“实用生物信息技术”课程小组讨论总结报告

组：G3　次：R5　组长：陈伟辉　执笔：陶益可

一、时间 2026 年 5 月 13 日星期三

二、方式 面对面交流

三、主题 课后复习与组内互助

四、内容

(1) TBtools 相关内容简介

① 相关文献搜索

(2) TBtools 数据库使用练习

① 基因家族验证

② HMM 初筛 ＋SwissProt 验证

③ 系统发生树

④ 启动子顺式作用元件

⑤ 简单构建系统发生树

(3) 问题

（1）TBtools 相关内容简介

① 相关文献搜索

其主要特点是：(1）用户友好的操作界面和高兼容性（跨平台，兼容不同操作系统）；（2）统一的功能使用逻辑，即 IOS(Input-Output-Start，输入-输出-启动）；（3）全面的多功能集成，覆盖了绝大多数日常生信数据解读需要;(4）独立自主研发的绘图引擎);(5）强大的数据交互功能，可以实现点击实时响应，悬停菜单，元件编辑等功能；（6）庞大的用户和开发者互助社群。

（2）TBtools 数据库使用练习

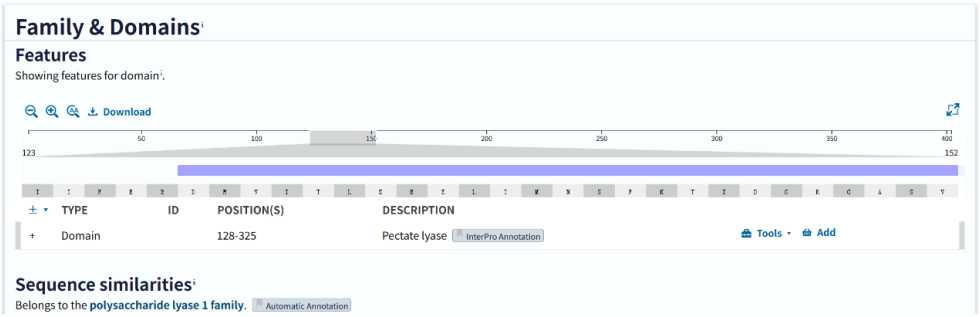
① 基因家族验证

A、基于序列的筛选

已知：经初步的转录组&蛋白质组数据分析筛选，获得候选基因，UniProt 蛋白质数据库查询该蛋白序列包含果胶裂解酶（Pectate lyase，简称 PL）的 Domain;该序列为机器注释，下面将结合 TBtools

进一步确定其家族；

已。通过 TPIA 网站，下载了 LJ43（龙井 43）作为研究物种参考蛋白质组数据源；**shuyunzaov2.0** 参考基因组作为近缘数据源；通过 Ensembl Plants 数据库，下载了拟南芥 11 参考蛋白质组作植物传统模式生物数据源;通过 Ensembl Plants 数据库下载多年生木本植物模式生物 Populus trichocarpa v4.1 蛋白质组数据源



原理：在上述四个蛋白序列数据组中搜索与茶树 PL 蛋白相似的蛋白序列。然后将这些蛋白放到已下载本地 swissprot 数据库中通过 TBtools 的 Blastp 进行验证。共有 2 步：

a .将茶树 PL 蛋白序列比对到拟南芥的蛋白序列中；

如图设置 Query Seqs（茶树 PL 蛋白序列）、设置 LJ43 蛋白序列、设置输出文件；

操作：搜索 Two Sequence Files 插件进入➞输入茶树 PL 蛋白序列、LJ43 蛋白序列➞输出文件（文件名.xls）➞参数设置为 Outfmt：Table、NumofHits：50，其余参数不变➞点击 Start 运行程序。

打开输出结果（round1_blast_At_to_Gm.xls）➞选中 sbject 列➞数据➞删除重复值➞以当前选定区域排序➞删除重复项，接下来的弹窗点确定即可，基因号就是候选基因，使用 Fasta Extract (Recommended)插件提取 LJ43 蛋白序列。输入 Lj43 所有蛋白序列，设置输出文件（文件名.pep），输入上述蛋白 ID；Start 运行程序；得到第一轮 LJ43 蛋白结果。

```
# BLASTP 2.12.0+
# Query: PL-Target-domain
# Database: LJ43.protein.TBtoolsDB
# Fields: query acc.ver, subject ac
# 22 hits found
PL-Target-domain    GWHPACFB004003
PL-Target-domain    GWHPACFB013903
PL-Target-domain    GWHPACFB015116
PL-Target-domain    GWHPACFB005097
PL-Target-domain    GWHPACFB026056
PL-Target-domain    GWHPACFB017970
PL-Target-domain    GWHPACFB003317
PL-Target-domain    GWHPACFB024623
PL-Target-domain    GWHPACFB017086
PL-Target-domain    GWHPACFB029055
PL-Target-domain    GWHPACFB000238
PL-Target-domain    GWHPACFB014044
PL-Target-domain    GWHPACFB020922
PL-Target-domain    GWHPACFB006493
PL-Target-domain    GWHPACFB015024
PL-Target-domain    GWHPACFB022027
PL-Target-domain    GWHPACFB002341
PL-Target-domain    GWHPACFB013511
PL-Target-domain    GWHPACFB013512
PL-Target-domain    GWHPACFB023503
PL-Target-domain    GWHPACFB003176
PL-Target-domain    GWHPACFB013508
# BLAST processed 1 queries
```

