# CLC Genomics Workbench Premiumを利用した
# ASV解析とPERMANOVA解析

フィルジェン株式会社　バイオインフォマティクス部

(biosupport@filgen.jp)

# CLC Genomics Workbench について

**Filgen®**
biosciences & nanosciences

Gx

## 次世代シークエンス解析用ソフトウェア

◆**リシークエンシング解析**
　・リファレンスゲノムへのマッピング
　・変異検出

◆**トランスクリプトミクス解析**
　・RNA-seq解析
　・small RNA解析

◆**エピゲノミクス解析**
　・ChIP-seq解析
　・バイサルファイトシークエンス解析

◆**De Novo シークエンス解析**
　・De Novo Assembly
　・BLAST解析

◆**菌叢解析**
◆**ゲノムフィニッシング解析**　　} **Premium版 限定機能**
◆**シングルセル解析**
◆**超高速変異解析**

# データのダウンロード



SRAダウンロード機能を使用し、配列データとメタデータをダウンロードします。
今回は異なる環境中の土壌に由来するメタゲノムデータを利用し、解析を行います。

# 配列とメタデータの紐づけ



ダウンロードしたメタデータを開き、"Associate Data"をクリックします。

# 配列とメタデータの紐づけ



配列データを指定します。

# 配列とメタデータの紐づけ



メタデータ中のキーカラムと配列データ名を、
完全一致、前方一致、後方一致のいずれかで紐づけます。
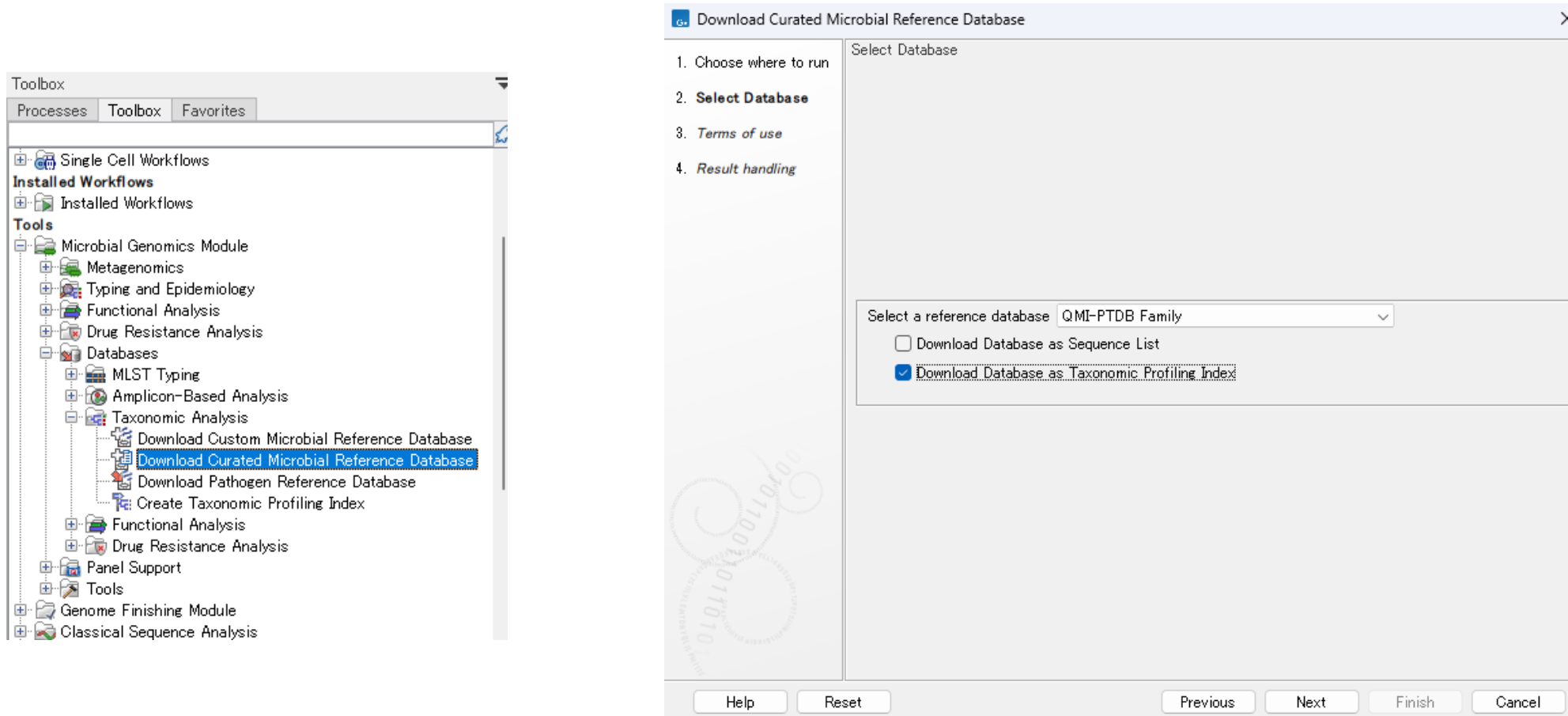
# データベースのダウンロード



