BLAST (basic local alignment search tool)

Vyhledává podobné sekvence v databázích.

Stal se nástrojem pro všechno.

Snaha vyhovět potřebám uživatelů úpravami kódu (BLAST1.0 – BLAST2.0 – PSI-BLAST – MEGABLAST – BLASTZ).

V současnosti se zdá, že lepších výsledků můžeme mnohdy dosáhnout použitím nových postupů šitých na míru daného problému.

Suboptimální nasazení programu BLAST

Použití:

Běžné vyhledávání.

Problém:

Blast nevyužívá plně možnosti zpracovat si předem databázy novými způsoby indexování

Řešení:

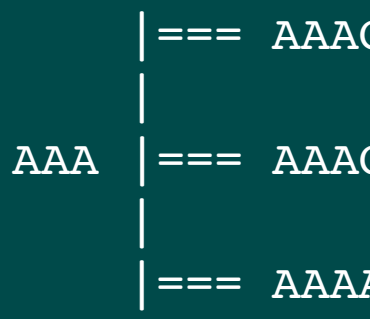
Použití postupů, které používají asociativní pole nebo stromové struktury pro indexaci databázových sekvencí (BLAT, SSAHA, MUMER, QUASAR, VMATCH)

Indexy a stromy

INDEX TYPU POLE
(vhodný pro “bohatý” index, fixní délku, Časově kritické aplikace)

```
AAAA    12   325  65987  124589
AAAC    13  4278  23001
AAAG   326  9989  44032  199235
...
```

INDEX TYPU STROM
(vhodný pro “děravý” index, variabilní délku, je flexibilní)



Sufixové pole

```
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
C G T G T G A C G *     sekvence

sufixy (přípony)       pozice
                  * 9
                G * 8
              C G * 7
            A C G * 6
          G A C G * 5
        T G A C G * 4
      G T G A C G * 3
    T G T G A C G * 2
  G T G T G A C G * 1
C G T G T G A C G * 0
```

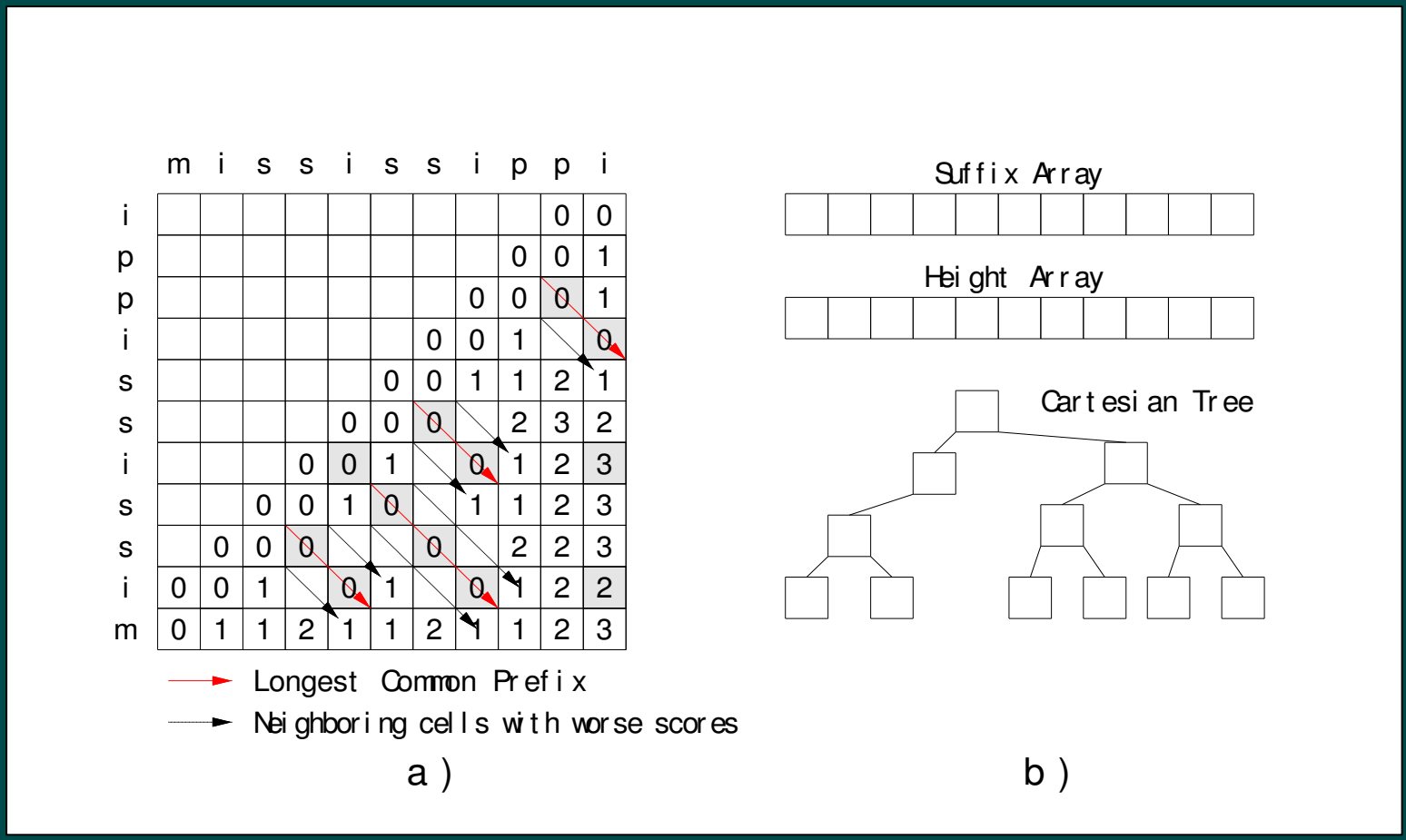
Sufixové pole

```
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
C G T G T G A C G *     sekvence
3 7 9 6 8 5 1 2 4 0    pořadí v sufixovém poli

sufixy abecedně      pozice
                   * 9
             A C G * 6
               C G * 7
C G T G T G A C G * 0
                 G * 8
           G A C G * 5
       G T G A C G * 3
   G T G T G A C G * 1
         T G A C G * 4
     T G T G A C G * 2

9 6 7 0 8 5 3 1 4 2    sufixové pole
```

