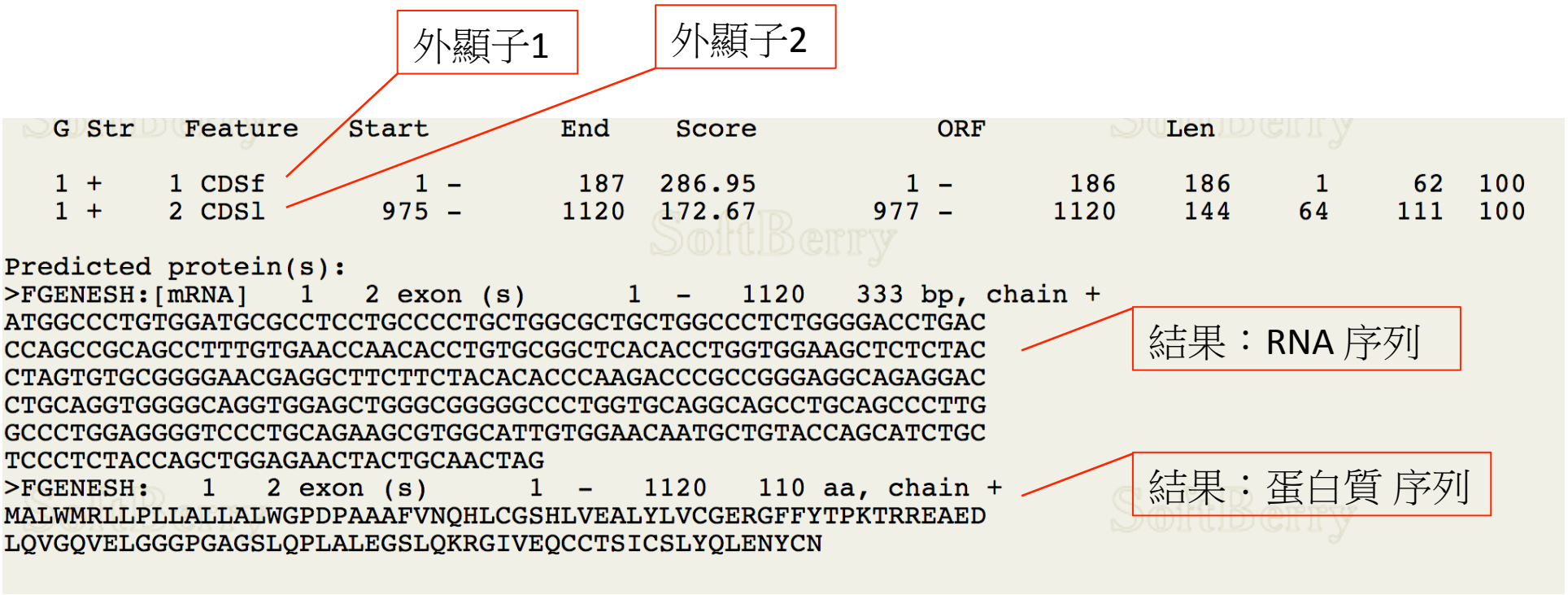


# FGENESH+ of Sofeberry

- 利用已知蛋白序列對未知基因組序列進行基因預測



# FGENESH+預測結果



## 人類胰島素基因序列 1120 bp

外顯子1　　內含子

ATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCCTCTGGGGACCTGACCCAGCCGCAGCCTTTGTGAACCAAC
ACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGGAAGCTCTCTACCTAGTGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTCTACACACCCAAGACCCGCCGGG
AGGCAGAGGACCTGCAGGGTGAGCCAACTGCCCATTGCTGCCCCTGGCCGCCCCCAGCCACCCCCTGCTCCTGGCGCTCCCACC
CAGCATGGGCAGAAGGGGGCAGGAGGCTGCCACCCAGCAGGGGGTCAGGTGCACTTTTTTAAAAAGAAGTTCTCTTGGTCACG
TCCTAAAAGTGACCAGCTCCCTGTGGCCCAGTCAGAATCTCAGCCTGAGGACGGTGTTGGCTTCGGCAGCCCCGAGATACATCA