分類に使用するデータベースをダウンロードします。
"Download Database as Taxonomic Profiling Index"にチェックを入れます。

# アダプター（プライマー）リストの作成



つぎに、配列から除去するアダプター（プライマー）のリストを作成します。

# アダプター（プライマー）リストの作成



"Add Row"をクリックし、プライマーの配列および
プライマーの位置（5'側、3'側）を一つずつ登録します。

これで準備は終了です。

# ASV解析のワークフロー
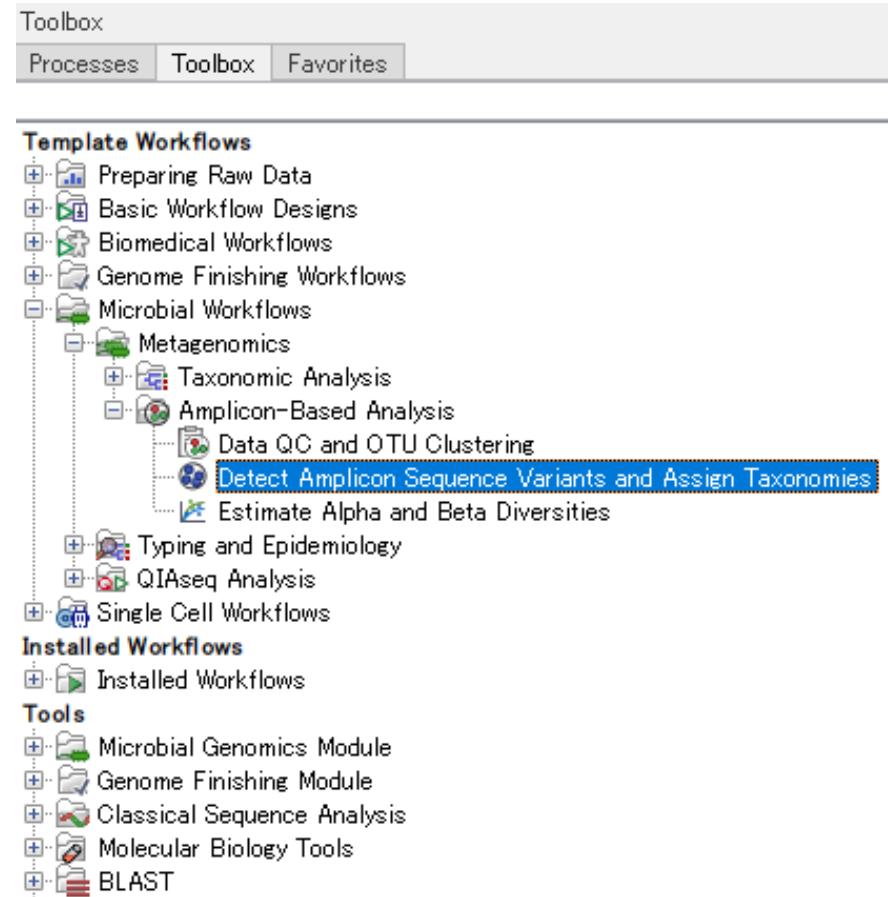


今回は、上記ワークフローを利用し、解析を行います。
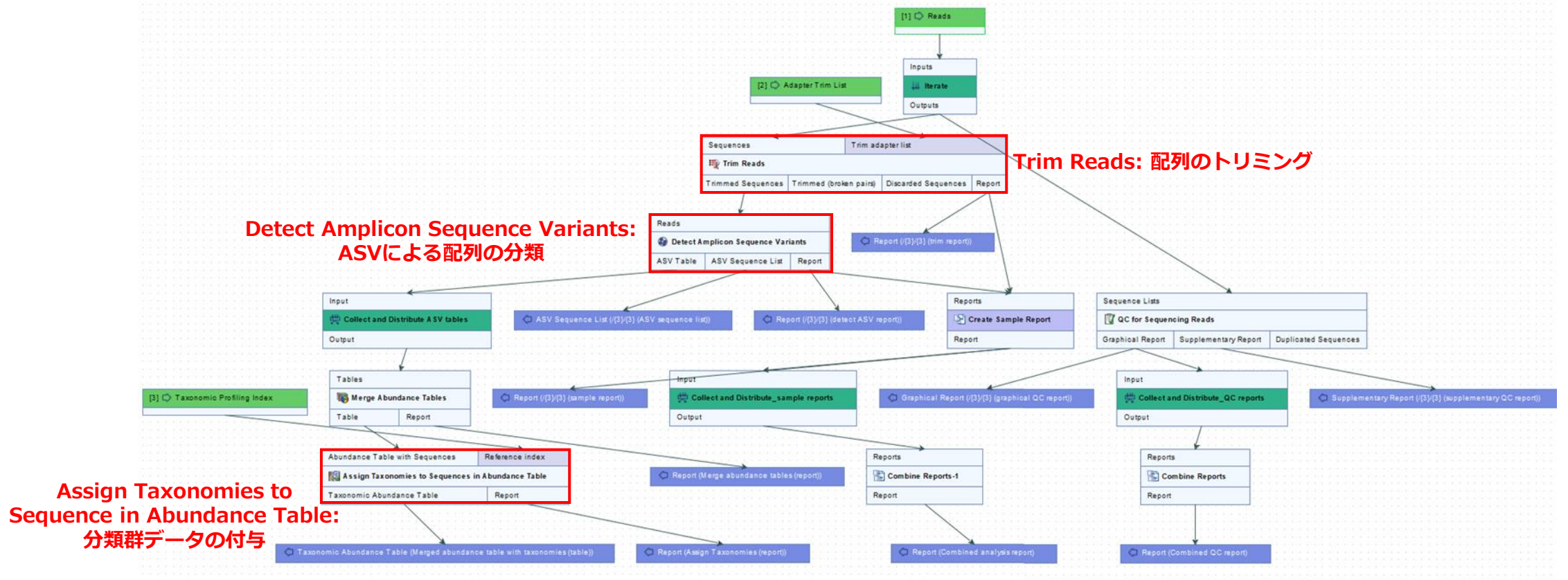
# ワークフローの中身



配列のトリミング、QC、ASV解析、分類群データの付与などをまとめて実行できます。
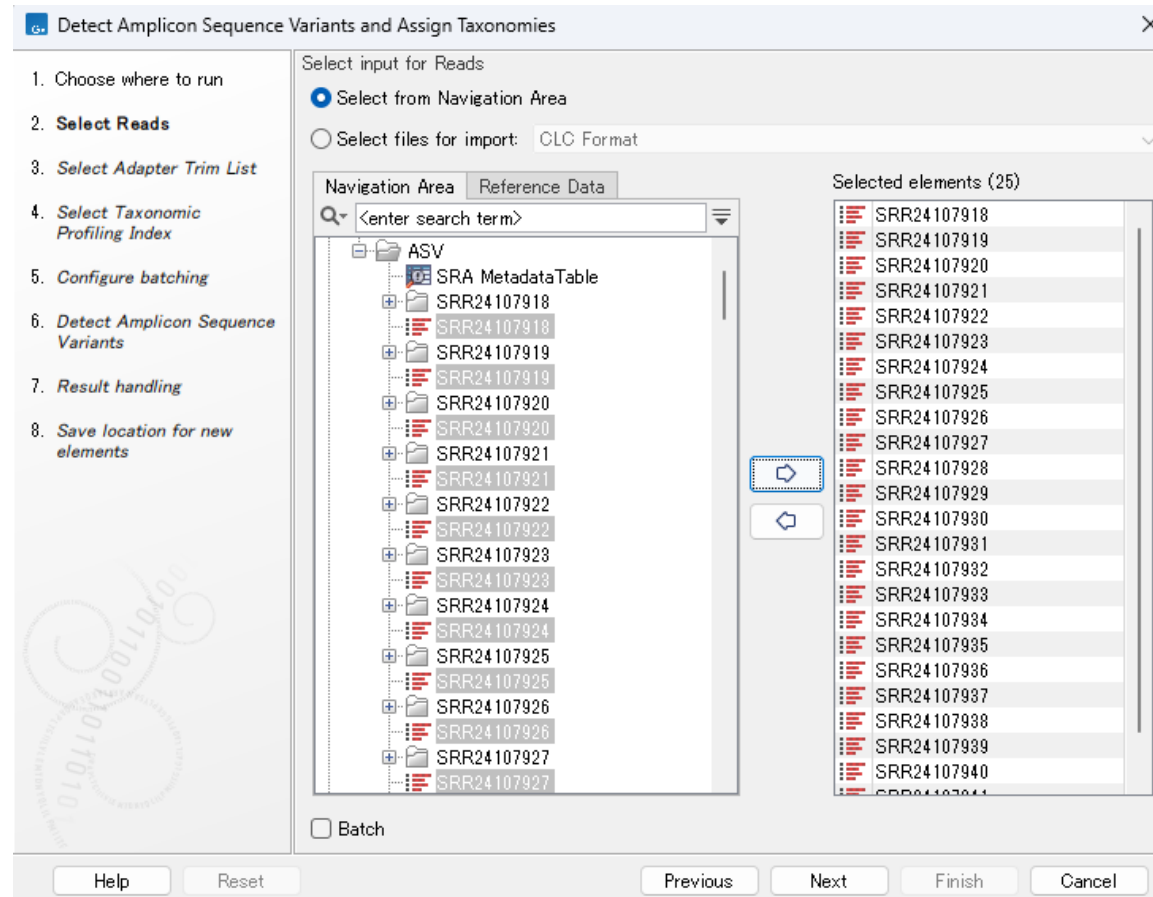
# ワークフローの実行