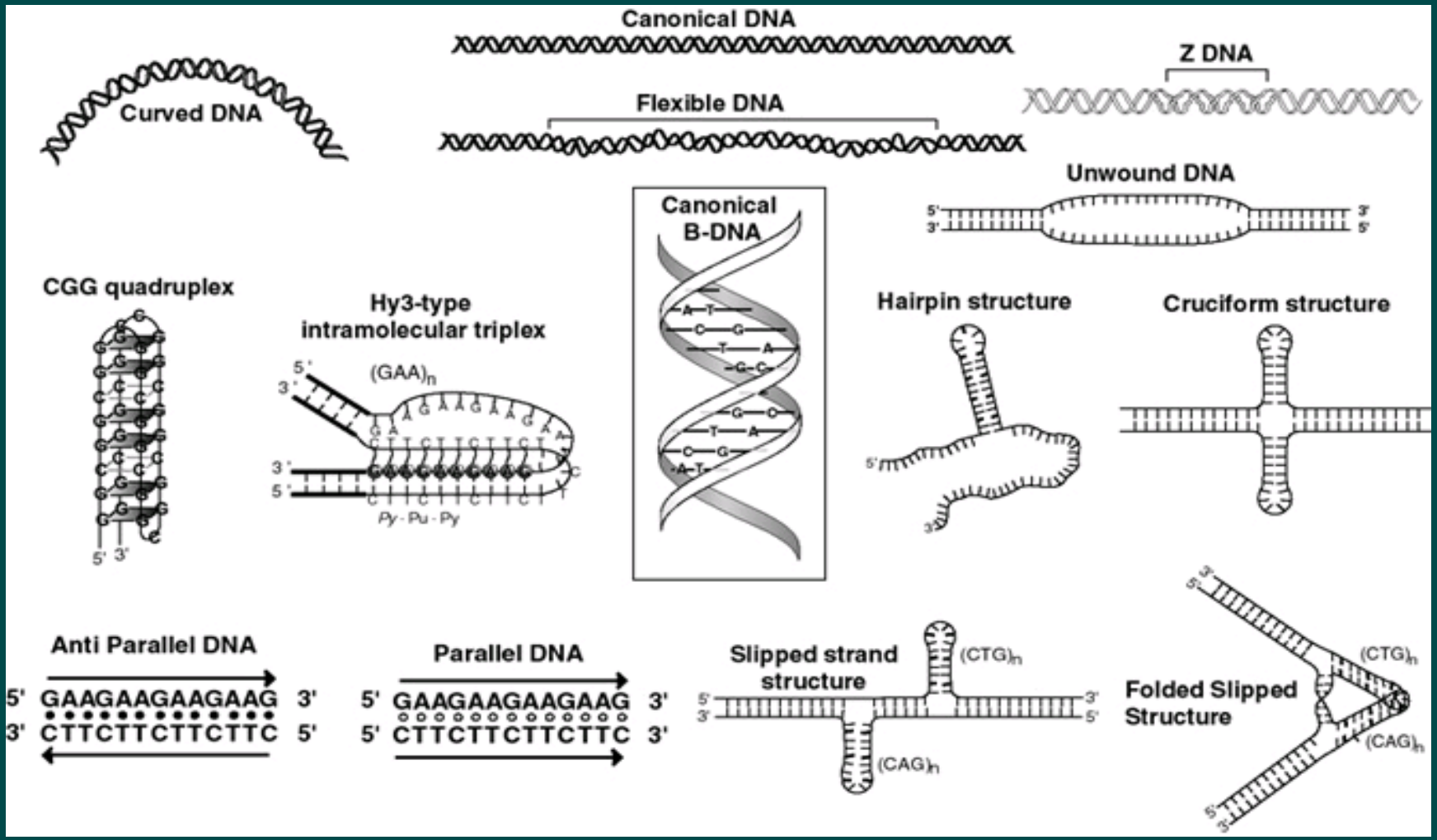
Sufixové pole

```
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
C G T G T G A C G *     sekvence
3 7 9 6 8 5 1 2 4 0    pořadí v sufixovém poli

sufixy abecedně      pozice
                  *                    9   0
                  A C G *              6   0
                  C G *                7   2
                  C G T G T G A C G *  0   0
                  G *                  8   1
                  G A C G *            5   1
                  G T G A C G *        3   3
                  G T G T G A C G *    1   0
                  T G A C G *          4   2
                  T G T G A C G *      2   0

9 6 7 0 8 5 3 1 4 2    sufixové pole
0 0 2 0 1 1 3 0 2 0    delka spol. prefixu (height)
```