GAGGGTGGGCACGCTCCTCCCTCCACTCGCCCCTCAAACAAATGCCCCGCAGCCCATTTCTCCACCCTCATTTGATGACCGCAGAT
TCAAGTGTTTTGTTAAGTAAAGTCCTGGGTGACCTGGGGTCACAGGGTGCCCCACGCTGCCTGCCTCTGGGCGAACACCCCATCA
CGCCCGGAGGAGGGCGTGGCTGCCTGCCTGAGTGGGCCAGACCCCTGTCGCCAGGCCTCACGGCAGCTCCATAGTCAGGAGAT
GGGGAAGATGCTGGGGACAGGCCCTGGGGAGAAGTACTGGGATCACCTGTTCAGGCTCCCACTGTGACGCTGCCCCGGGGCG
GGGGAAGGAGGTGGGACATGTGGGCGTTGGGGCCTGTAGGTCCACACCCAGTGTGGGTGACCCTCCCTCTAACCTGGGTCCAG
CCCGGCTGGAGATGGGTGGGAGTGCGACCTAGGGCTGGCGGGCAGGCGGGCACTGTGTCTCCCTGACTGTGTCCTCCTGTGTC
CCTCTGCCTCGCCGCTGTTCCGGAACCTGCTCTGCGCGGCACGTCCTGGCAGTGGGGCAGGTGGAGCTGGGCGGGGGCCCTGG
TGCAGGCAGCCTGCAGCCCTTGGCCCTGGAGGGGTCCCTGCAGAAGCGTGGCATTGTGGAACAATGCTGTACCAGCATCTGCTC
CCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAG