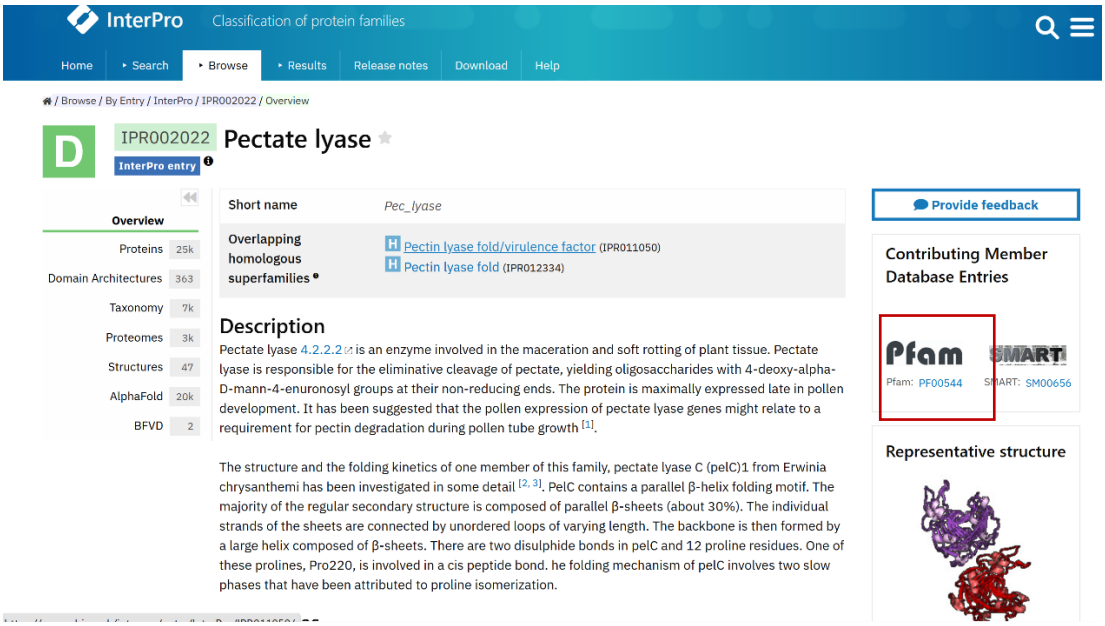
（①PL Domain 比对到 LJ43.pep）

A	B	C
GWHPACFB000238	lyase(20)	pectate(19
GWHPACFB002341	lyase(20)	pectate(17
GWHPACFB003176	lyase(20)	pectate(16
GWHPACFB003317	lyase(20)	pectate(19
GWHPACFB004003	lyase(20)	pectate(19
GWHPACFB005097	lyase(20)	pectate(19
GWHPACFB006493	lyase(20)	pectate(17
GWHPACFB013508	lyase(20)	pectate(17
GWHPACFB013511	lyase(20)	pectate(17
GWHPACFB013512	lyase(20)	pectate(17
GWHPACFB013903	lyase(20)	pectate(19
GWHPACFB014044	lyase(20)	pectate(17
GWHPACFB015024	lyase(20)	pectate(17
GWHPACFB015116	lyase(20)	pectate(19
GWHPACFB017086	lyase(20)	pectate(19
GWHPACFB017970	lyase(20)	pectate(19
GWHPACFB020922	lyase(20)	pectate(17
GWHPACFB022027	lyase(20)	pectate(18
GWHPACFB023503	lyase(20)	pectate(13
GWHPACFB024623	lyase(20)	pectate(19
GWHPACFB026056	lyase(20)	pectate(19
GWHPACFB029055	lyase(20)	pectate(19

（①结果比对 SwissPort）

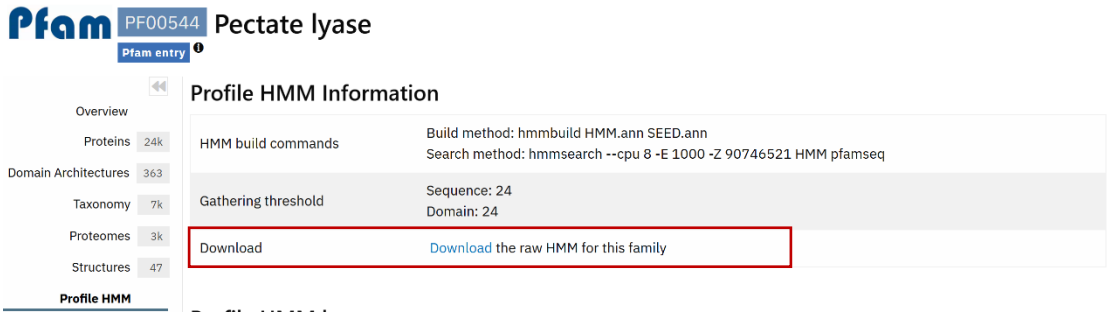
b.将上述第一轮蛋白序列作为 query，比对到下载到本地的 Swissprot 蛋白数据库中，与（上述的操作大致相同；**注意输出文件的尾缀名为 xml**。Outfmt 参数：BlastXML，其余参数不变，然后使用 Blast XML to Table 插件将上述 xml 输出文件转换为 Summary 格式的表格文件 xls。

打开此输出文件，进行人工筛选。主要看表格中的 B（属性）列和 C 列（功能），如果此 2 列不能确定，可以参考 D 列（注释）。所得筛选结果初步候选。



B. **HMM 初筛 ＋SwissProt 验证**

通过 TPIA 网站，下载了 LJ43 作为研究物种参考蛋白质组数据及 gff 文件；shuyunzaov2.0 参考基因组作为近缘数据 gff 文件；通过 Ensembl Plants 数据库，下载了拟南芥 11 参考蛋白质组作植物传统模式生物数据 gff 文件；通过 Ensembl Plants 数据库下载多年生木本植物模式生物 Populus trichocarpa v4.1 蛋白质组数据 gff 文件，已知该候选蛋白已被 UniProt 蛋白序列数据列 Pfam 数据库（版本号）”下载 HMM 模型，检索 PF（PL Domain 编号）保存文本，作为结构域鉴定标准。