ワークフローを起動し、配列データをすべて指定します。
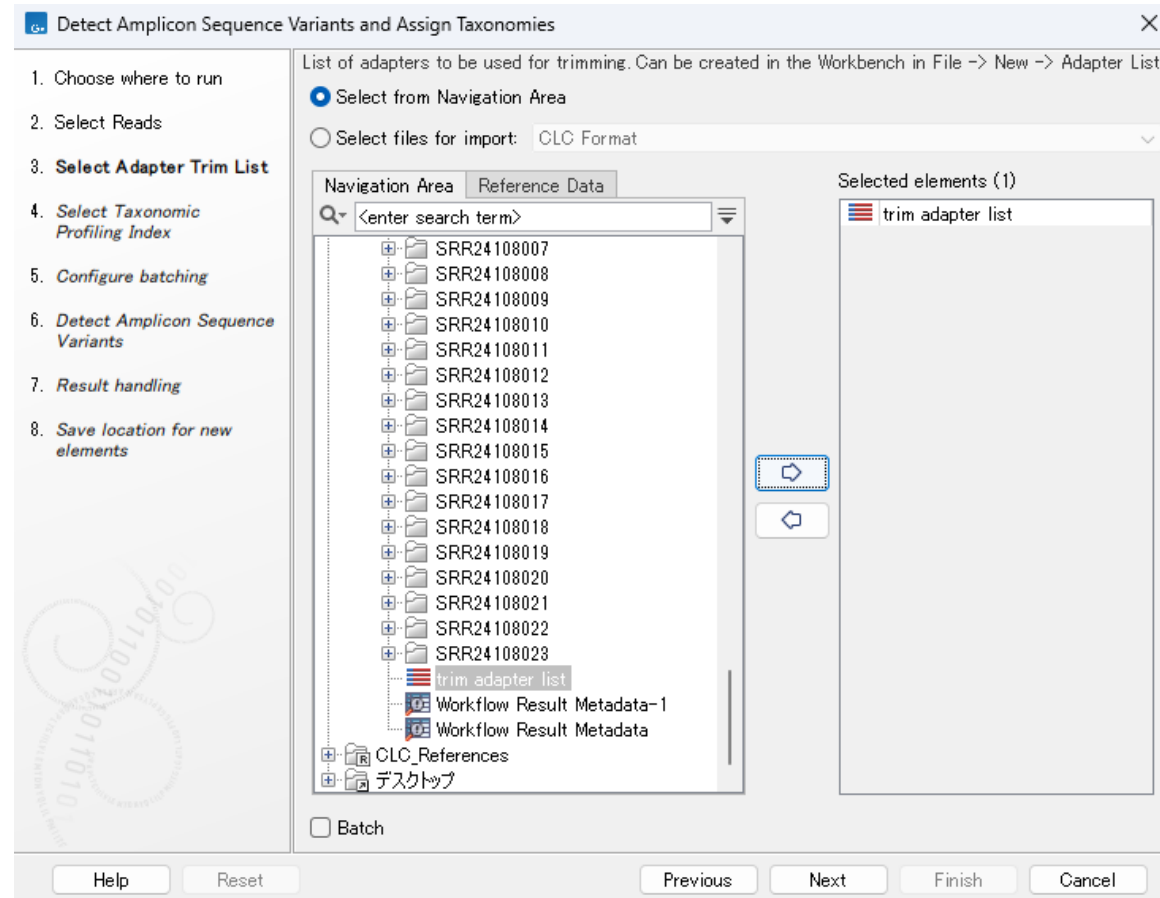
# ワークフローの実行



先ほど用意したアダプターリストを指定します。
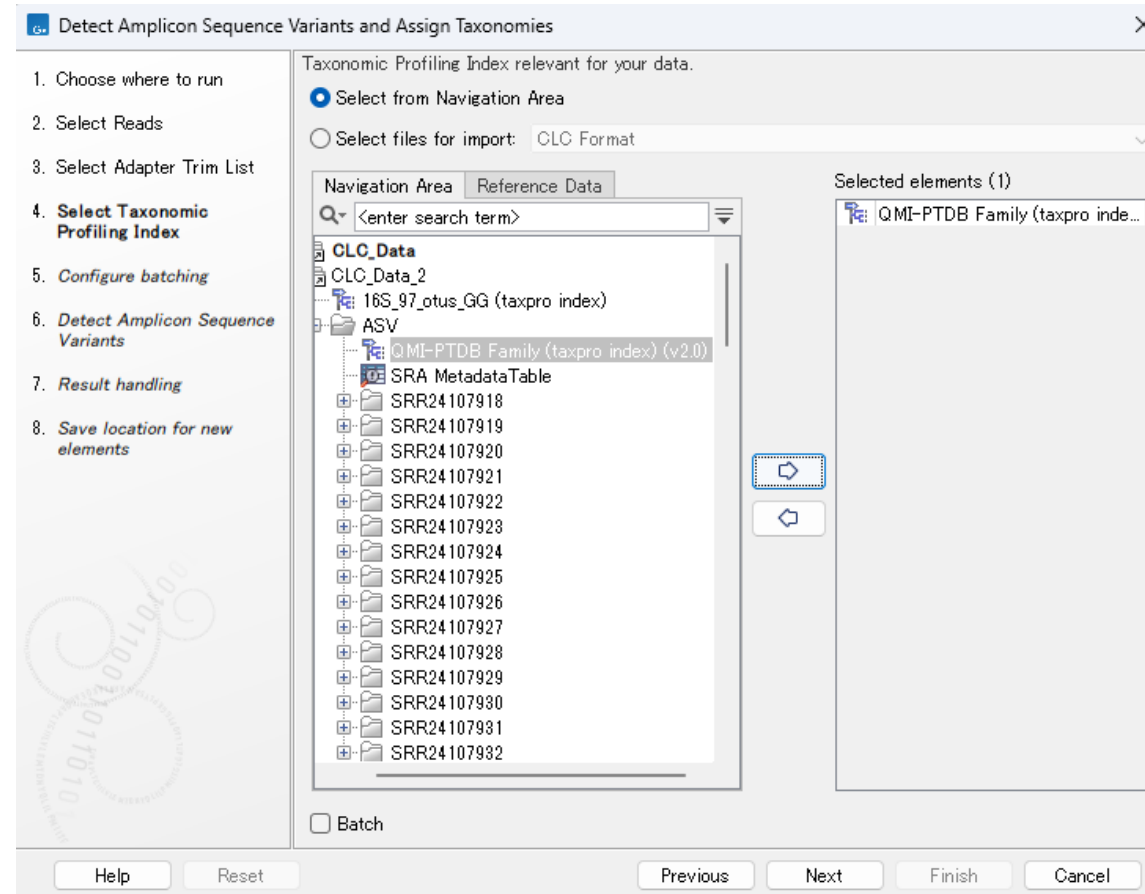
ダウンロードしたデータベース（インデックス形式）を指定します。