外顯子2

## 人類胰島素RNA序列 333 bp

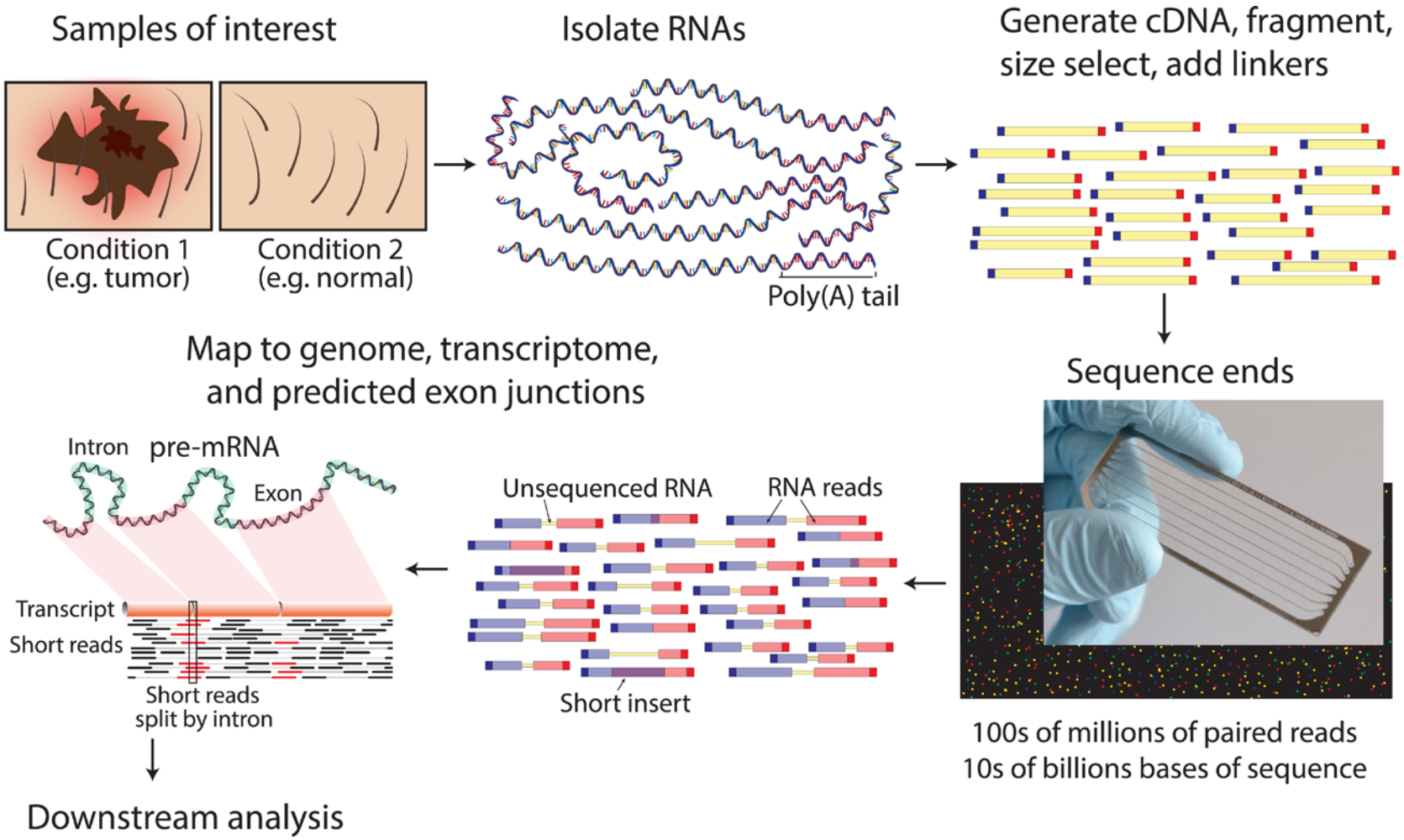
ATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCCTCTGGGGACCTGACCCAGCCGCAGCCTTTGTGAACCAAC
ACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGGAAGCTCTCTACCTAGTGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTCTACACACCCAAGACCCGCCGGG
AGGCAGAGGACCTGCAGGTGGGGCAGGTGGAGCTGGGCGGGGGCCCTGGTGCAGGCAGCCTGCAGCCCTTGGCCCTGGAGG
GGTCCCTGCAGAAGCGTGGCATTGTGGAACAATGCTGTACCAGCATCTGC TCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAG

## 人類胰島素蛋白質序列 110 bp

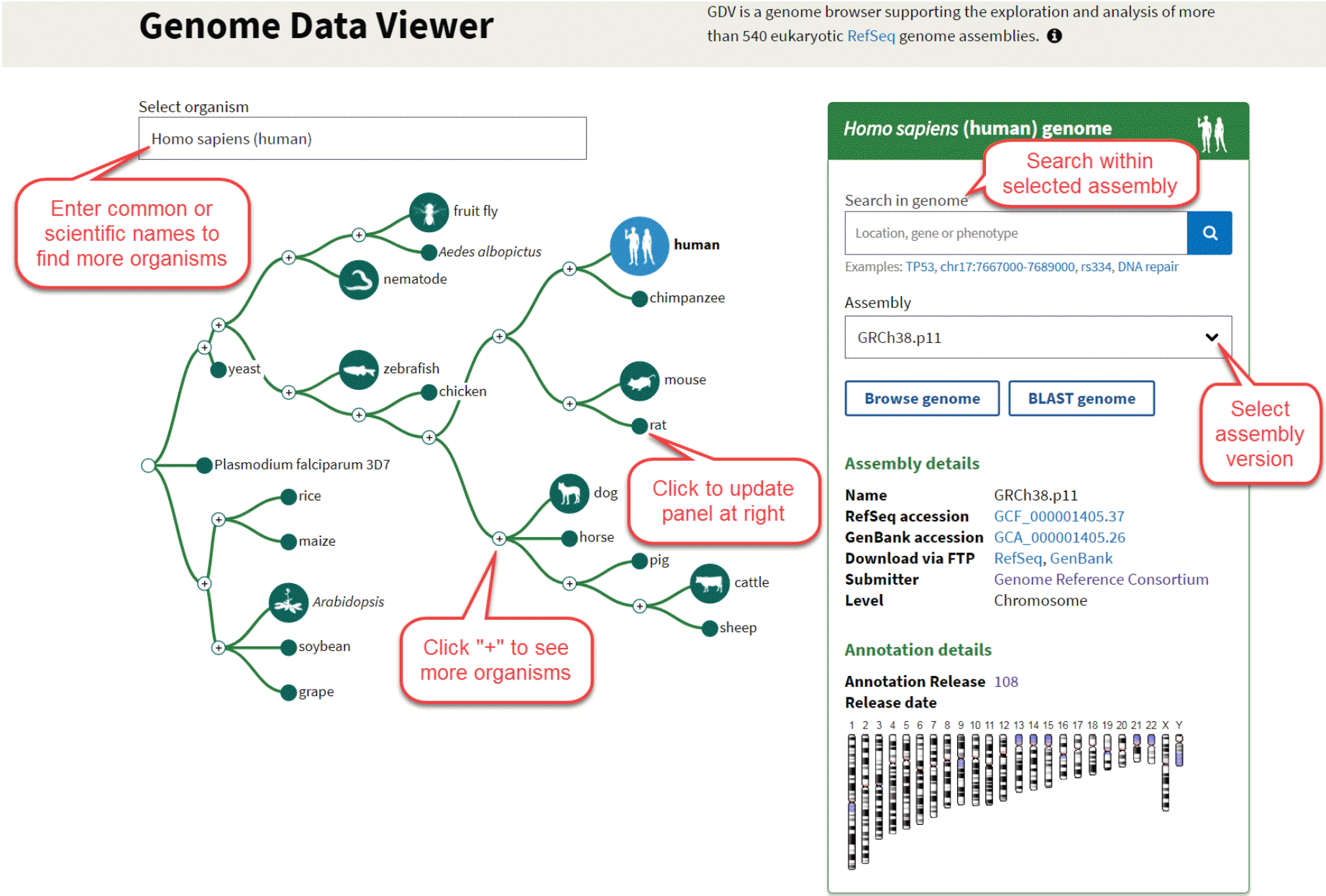
MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVE
LGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