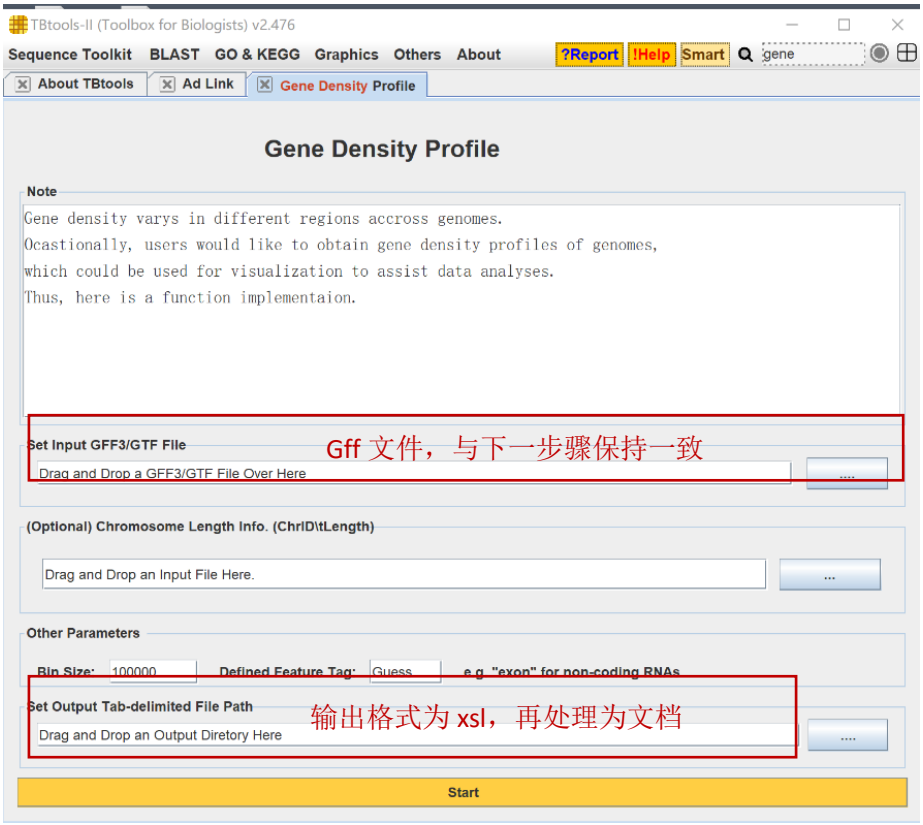
在标准流程中，这两个步骤是环环相扣的。

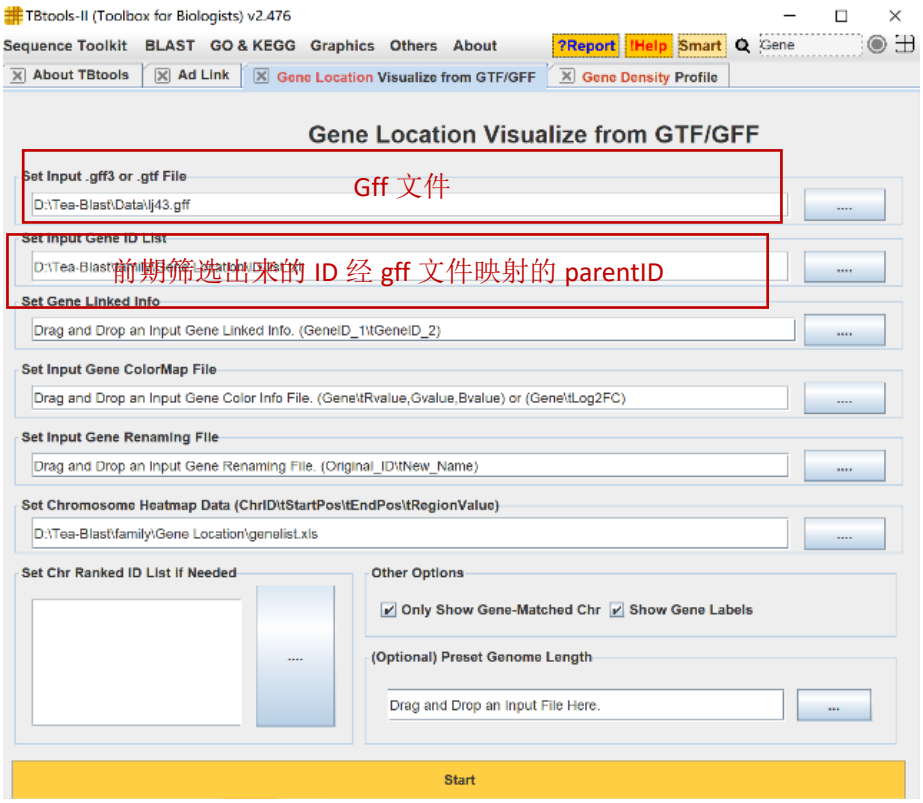
a. **初筛（HMM 扫描）**：你下载的**杨树全蛋白组**作为“检索列表”，下载的 **HMM 模型**作为“检索条件”。一次 hmmsearch 就能初步获得一份候选基因名单。但这份名单是“根据模型特征的推测”，并不绝对可靠。

b. **精炼**：将 HMM 扫描获得的候选基因序列提交到 NCBI 的 CDD（Conserved Domain Database，保守结构域数据库），或使用 SMART（Simple Modular Architecture Research Tool，蛋白质结构域分析工具）等服务器进行在线分析。

c. **验证（SwissProt 比对）**：使用 **BLASTp** 工具，将上一步验证通过的候选蛋白序列，与 **SwissProt 数据库**中的所有蛋白进行比对。这一步主要是为了给这些序列“贴上”功能标签，得到高质量的注释信息

隐马尔可夫模型(HMM)下载 pfam 数据库归入到了 InterPro 数据库之中，下载方法如下：进入数据库，检索目标基因家族 Download - InterPro 选择并点击目标基因家族—点击左下角 Profile HMM→Download；3.打开检查 HMM 文件格式，必须把下载的 hmm 文件里 HMMER3/f 要换成 HMMER3/b（使筛选结果更完整可靠）

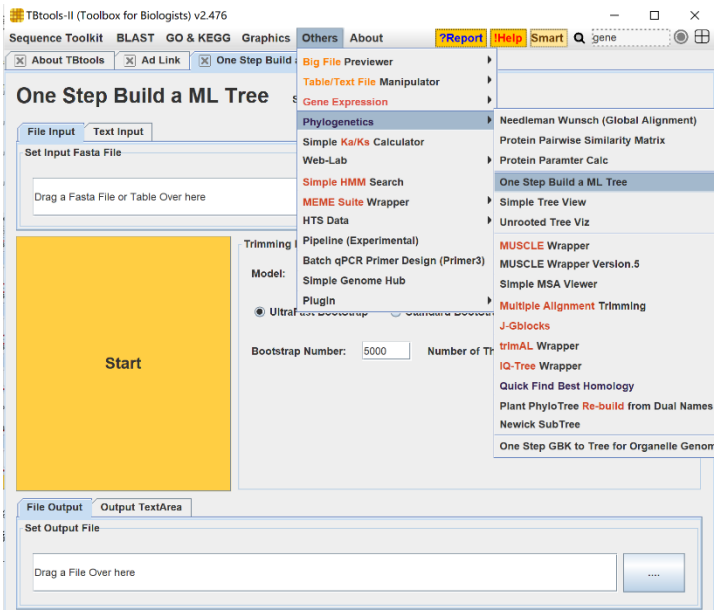


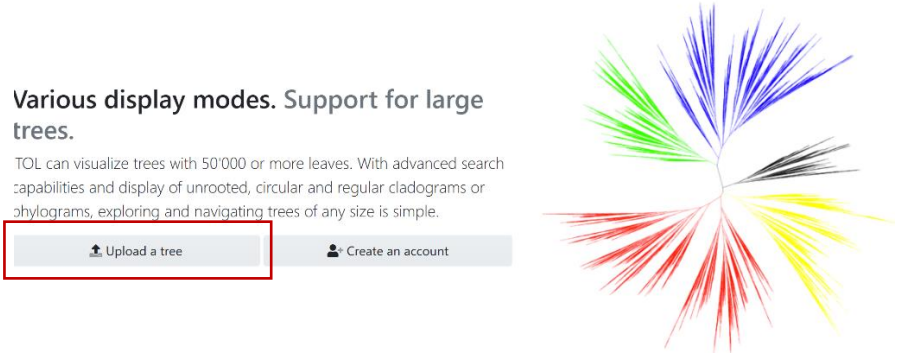


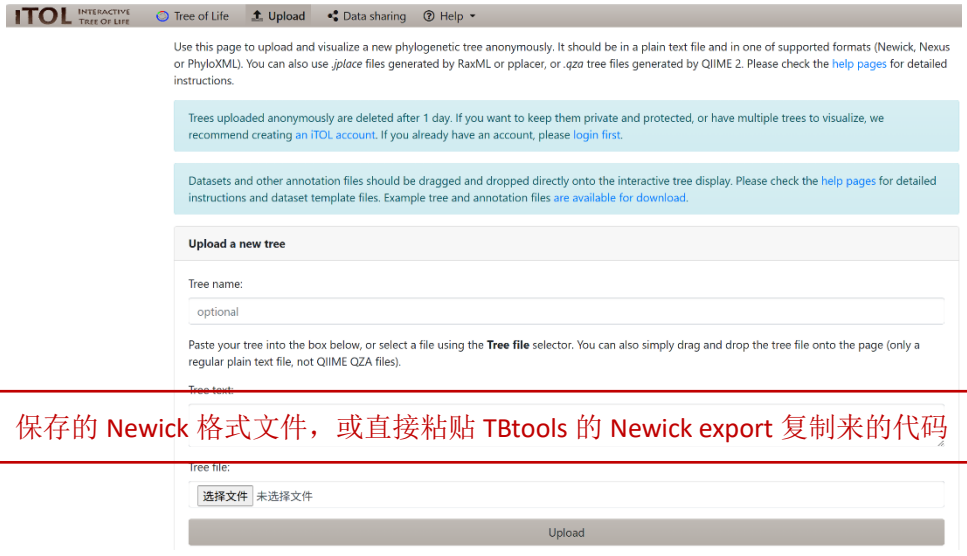
将得到的所有序列汇聚在同一文件中，命名为 All Sequences.fasta，以备后用。