Sufixové pole



Sufixové pole



Suboptimální nasazení programu BLAST

Použití:

Běžné vyhledávání.

Problém:

Blast nepracuje s optimání strukturou slova,
Čím trpí poměr citlivost/rychlost.

Řešení:

Použití programu PATTERN HUNTER

Pattern Hunter

PATTERN HUNTER **BLAST**

MODEL SLOVA

110100110010101111 11111111111

ZÁVISLOST POZIC PŘEKRYV

```
110100110010101111     11111111111
 110100110010101111     11111111111     5   10
  110100110010101111     11111111111    5    9
   110100110010101111     11111111111   5    8
    110100110010101111     11111111111  4    7
```

Pattern Hunter

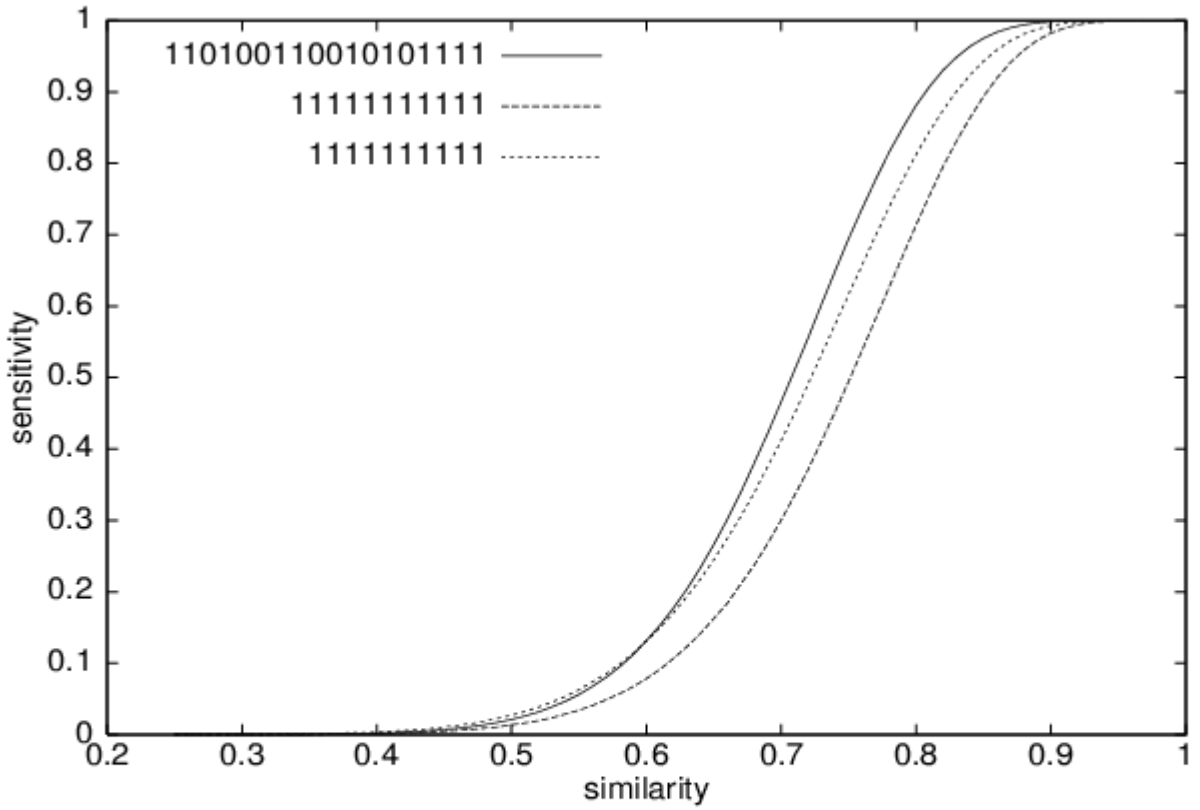


Figure 1: 1-hit performance of weight 11 spaced model versus weight 11 and 10 consecutive models, coordinates in logarithmic scale.