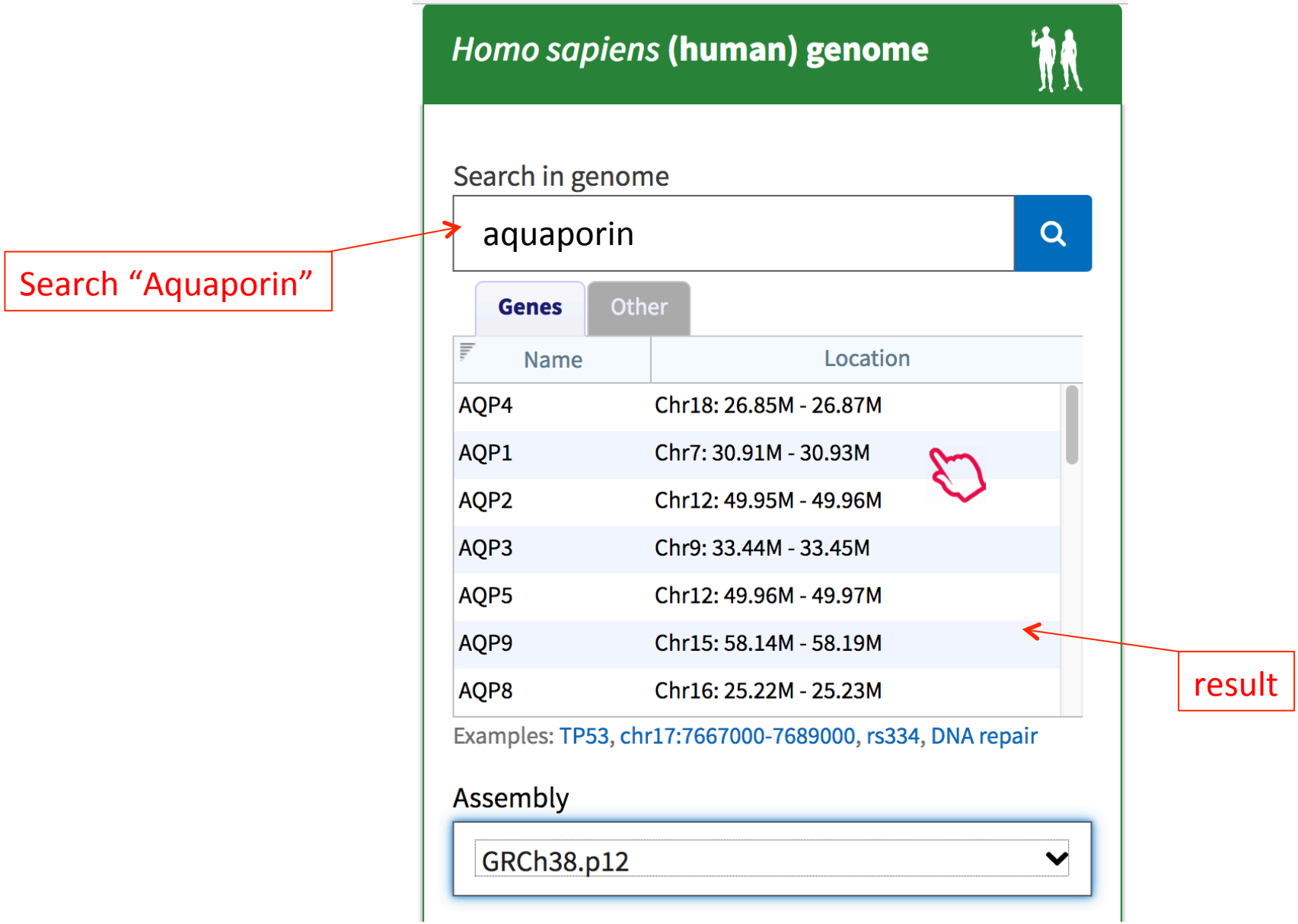
# 轉錄體定序 (RNA-seq)