データに含まれる分類群に関するリストが作成されます。

# ワークフローの出力

### 綱レベルのAbundunce
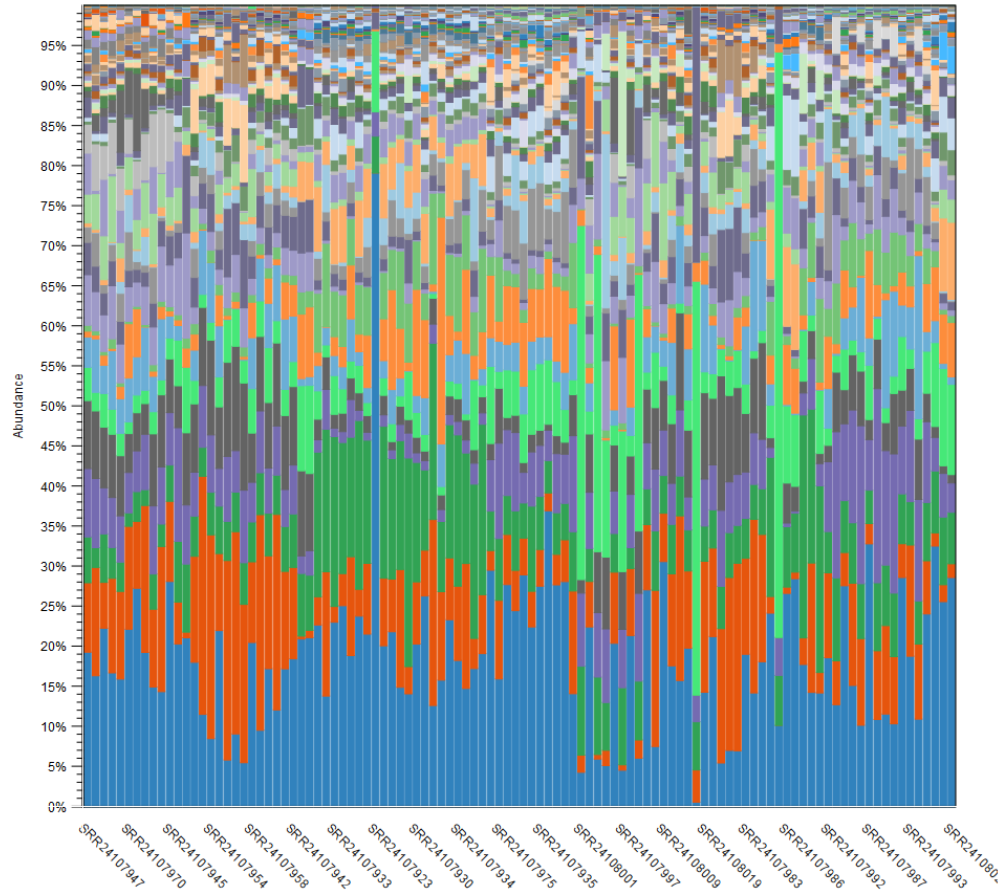


### 門レベルのAbundunce
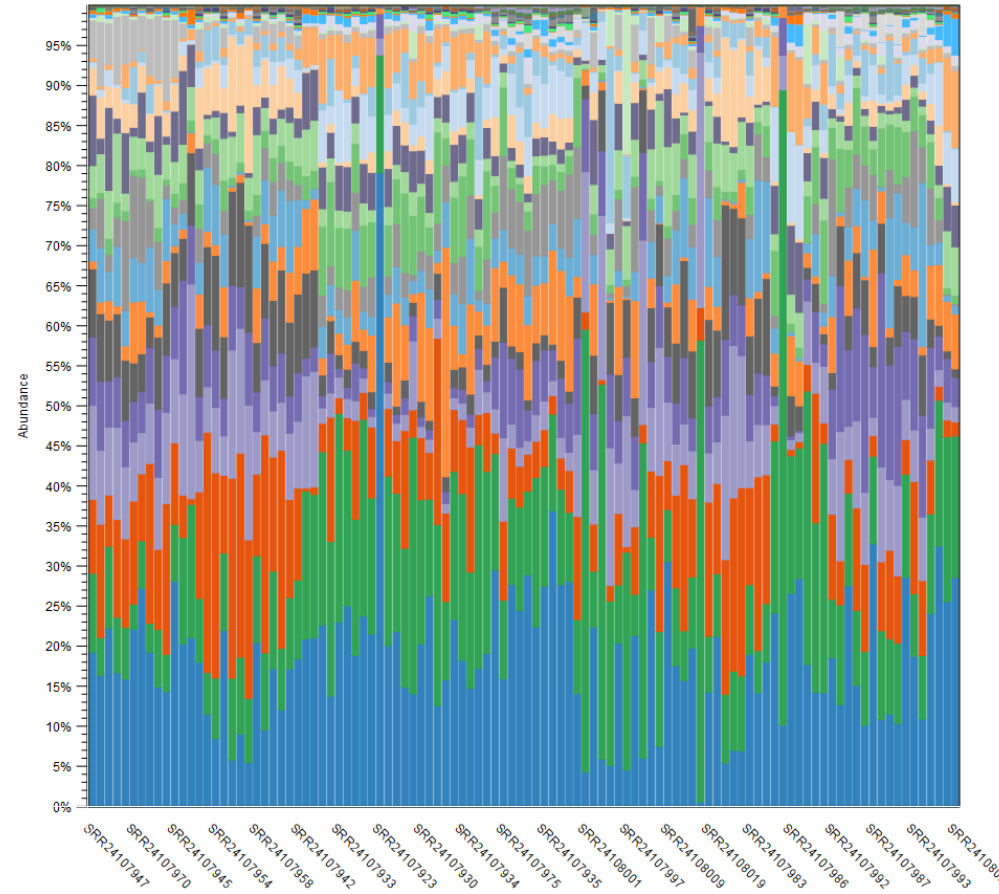