Pattern Hunter

Seq1	Size	Seq2	Size	PH	PH2	MB28	Blastn
M. pneumoniae	828K	*M. genitalium*	589K	10s/65M	4s/48M	1s/88M	47s/45M
E. coli	4.7M	*H. influenza*	1.8M	34s/78M	14s/68M	5s/561M	716s/158M
A.thaliana chr 2	19.6M	*A.thaliana* chr 4	17.5M	5020s/279M	498s/231M	21720s/1087M	∞
H. sapiens chr 22	35M	*H. sapiens* chr 21	26.2M	14512s/419M	5250s/417M	∞	∞

Pattern Hunter

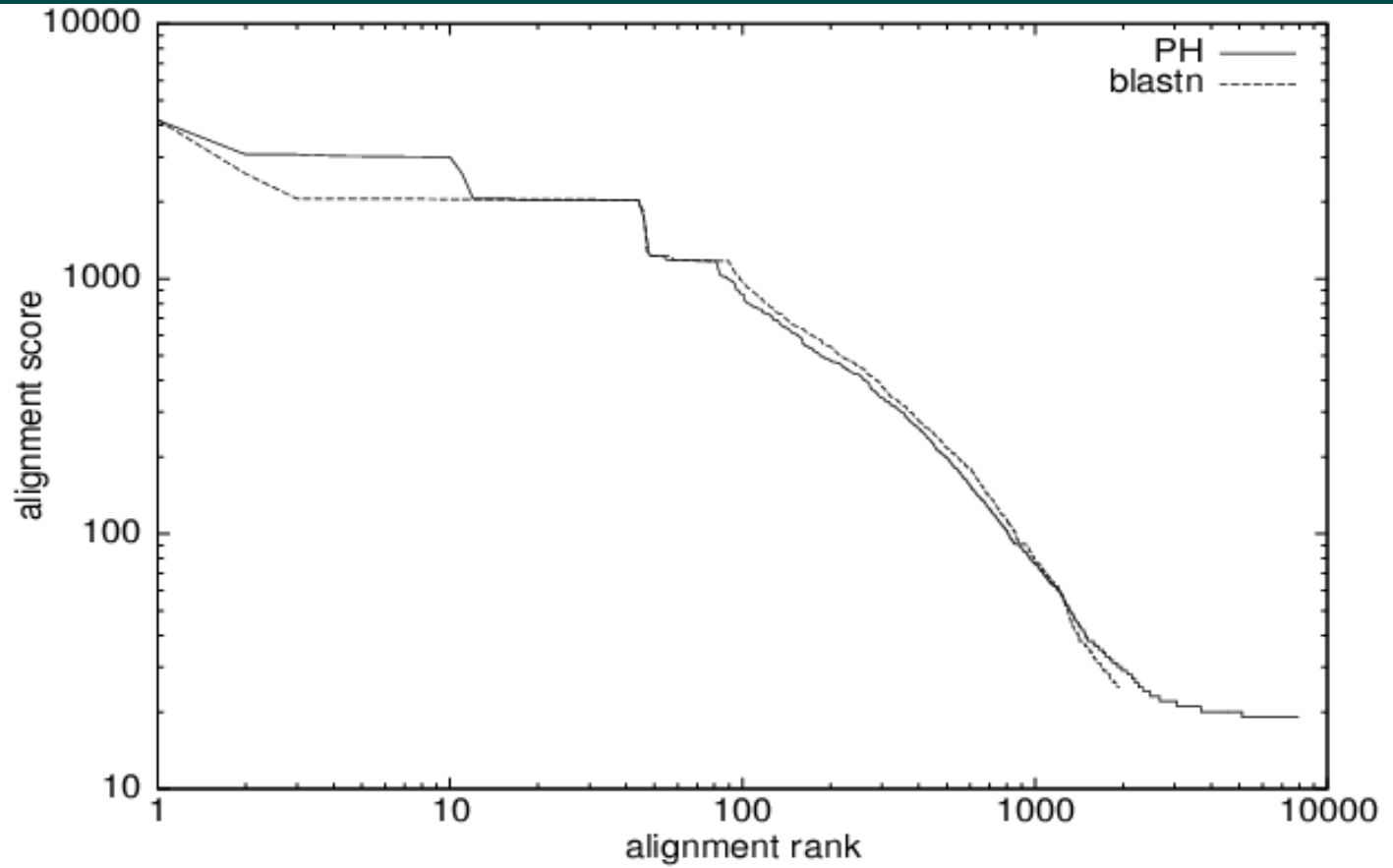


Figure 5: Input: *H. influenza* and *E. coli*. Run times are shown in Figure 7. PatternHunter produces better quality output than Blastn while running 20 times faster.