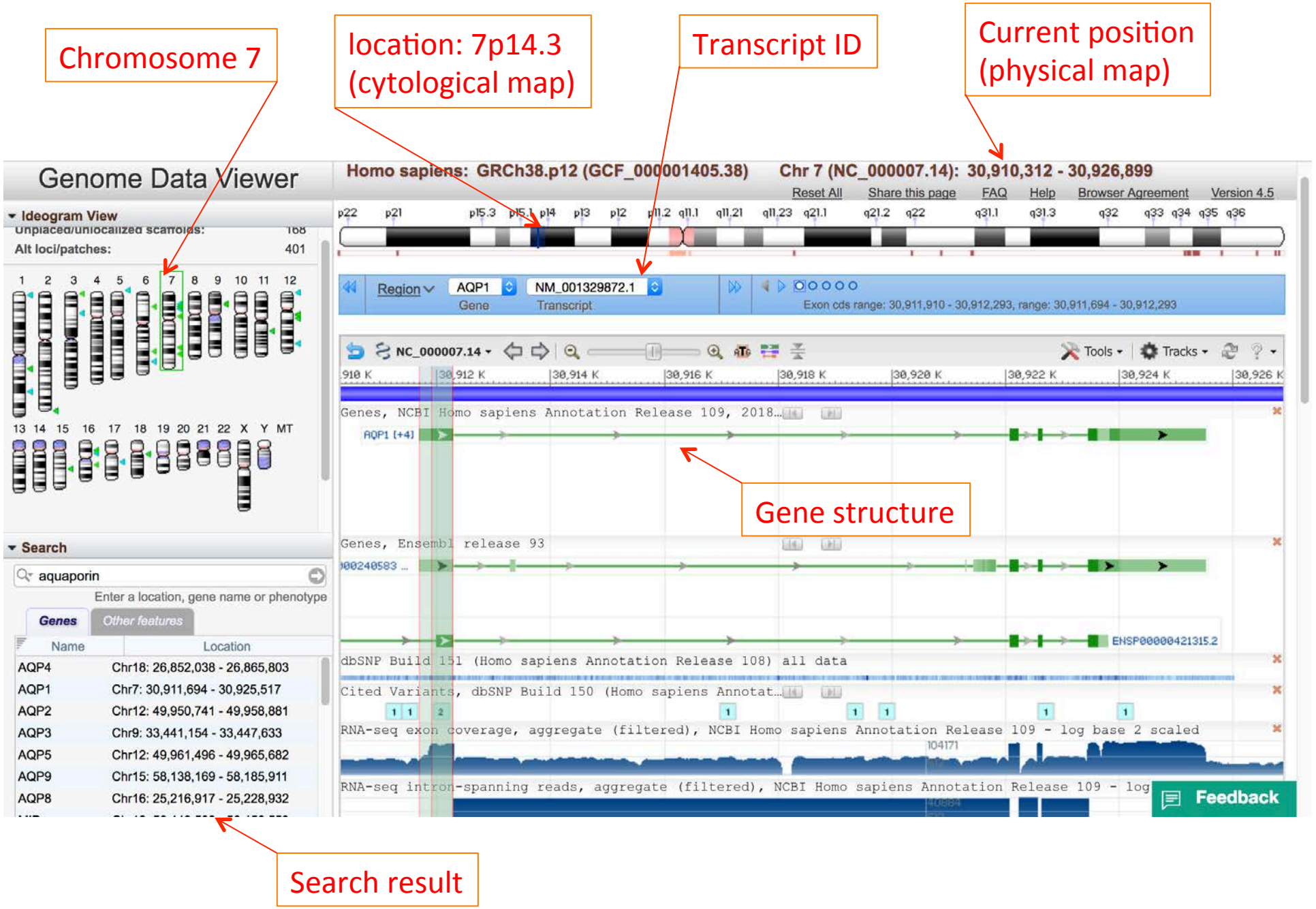
抽取RNA → 轉成雙股DNA並切成小片段 → 霰彈式定序 → 對應到基因組相對位置