このデータから、バーチャートやサンバースト図の表示も可能です。
バーチャートでは、分類群のレベルによって表示を切り替えることも可能です。
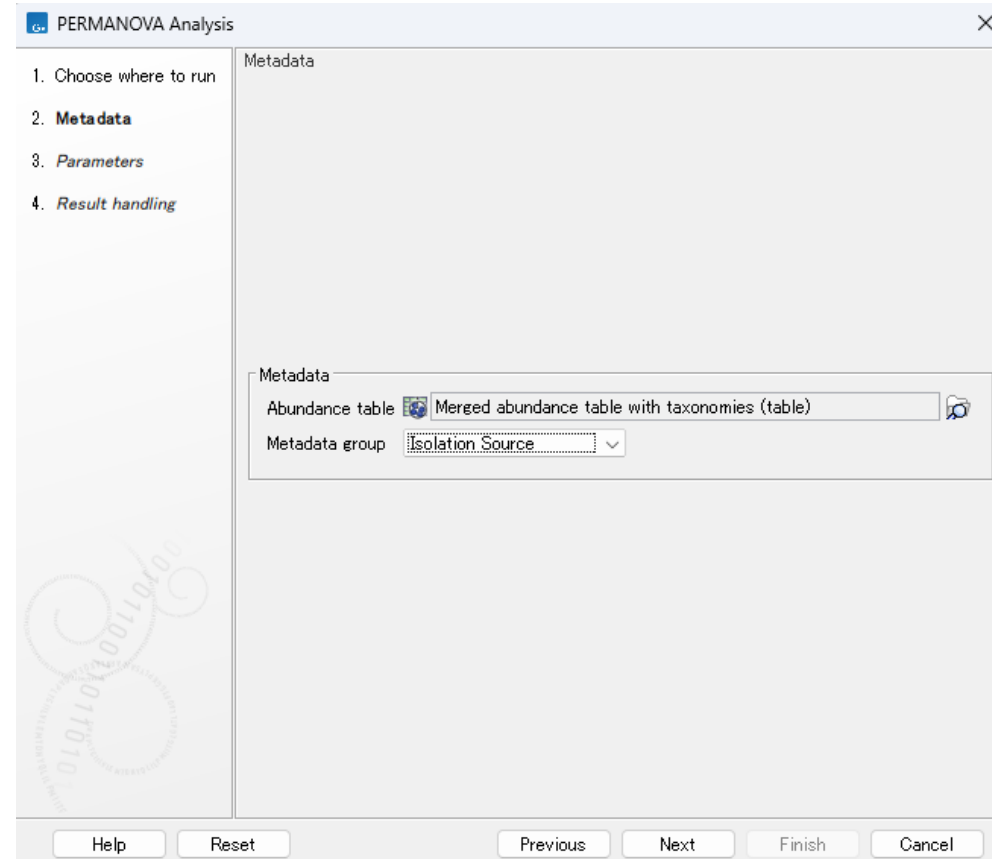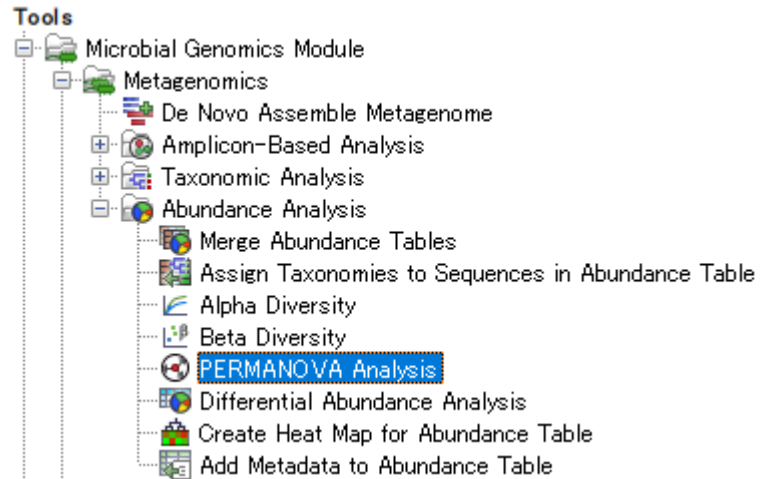
# PERMANOVA解析