C.系统发生树

打开 TBtools，找到构建系统发生树的位置：Others➞Phylogenetics➞One Step Build a ML Tree，“Set Inport Fasta File”拖入上述 All Sequences.fasta 文件，Bootstrp Number 设置为 1000，其余参数不变。结果保留 Newick 格式，iTol 平台（iTOL: Interactive Tree Of Life）进一步美化：

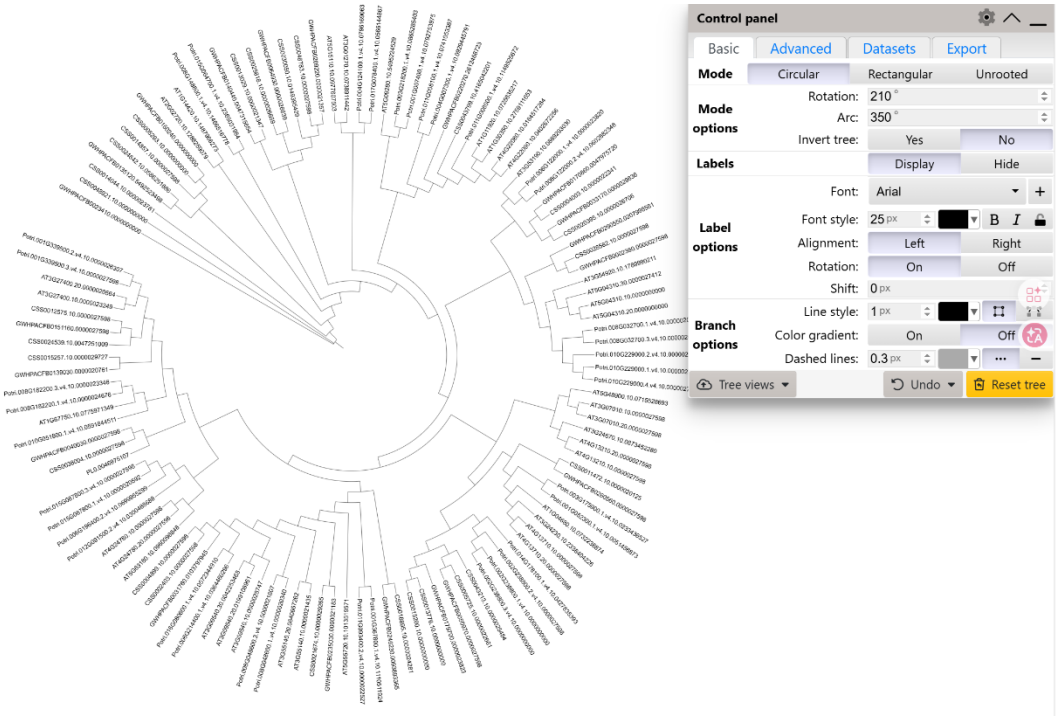




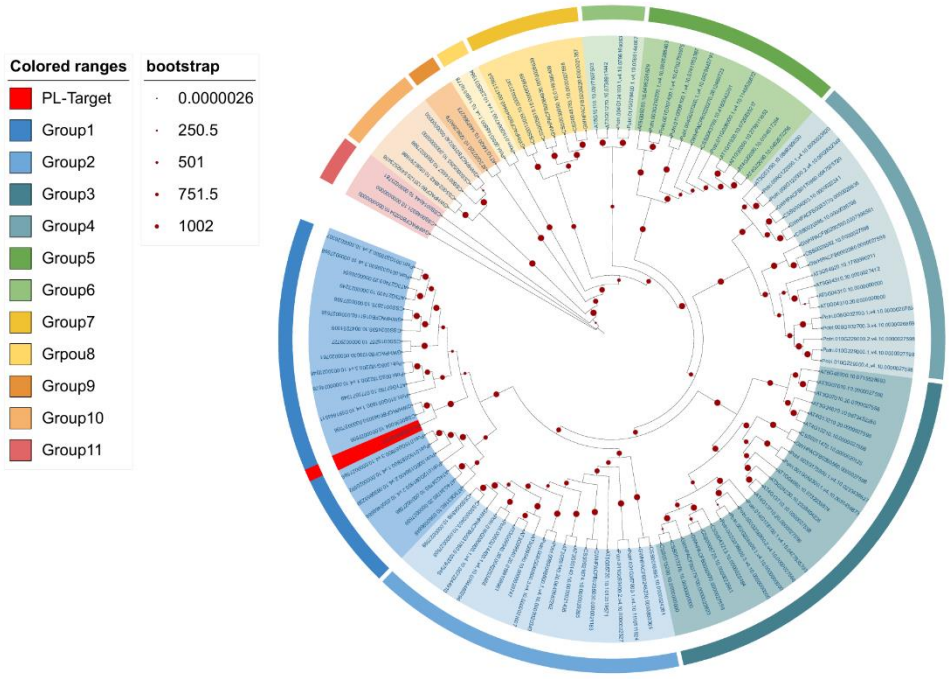


保存的 Newick 格式文件，或直接粘贴 TBtools 的 Newick export 复制来的代码

而后可根据个人需要进行美化，具体教程可线上搜索