# NCBI Genome Data viewer

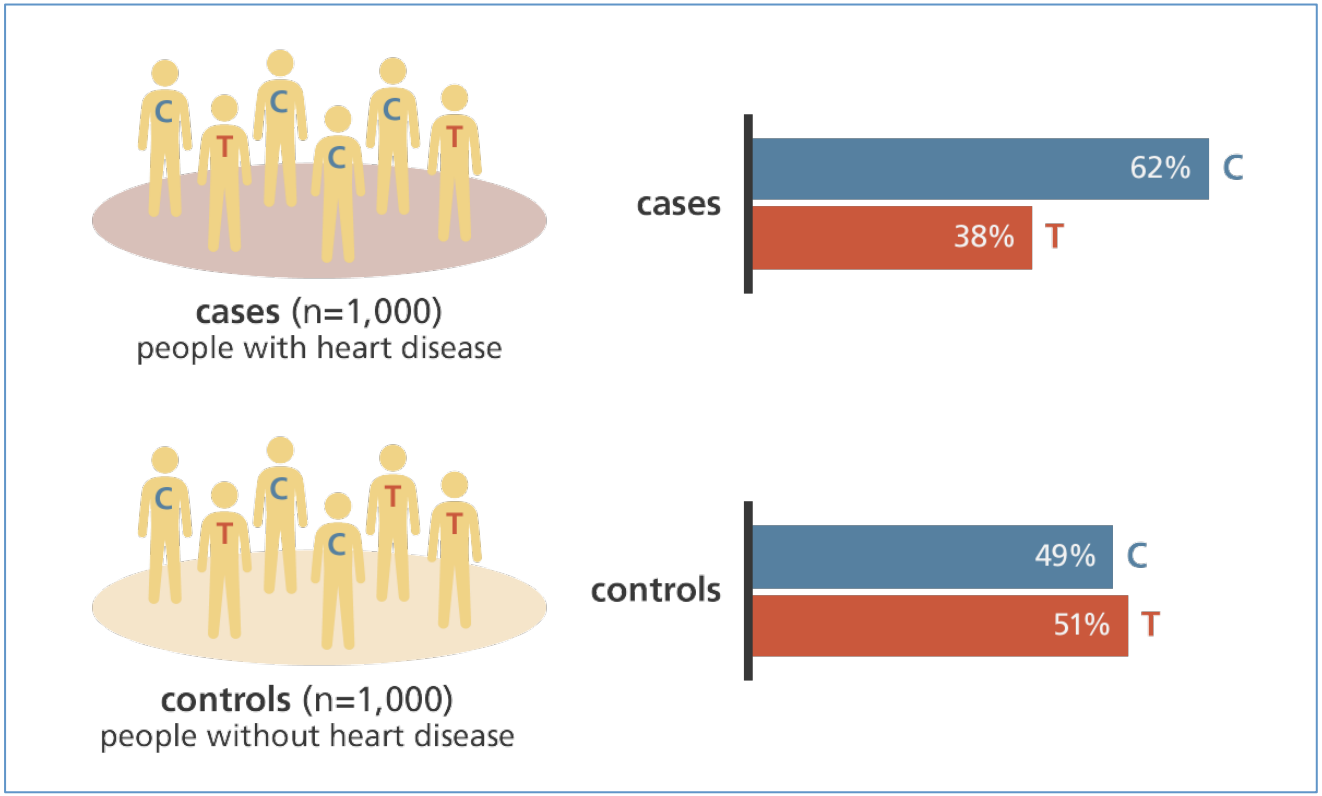


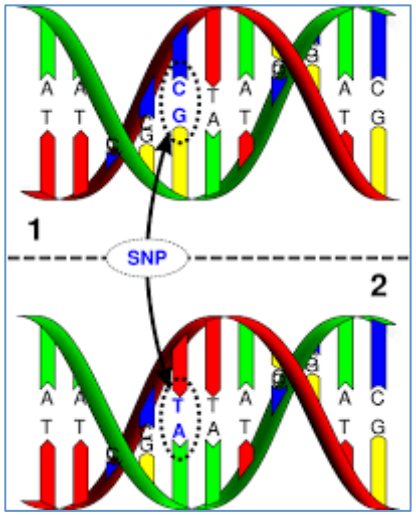

Homo sapiens (human) genome
Search in genome
aquaporin
Search “Aquaporin”
Genes
Other
Name
Location
AQP4
Chr18: 26.85M - 26.87M
AQP1
Chr7: 30.91M - 30.93M
AQP2
Chr12: 49.95M - 49.96M
AQP3
Chr9: 33.44M - 33.45M
AQP5
Chr12: 49.96M - 49.97M
AQP9
Chr15: 58.14M - 58.19M
AQP8
Chr16: 25.22M - 25.23M
result
Examples: TP53, chr17:7667000-7689000, rs334, DNA repair
Assembly
GRCh38.p12