PERMANOVA Analysisツールで先ほどのデータを選択し、比較を行う基準を指定します。
今回はサンプルが由来する環境（Isolation Source）間での比較を行います。

# PERMANOVA解析



計算方法および系統樹データを指定します。
系統樹データは、先のワークフローで出力されるデータに含まれています。

**1 PERMANOVA analysis (Bray-Curtis)**

| Variable | Groups | Pseudo-f statistic | p-value |
|---|---|---|---|
| Isolation Source | Desert Soil, forest soil, swamp soil, Riparian soil | 24.96215 | 0.00001 |

| Group 1 | Group 2 | Pseudo-f statistic | p-value | p-value (Bonferroni) |
|---|---|---|---|---|
| Desert Soil | forest soil | 21.62626 | 0.00001 | 0.00006 |
| Desert Soil | swamp soil | 24.95269 | 0.00001 | 0.00006 |
| forest soil | swamp soil | 26.27344 | 0.00001 | 0.00006 |
| Desert Soil | Riparian soil | 24.33763 | 0.00001 | 0.00006 |
| forest soil | Riparian soil | 25.90952 | 0.00001 | 0.00006 |
| swamp soil | Riparian soil | 26.31809 | 0.00001 | 0.00006 |

**2 PERMANOVA analysis (Jaccard)**

| Variable | Groups | Pseudo-f statistic | p-value |
|---|---|---|---|
| Isolation Source | Desert Soil, forest soil, swamp soil, Riparian soil | 13.74230 | 0.00001 |

| Group 1 | Group 2 | Pseudo-f statistic | p-value | p-value (Bonferroni) |
|---|---|---|---|---|
| Desert Soil | forest soil | 12.14557 | 0.00001 | 0.00006 |
| Desert Soil | swamp soil | 13.31787 | 0.00001 | 0.00006 |
| forest soil | swamp soil | 14.44737 | 0.00001 | 0.00006 |
| Desert Soil | Riparian soil | 13.32328 | 0.00001 | 0.00006 |
| forest soil | Riparian soil | 14.55890 | 0.00001 | 0.00006 |
| swamp soil | Riparian soil | 14.51638 | 0.00001 | 0.00006 |

**3 PERMANOVA analysis (Unweighted UniFrac)**

| Variable | Groups | Pseudo-f statistic | p-value |
|---|---|---|---|
| Isolation Source | Desert Soil, forest soil, swamp soil, Riparian soil | 74.60272 | 0.00001 |

| Group 1 | Group 2 | Pseudo-f statistic | p-value | p-value (Bonferroni) |
|---|---|---|---|---|
| Desert Soil | forest soil | 22.44454 | 0.00001 | 0.00006 |
| Desert Soil | swamp soil | 63.63533 | 0.00001 | 0.00006 |
| forest soil | swamp soil | 60.87901 | 0.00001 | 0.00006 |
| Desert Soil | Riparian soil | 88.31102 | 0.00001 | 0.00006 |
| forest soil | Riparian soil | 110.04247 | 0.00001 | 0.00006 |
| swamp soil | Riparian soil | 101.71093 | 0.00001 | 0.00006 |