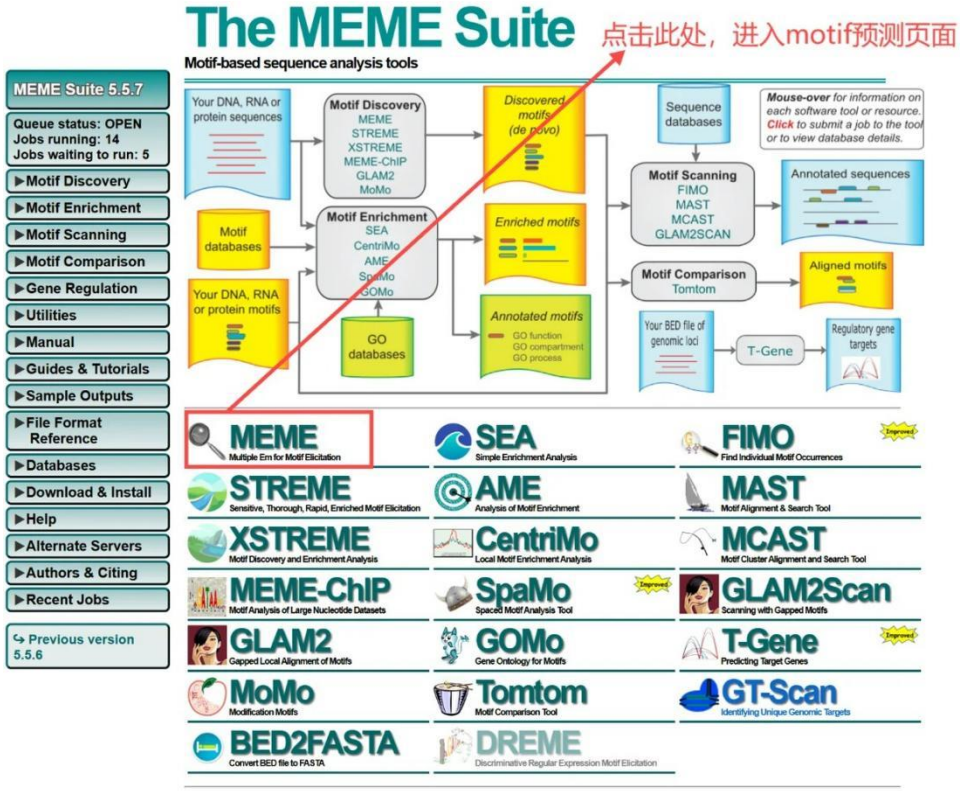


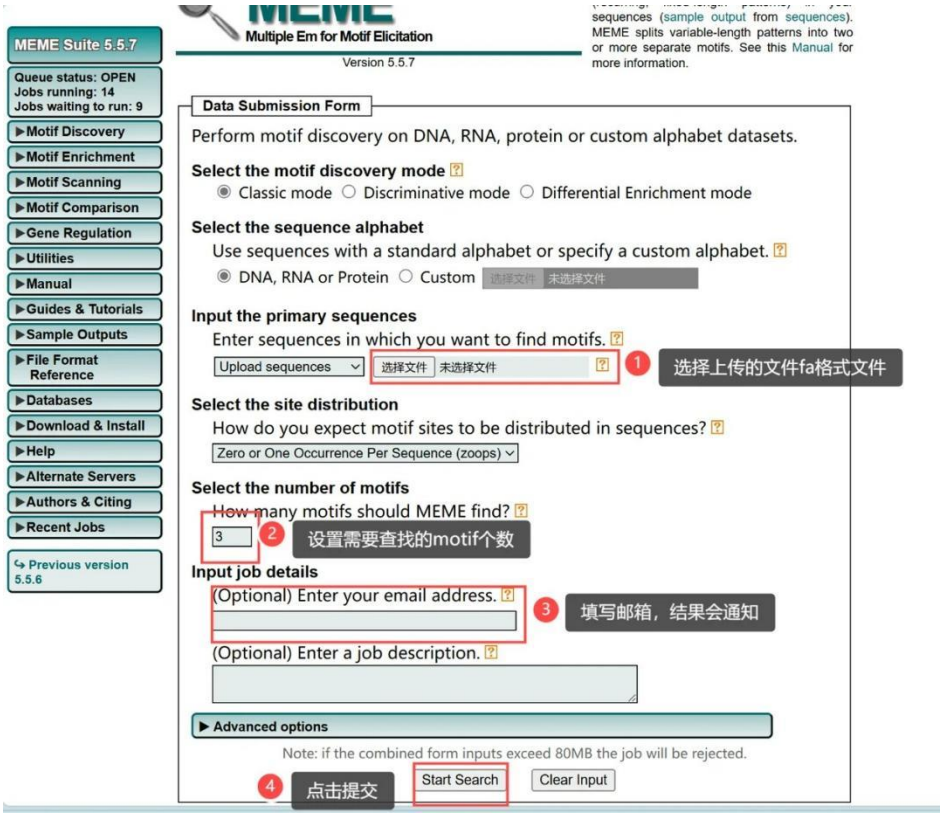
美化后的结果如图所示：



C. Motif 分析

首先我们需要使用 The MEME Suite 在线软件(https://meme-suite.org/meme/)进行 motifs 分析(图 2)，点击 MEME 模块后放入已筛选出来的基因家族成员蛋白序列并设置需要的 motifs 数量，一般在 5-10 个

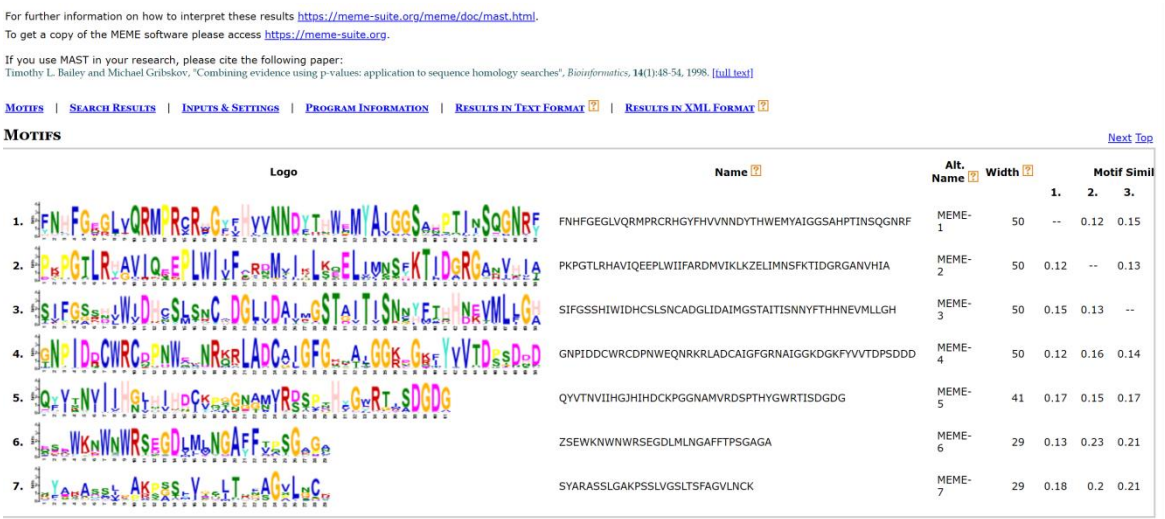




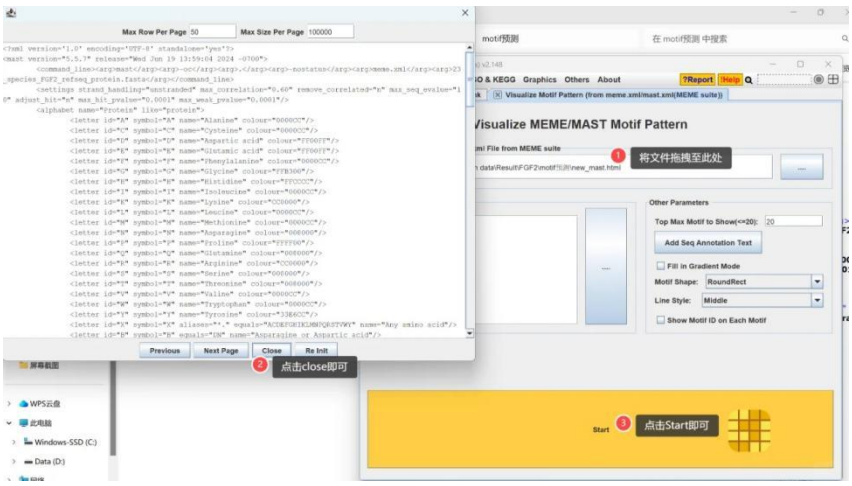
点击 start search 后需要等待一段时间，待结果出来之后我们主要使用第一个和第五个链接。第一个链接主要包含分析出来的 motifs logo 和结构域可视化信息，这里的信息都可以进行导出，