Chromosome 7
location: 7p14.3
(cytological map)
Transcript ID
Current position
(physical map)
Genome Data Viewer
Homo sapiens: GRCh38.p12 (GCF_000001405.38)
Chr 7 (NC_000007.14): 30,910,312 - 30,926,899
Reset All
Share this page
FAQ
Help
Browser Agreement
Version 4.5
Ideogram View
Alt loci/patches: 401
Region
AQP1
Gene
NM_001329872.1
Transcript
Exon cds range: 30,911,910 - 30,912,293; range: 30,911,694 - 30,912,293
NC_000007.14
Tools
Tracks
Genes, NCBI Homo sapiens Annotation Release 109, 2018...
AQP1 [+4]
Gene structure
Genes, Ensembl release 93
ENSP00000421315.2
dbSNP Build 151 (Homo sapiens Annotation Release 108) all data
Cited Variants, dbSNP Build 150 (Homo sapiens Annotat...
RNA-seq exon coverage, aggregate (filtered), NCBI Homo sapiens Annotation Release 109 - log base 2 scaled
RNA-seq intron-spanning reads, aggregate (filtered), NCBI Homo sapiens Annotation Release 109 - log
Feedback
Search
aquaporin
Enter a location, gene name or phenotype
Genes
Other features
Name
Location
AQP4 Chr18: 26,852,038 - 26,865,803
AQP1 Chr7: 30,911,694 - 30,925,517
AQP2 Chr12: 49,950,741 - 49,958,881
AQP3 Chr9: 33,441,154 - 33,447,633
AQP5 Chr12: 49,961,496 - 49,965,682
AQP9 Chr15: 58,138,169 - 58,185,911
AQP8 Chr16: 25,216,917 - 25,228,932
Search result

# 人類基因體的應用

1. 基因功能分析
2. 醫葯開發 - 精準醫學
3. 基因尋找 – GWAS
4. Metagenomics – 微生物菌相分析
5. Epigenomics – DNA 甲基化分析
6. 其它




SNP (單一核苷酸多型性)

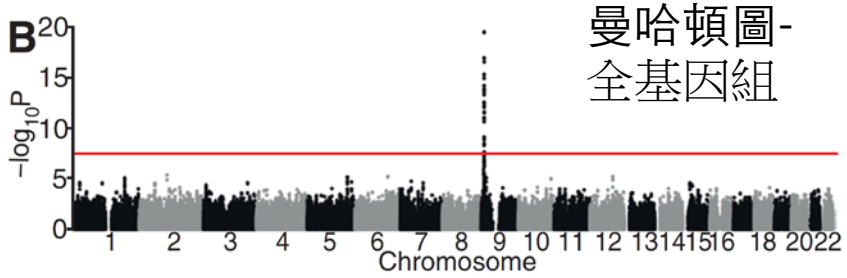
GWAS分析

# GWAS (全基因組關聯分析)

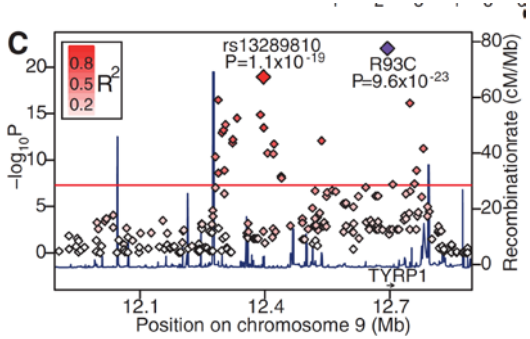
- Genome-wide association study
- 由人類全基因組中找出某性狀關聯基因
- 方法為比較在具有不同性狀的族群之間的個體基因組差異，如金髮及黑髮或具有遺傳疾病及正常人
- 兩群個體其它性狀不能差異太大
- 全基因組定序 → GWAS分析 → SNP candidate → 基因功能分析

42位

43位




曼哈頓圖-
全基因組




曼哈頓圖-
基因TRYP1

**Thanks for your attention**