Pattern Hunter

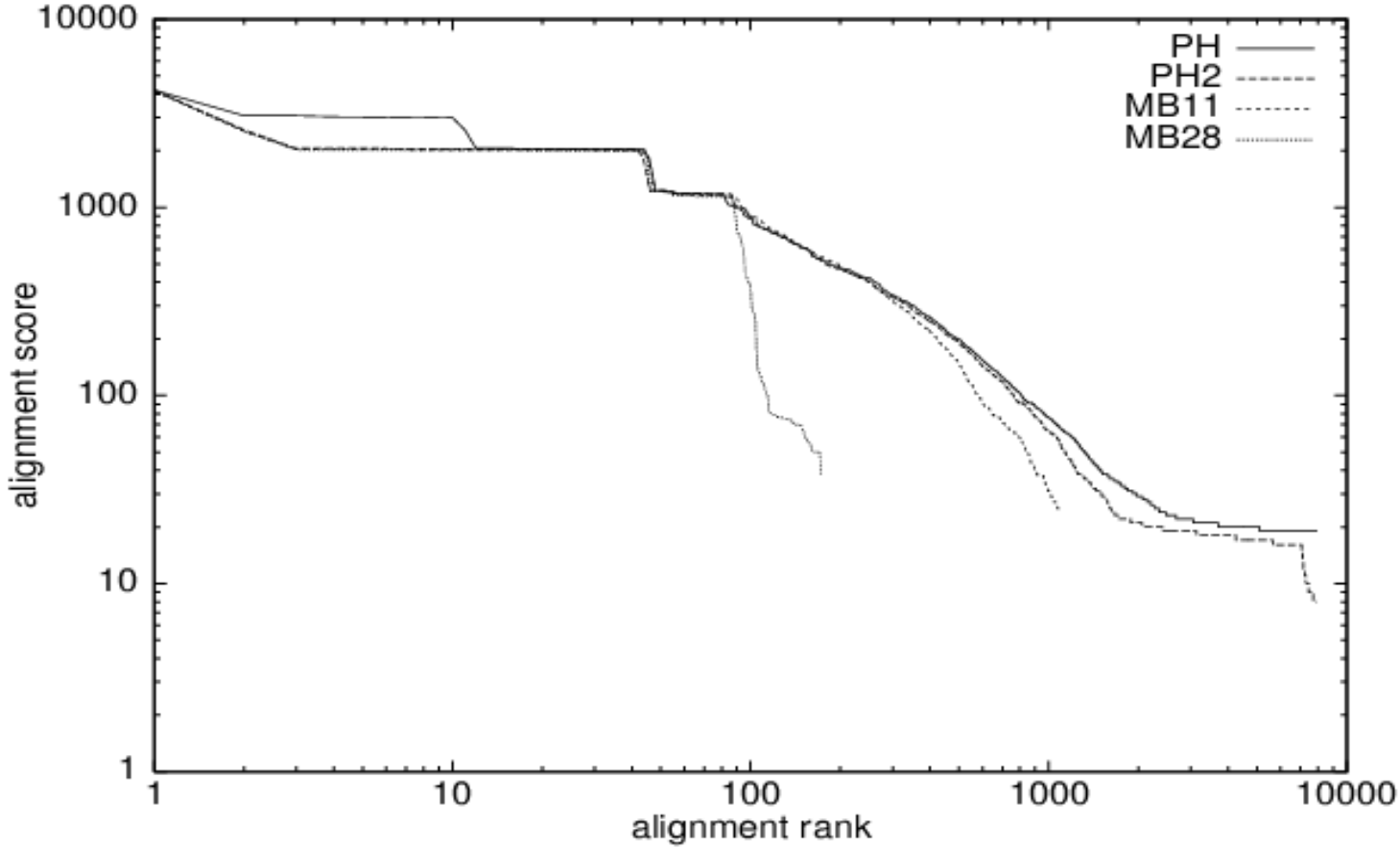


Figure 4: Input: *H. influenza* and *E. coli*. Run times are shown in Figure 7. Score is plotted as a function of the rank of the alignment, with both axes logarithmic. MegaBlast (MB28) misses over 700 alignments

Suboptimální nasazení programu BLAST

Použití:

Hledání primerů pro sekvenování a PCR (10-40bp) nebo oligonukleotidů pro microarray (25-100bp)

Problém:

BLAST prohledává DNA se slovy o velikosti 7 a víc. Při použití extrémně krátkých slov nalézá příliš velký počet irelevantních podobností a jejich spracování trvá neúnosně dlouho. Bez předpočítaného indexu a filtrace je hledání velkého počtu podobností pomalé.