第五个链接点击右键后下载链接文件，利用 TBtools 的 MEME 可视化模块进行数据分析。

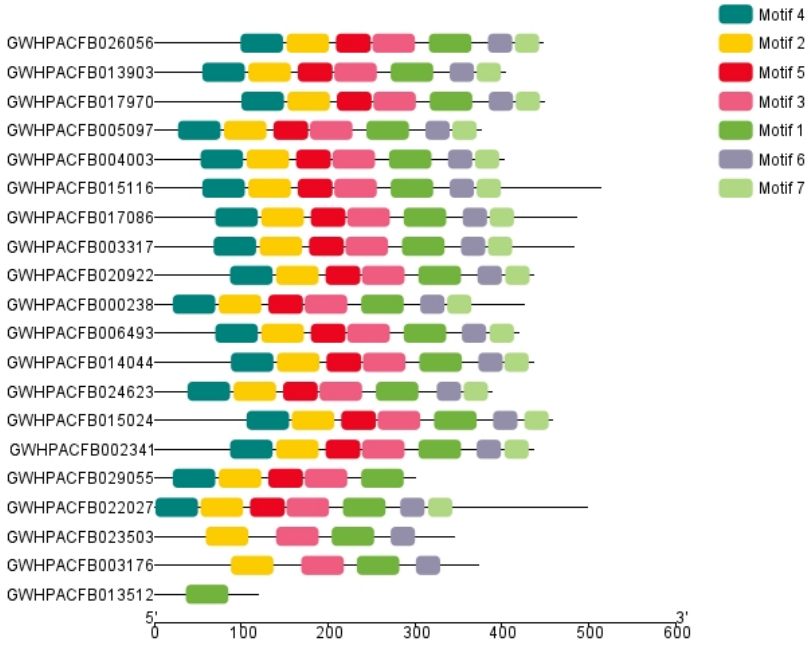
Meme 结果：



分别放入下载的 MEME 链接文件和基因家族成员原始 id

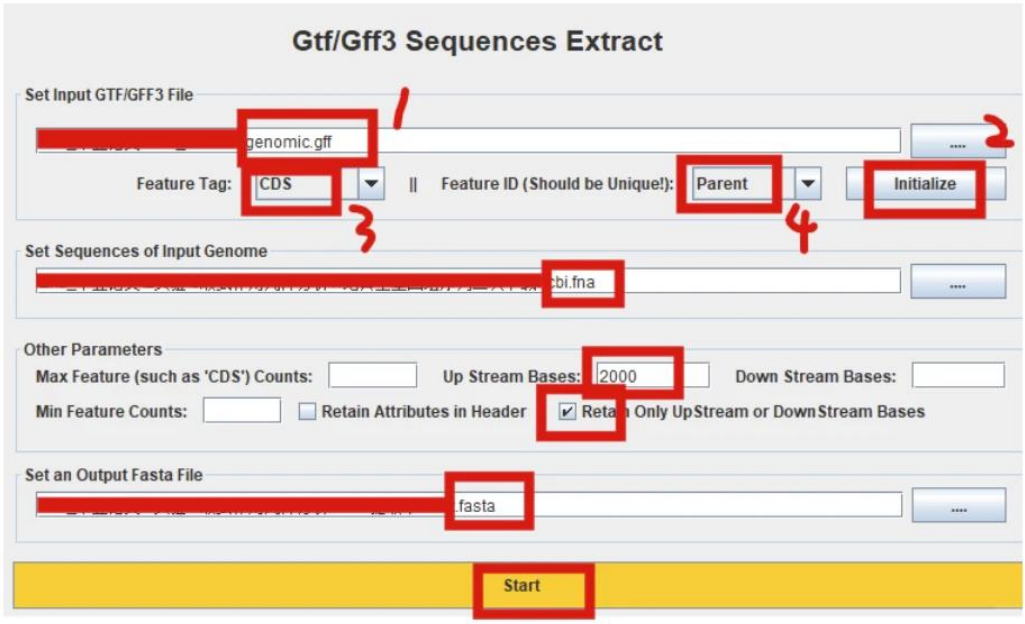


得到结果：进行美化处理



D. 启动子顺式作用元件分析

找到基因 ATG 翻译起始位点上游截取 2000bp 启动子序列（常用长度）进入官网：http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/，点击 Search a sequence，粘贴启动子 FASTA 序列，直接提交，等待结果，下拉找到所有顺式元件列表，导出数据：复制元件名称、起始位置、终止位置、功能，粘贴到 Excel 整理