統計検定の結果が、レポート形式で出力されます。

## アルファ多様性



## ベータ多様性



- desert soil
- forest soil
- swamp soil
- riparian soil
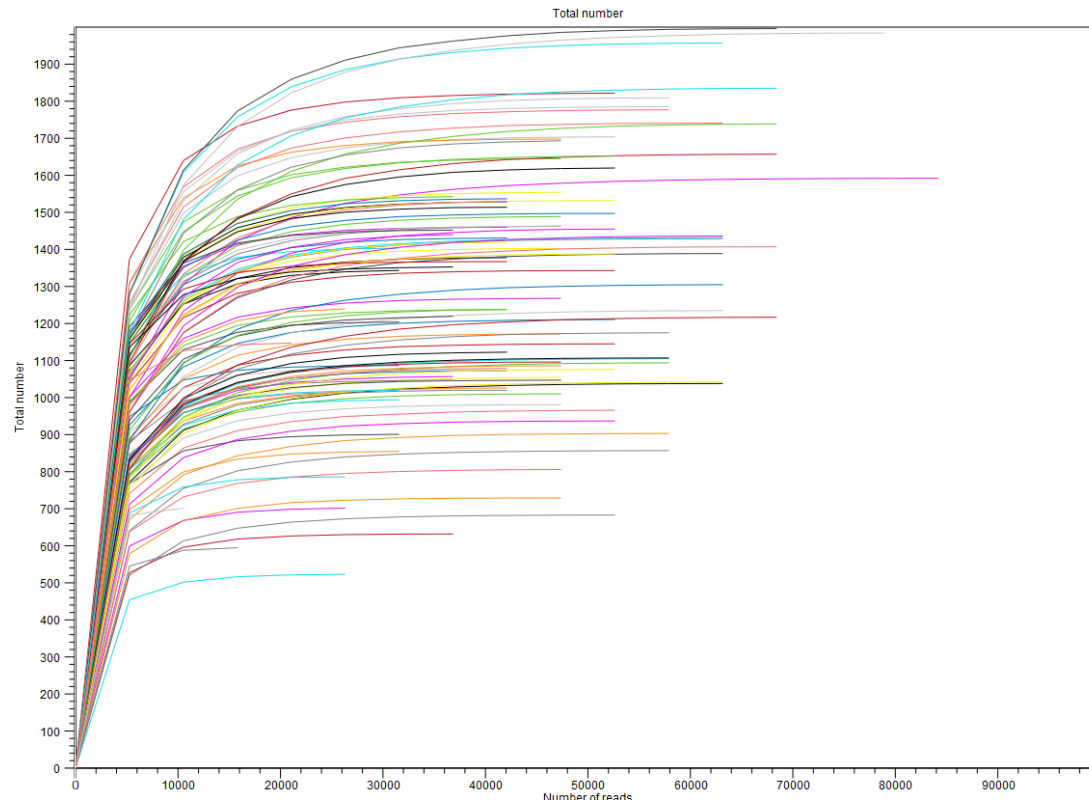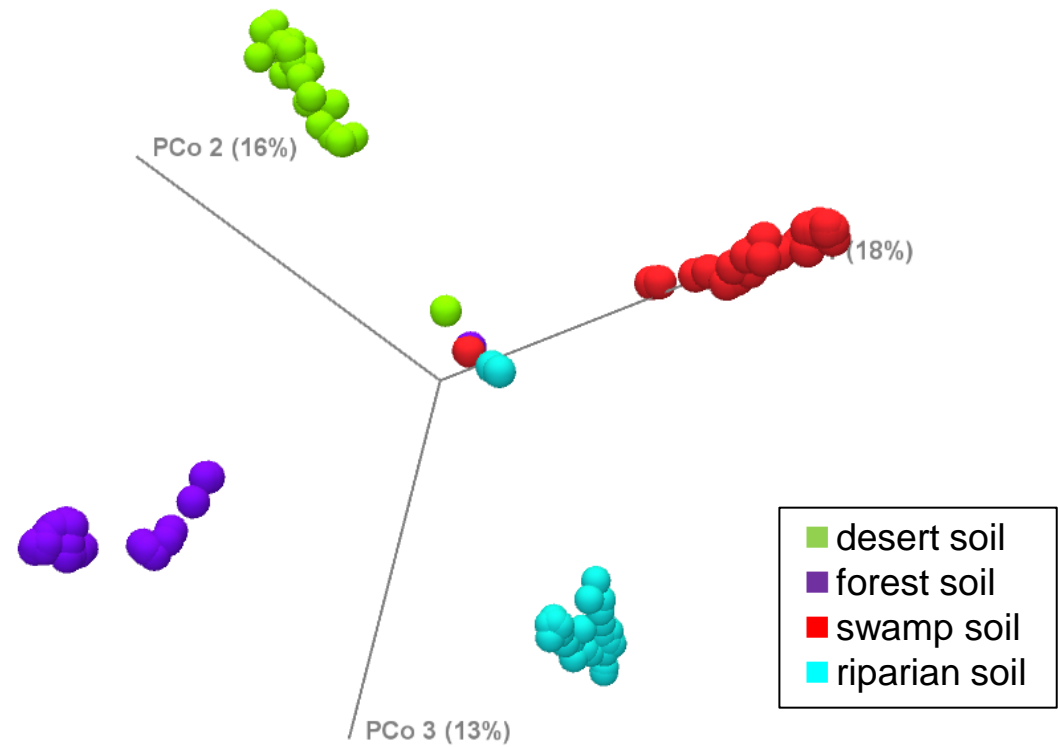
また、ワークフローで出力されたデータを使用し、
アルファ多様性、ベータ多様性に関するプロットもすぐに作成可能です。

お問い合わせ先：フィルジェン株式会社

TEL: 052-624-4388 (9:00〜17：00)

FAX: 052-624-4389

E-mail: biosupport@filgen.jp