Řešení:

Použití programu PRIMEX

Primex

INDEX — 4^w+ n -> 150Mbp (w=12) -> 167M (~650MB)

FILTRACE — **ACGAGATGACGA***TGACGATGCGAT*

DP (N-W) — Probíhá na omezeném vzorku sekvencí

Primex

ATAGTA*GGTCCG***TCGATA** 18 bp -> 3 slova po 6bp

nastavením *m1*=1 chyby na slovo nalezneme spolehlivě v nejhorším

GTATTA*GGTACG***TTGACA** i řetězec s 5 chybami

Sekvence se 6 chybami už nemusí být nalezena:

GTATTA*GATACG***TTGACA** **nenalezena**

GTATTA*GGTACG***TTGACG** **nalezena**

Rozdělení vyhledávacího řetězce na menší segmenty urychlí výpočty tím, že u kratších lze efektivně využít rychlého indexu celé genomové databázy.

Primex

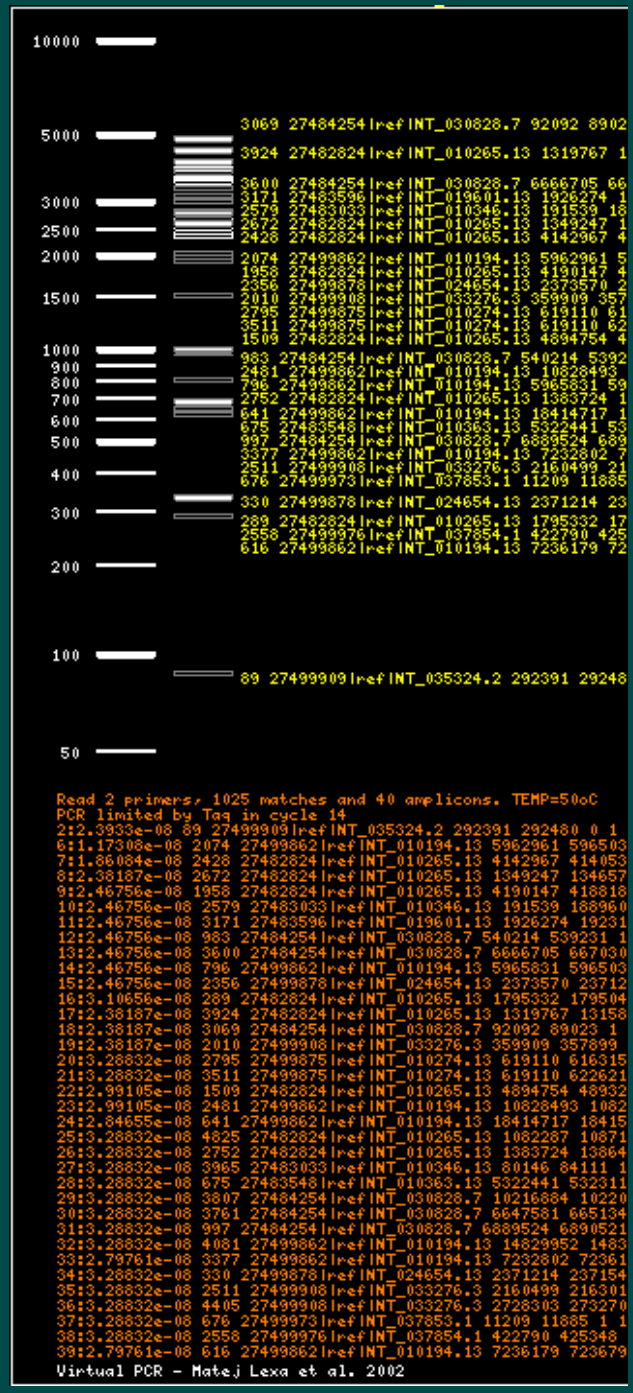
		MISMATCHES						
PROGRAM	TOTAL	0	1	2	3	4	5	6	SEARCH TIME
BLAST	162	1	0						12 s
BLAST-O	2	1							5 s
FASTA	72	1	0	4	13	23	17	12	53 s
FASTA-O	1	1							19 s
BLAT	0	0							80 s
SSAHA	0	0							71 s
SSAHA-O	3	1							10 s
CGC FP-O	1	1							10 s
EMBOSS	983	1	0	5	104	86	8		18 s
EMBOSS-O	1	1							14 s
TACG	1	1							49 s
AGREP	1204	1	0	5	100	779	3632		34 s
AGREP	1	1							2 s
PRIMEX	214	1	0	14	199				56 s
PRIMEX-S (2,5)	12140	1	0	14	199	1686	10240		19 s
PRIMEX-S (2,4)	1900	1	0	14	199	1686			4 s
PRIMEX-S (2,3)	214	1	0	14	199				1 s
PRIMEX-S (2,2)	15	1	0	14					< 1 s
PRIMEX-S (2,1)	1	1	0						<< 1 s
PRIMEX-SO (0,0)	1	1							<< 1 s

Výkony vybraných vyhledávacích programů při hledání výskytu sekvence oligonukleotidu AAAAAATGATCAATTTACAT v genomu Arabidopsis thaliana (cca 100Mbp). Příponou -O jsou označeny programy, které byly nastaveny s nejmenší citlivostí. Přípona -S označuje programy, které v momentě dotazu běžely jako server.