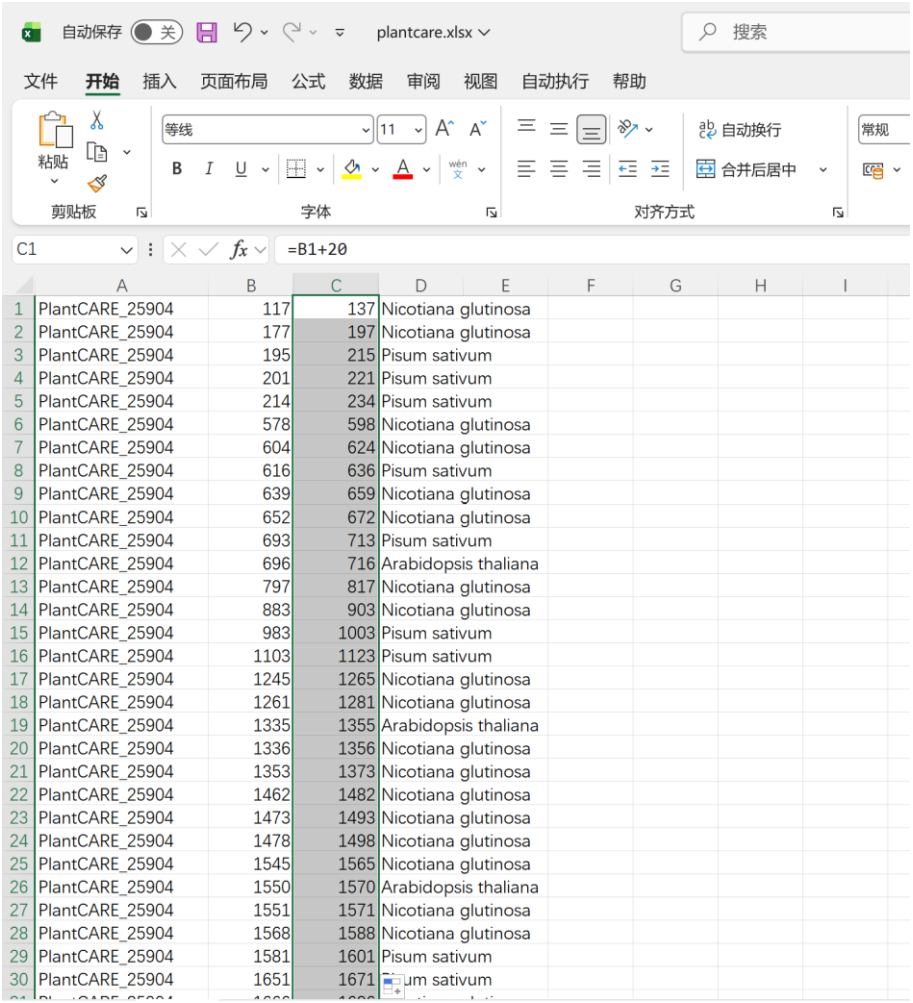
数据筛选：

a. 第二列（顺式作用元件名称）：空白、CAAT-box、TATA-box（不包括带前后缀的行）和 Unnamed_n 行删除

b. 第八列（功能描述）中的空白行删掉

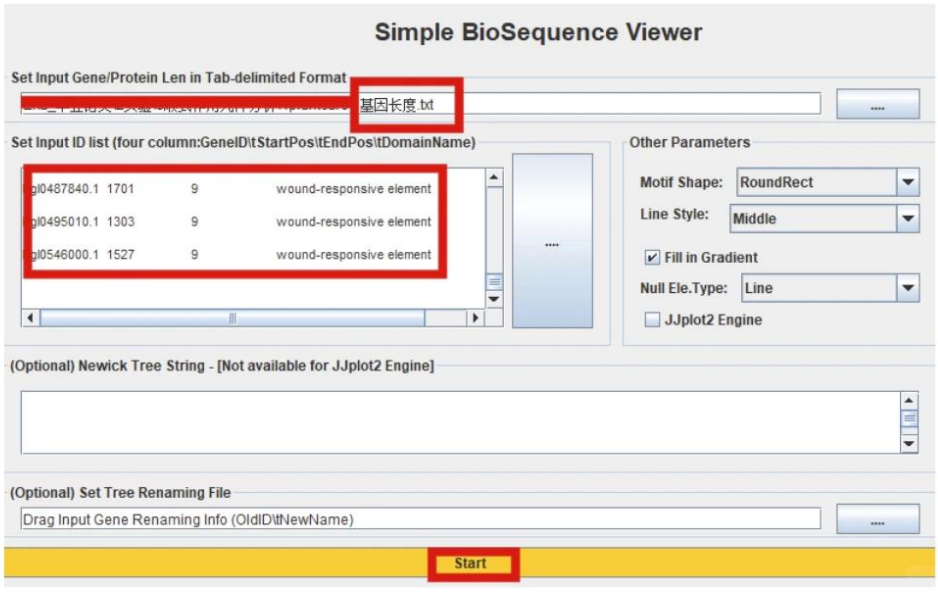
c. 第二列、第三列（顺式作用元件序列）、第六列（链方向）与第七列（物种名）删除

d. 基因起始位置（原第四列）与终止位置（原第五列）数值进行外理（起始位置：原第四列数值-20.终正位置：原第五列数值+20）



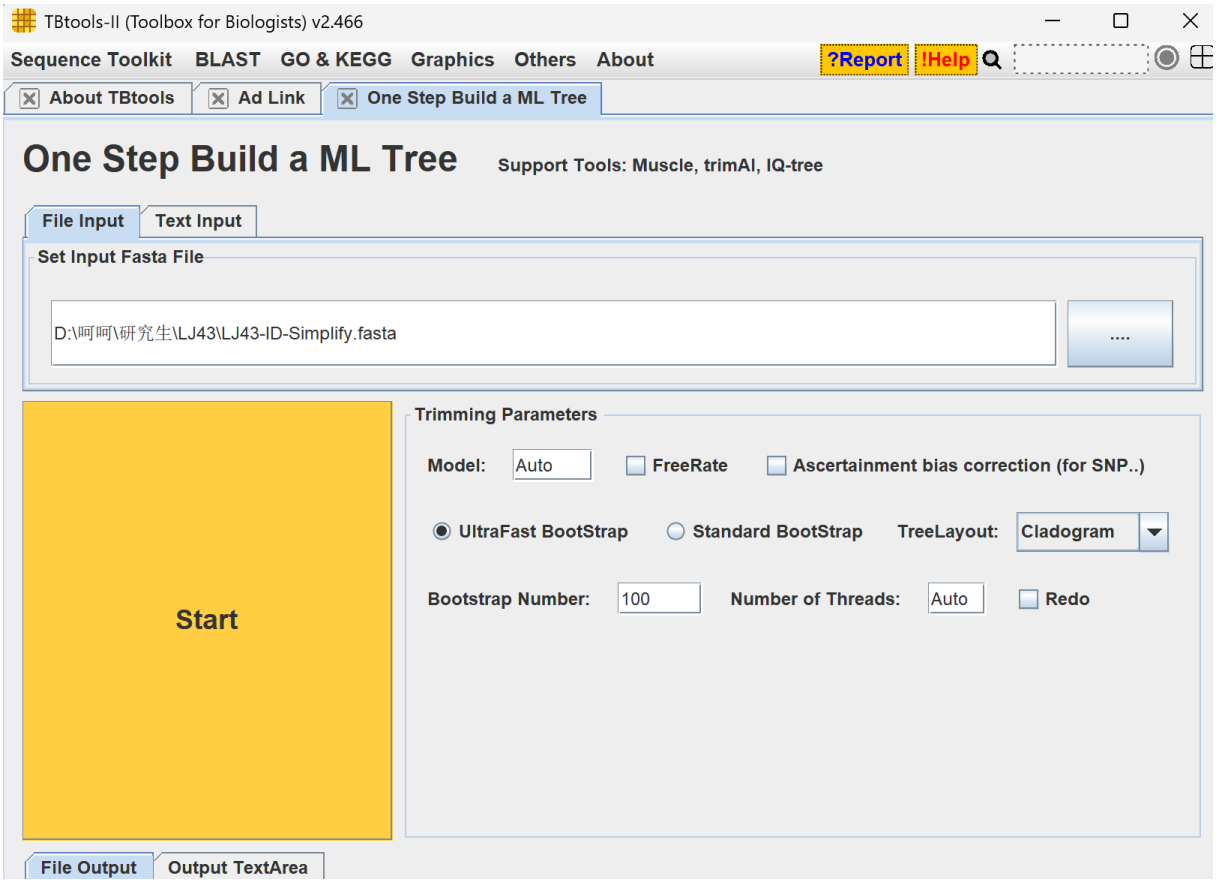
	A	B	C	D	E
1	PlantCARE_25904	117	137	Nicotiana glutinosa	
2	PlantCARE_25904	177	197	Nicotiana glutinosa	
3	PlantCARE_25904	195	215	Pisum sativum	
4	PlantCARE_25904	201	221	Pisum sativum	
5	PlantCARE_25904	214	234	Pisum sativum	
6	PlantCARE_25904	578	598	Nicotiana glutinosa	
7	PlantCARE_25904	604	624	Nicotiana glutinosa	
8	PlantCARE_25904	616	636	Pisum sativum	
9	PlantCARE_25904	639	659	Nicotiana glutinosa	
10	PlantCARE_25904	652	672	Nicotiana glutinosa	
11	PlantCARE_25904	693	713	Pisum sativum	
12	PlantCARE_25904	696	716	Arabidopsis thaliana	
13	PlantCARE_25904	797	817	Nicotiana glutinosa	
14	PlantCARE_25904	883	903	Nicotiana glutinosa	
15	PlantCARE_25904	983	1003	Pisum sativum	
16	PlantCARE_25904	1103	1123	Pisum sativum	
17	PlantCARE_25904	1245	1265	Nicotiana glutinosa	
18	PlantCARE_25904	1261	1281	Nicotiana glutinosa	
19	PlantCARE_25904	1335	1355	Arabidopsis thaliana	
20	PlantCARE_25904	1336	1356	Nicotiana glutinosa	
21	PlantCARE_25904	1353	1373	Nicotiana glutinosa	
22	PlantCARE_25904	1462	1482	Nicotiana glutinosa	
23	PlantCARE_25904	1473	1493	Nicotiana glutinosa	
24	PlantCARE_25904	1478	1498	Nicotiana glutinosa	
25	PlantCARE_25904	1545	1565	Nicotiana glutinosa	
26	PlantCARE_25904	1550	1570	Arabidopsis thaliana	
27	PlantCARE_25904	1551	1571	Nicotiana glutinosa	
28	PlantCARE_25904	1568	1588	Nicotiana glutinosa	
29	PlantCARE_25904	1581	1601	Pisum sativum	
30	PlantCARE_25904	1651	1671	um sativum	

e. 再准备一个序列长度文件.txt（筛到的顺式作用元件+都写 2000 的一列）。然后使用 MEGA11 软件打开基因家族蛋白序列，选择 Data-Phylogenetic Analysis，然后在软件主页面中，选择 NJ 法建树，点击 File，选择 Export Current Tree 点击 File ,save ，输出文件名 Newick Export.nwk，将这一串结果粘贴进 TBtools。