Primex + Virtual PCR

Vyhledané oligonukleotidy lze použít pro simulaci PCR reakce

VPCR Virtual PCR



Suboptimální nasazení programu BLAST

Použití:

Hledání pozice intronů a exonů (srovnávání mRNA s genomovou DNA) nebo vyhledávání domén proteinů

Problém:

BLAST vyhodnocuje příliš mnoho podobností, i když nás zajímají jenom ty, které jsou typické pro RNA/DNA. Pokud to ošetříme zvýšením parametrů X a S, stratíme krátké podobnosti. Nesnaží se určit přesnou hranici intronů a exonů nebo domén.

Řešení:

Použití programu BLAT, SIM4

BLAT

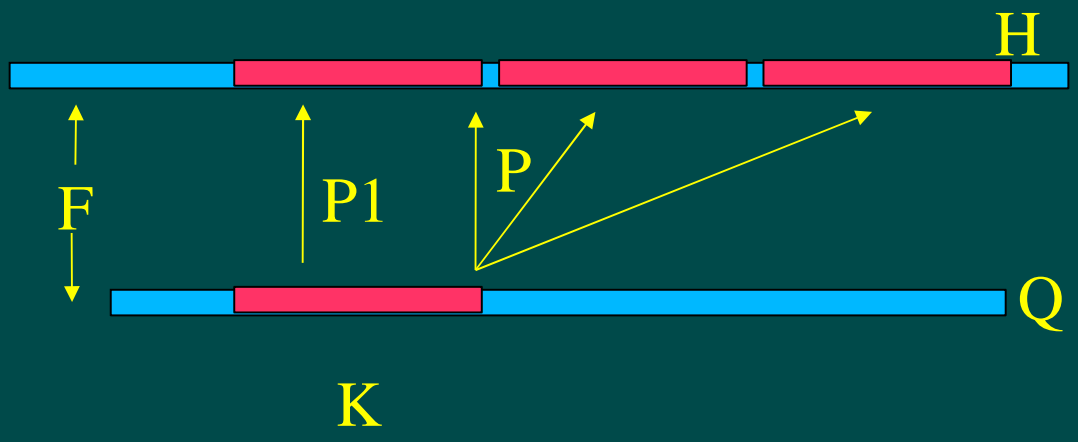
$P1 = M^K$

$T = int(H/K)$

$P = 1 - (1-P1)^T$

$P = 1 - (1-M^K)^T$

$F = (Q-K+1)*(G/K)*(1/A)^K$



P1 – pravdepodonost shody s k-merem
P – pravdepodobnost existence aspon jedne takove shody
F – pravdepodobnost nahodneho vyskytu shody mezi H a Q
K – délka k-meru
H – délka úseku podobnosti (několik 100 bp)
M – zhoda mezi sekvencemi (%identity/100)
G – velikost databázy
Q – velikost vyhledávací sekvence
A – velikost abecedy

BLAT

Table 3. Sensitivity and Specificity of Single Perfect Nucleotide K-mer Matches as a Search Criterion

		7	8	9	10	11	12	13	14
A.	81%	0.974	0.915	0.833	0.726	0.607	0.486	0.373	0.314
	83%	0.988	0.953	0.897	0.815	0.711	0.595	0.478	0.415
	85%	0.996	0.978	0.945	0.888	0.808	0.707	0.594	0.532
	87%	0.999	0.992	0.975	0.942	0.888	0.811	0.714	0.659
	89%	1.000	0.998	0.991	0.976	0.946	0.897	0.824	0.782
	91%	1.000	1.000	0.998	0.993	0.981	0.956	0.912	0.886
	93%	1.000	1.000	1.000	0.999	0.995	0.987	0.968	0.957
	95%	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.998	0.994	0.991
	97%	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999

B.	K	7	8	9	10	11	12	13	14
	F	1.3e+07	2.9e+06	635783	143051	32512	7451	1719	399

(*A*) Columns are for K sizes of 7–14. Rows represent various percentage identities between the homologous sequences. The table entries show the fraction of homologies detected as calculated from equation 3 assuming a homologous region of 100 bases. The larger the value of K, the fewer homologies are detected.

(*B*) K represents the size of the perfect match. F shows how many perfect matches of this size expected to occur by chance according to equation 4 in a genome of 3 billion bases using a query of 500 bases.

BLAT

Table 5. Sensitivity and Specificity of Single Near-Perfect (One Mismatch Allowed) Nucleotide K-mer Matches as a Search Criterion

	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
A. 81%	0.945	0.880	0.831	0.721	0.657	0.526	0.465	0.408	0.356	0.255	0.218
83%	0.975	0.936	0.904	0.820	0.770	0.649	0.591	0.535	0.480	0.361	0.318
85%	0.991	0.971	0.954	0.900	0.865	0.767	0.719	0.669	0.619	0.490	0.445
87%	0.997	0.990	0.983	0.954	0.935	0.867	0.833	0.796	0.757	0.634	0.591
89%	1.000	0.997	0.995	0.984	0.976	0.939	0.920	0.897	0.872	0.775	0.741
91%	1.000	1.000	0.999	0.996	0.994	0.979	0.971	0.962	0.950	0.890	0.869
93%	1.000	1.000	1.000	0.999	0.999	0.996	0.994	0.991	0.988	0.963	0.954
95%	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.999	0.999	0.994	0.992
97%	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

B. K	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
F	275671	68775	17163	4284	1070	267	67	17	4.2	1.0	0.3

(*A*) Columns are for K sizes of 12–22. Rows represent various percentage identities between the homologous sequences. The table entries show the fraction of homologies detected as calculated by equation 6 assuming a homologous region of 100 bases. (*B*) K represents the size of the near-perfect match. F shows how many perfect matches of this size expected to occur by chance according to equation 7 in a genome of 3 billion bases using a query of 500 bases.

BLAT

Table 7. Sensitivity and Specificity of Multiple (2 and 3) Perfect Nucleotide K-mer Matches as a Search Criterion

	2,8	2,9	2,10	2,11	2,12	3,8	3,9	3,10	3,11	3,12
A. 81%	0.681	0.508	0.348	0.220	0.129	0.389	0.221	0.112	0.051	0.021
83%	0.790	0.638	0.475	0.326	0.208	0.529	0.339	0.193	0.099	0.045
85%	0.879	0.762	0.615	0.460	0.318	0.676	0.487	0.313	0.180	0.093
87%	0.942	0.866	0.752	0.611	0.461	0.809	0.649	0.470	0.305	0.177
89%	0.978	0.940	0.868	0.761	0.625	0.910	0.801	0.648	0.476	0.314
91%	0.994	0.980	0.947	0.884	0.787	0.969	0.914	0.815	0.673	0.505
93%	0.999	0.996	0.986	0.962	0.912	0.993	0.976	0.933	0.851	0.722
95%	1.000	1.000	0.998	0.993	0.979	0.999	0.997	0.987	0.961	0.902
97%	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	0.999	0.997	0.987

B. N,K	2,8	2,9	2,10	2,11	2,12	3,8	3,9	3,10	3,11	3,12
F	524	27	1.4	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0

(*A*) Columns are for N sizes of 2 and 3 and K sizes of 8–12. Rows represent various percentage identities between the homologous sequences. The table entries show the fraction of homologies detected as calculated by equation 10. (*B*) N and K represent the number and size of the near-perfect matches, respectively. F shows how many perfect clustered matches expected to occur by chance according to equation 14 in a translated genome of 3 billion bases using a query of 167 amino acids.

Suboptimální nasazení programu BLAST

Použití:

Hledání podobnosti mezi extrémně dlouhými sekvencemi

Problém:

BLAST jde rovnou na věc a hledá všechny HSP

Řešení:

Použití programů s indexy, které přistupují k analýze hierarchicky, nejprve rychle vyhledávají s nízkou citlivostí, později dopočítávají detaily (SSAHA, BLAT, MUMER)

Suboptimální nasazení programu BLAST

Použití:

Hledání podobnosti mezi vzdálenými proteinovými sekvencemi

Problém:

Proteiny jsou třírozměrné a jejich struktura a funkce Často závisí na prostorově se doplňujících motivech sekvence a ne na existenci dlouhého lineárního řetězce aminokyselin

Řešení:

Použití programů, které nepracují s podobností na bázi Smith-Waterman, ale analyzují např. výskyt krátkých slov (PSST)

PSST

Struktura sekvence znázorněna vektorem přítomnosti jednotlivých “slov” v=(1,0,0,1,....,1), kde každá pozice odpovídá určitému “slovu”. p_i je normalizovaná frekvence výskytu daného slova a podobnost

$$S(q,t) = \text{suma}\ (q_i * t_i * 1/p_i)$$

Vektory proteinů bez jakékoliv společné podsekvence na dané úrovni jsou ortogonální, S(q,t)=0.

Pro identické proteiny S(q,q)= suma($1/p_i$). Pokud by všechny slova měla stejnou pravděpodobnost výskytu, pak by to bylo

N*(1/N) = 1

kde N je počet sledovaných nebo existujících slov.