E. 简单构建进化树

TBtools 直接一键建树。顶部搜索：Phylogenetic ，选择 Neighbor-Joining (NJ) Tree，Input Alignment File：选刚才生成的 align.fasta，Bootstrap: 1000（检验可信度，必须开），点 Run → 等待完成（1–5 分钟）



TBtools 进行进化树的构建相较 MEGA 更快，但是同时也存在缺陷就是其大多数数据处理方法是内设的方法，参考了最常用可信度最大的参数，用户对于参数的调控选项较少，遇到特殊的情况需要使用其他的建树方法还是需要回到 MEGA 进行处理。

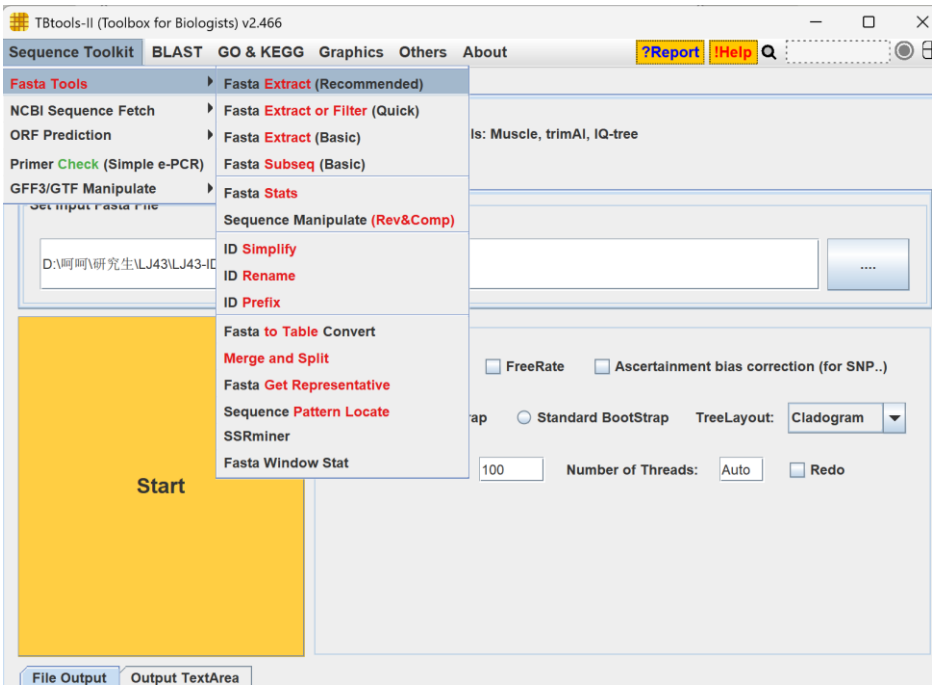
F. 从全基因组数据中找到目标序列

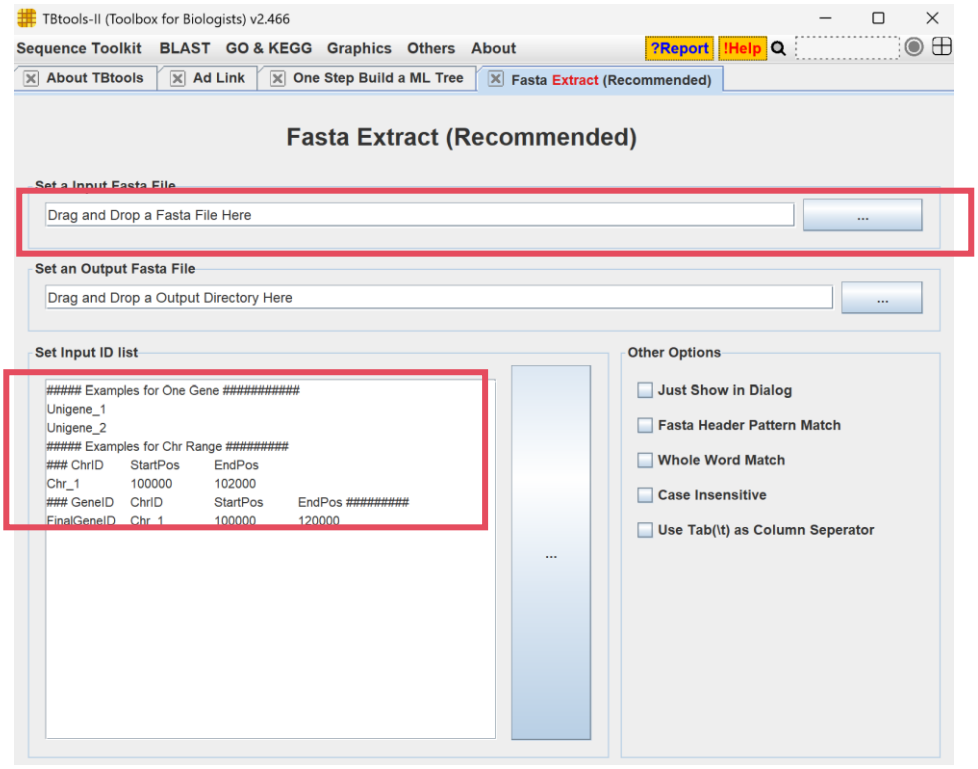
1.Fasta 序列文件输入文本框，用户可以直接拖拽硬盘中的 Fasta 文件并放置到文本框中，路径会自动获取；也可以点击跟随文本框的摁钮“...”，在弹出文件选择框中选取对应文件即可

2. Initialize 摁钮，在设置 Fasta 序列文件后，可以看到 Start 摁钮仍然不可点击。需要用户点击 Initialize 摁钮，创建 Fasta 序列索引文件（如前期已有，则会软件会自动复用，节省计算时间）

3. 输出文件设置文本框，用户同样可以拖拽放置文件或者文件夹，程序会自动获取输出文

件夹，用户需要补全一个输出文件名；当然也可以直接点击跟随文本框的摁钮，在弹出的选择框中设置对应输出文件即可





（3）问题

Q1：在使用软件过程中发现当文件过大或是序列过多的情况下会出现报错的问题，请问 TBtools 在进行分析时，是否有处理文件大小上限？

Q2：为什么使用 TBtools 的 One Step Build a ML Tree 功能模块构建系统发生树时会在跳出 Congratulations 后报错？