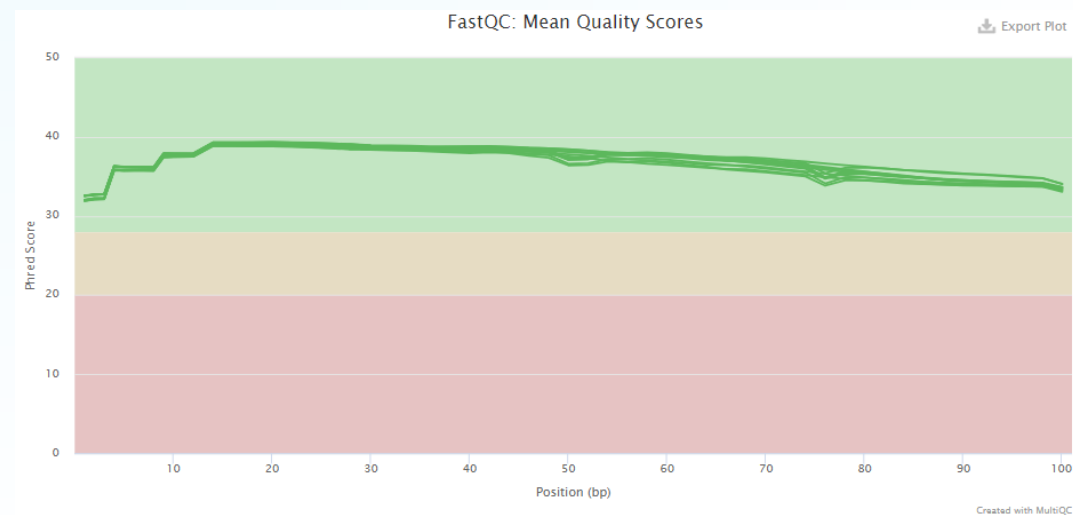
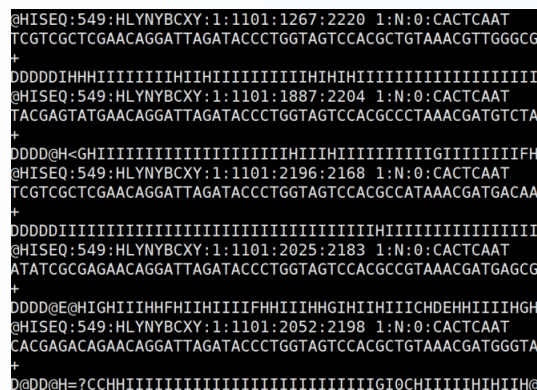




## 22质控和去宿主

易生信  
2023年7月22日





| ID       | WT6 | WT3 | OE4 | WT2  | OE3 | WT1 |
|----------|-----|-----|-----|------|-----|-----|
| OTU_265  | 18  | 18  | 6   | 11   | 20  | 15  |
| OTU_36   | 63  | 77  | 57  | 194  | 155 | 163 |
| OTU_102  | 20  | 44  | 18  | 77   | 18  | 43  |
| OTU_49   | 106 | 92  | 25  | 137  | 76  | 65  |
| OTU_270  | 9   | 5   | 22  | 5    | 22  | 5   |
| OTU_1865 |     | 0   | 3   | 0    | 0   | 2   |
| OTU_58   | 77  | 75  | 28  | 84   | 53  | 64  |
| OTU_1110 |     | 6   | 3   | 3    | 2   | 2   |
| OTU_30   | 100 | 142 | 78  | 111  | 124 | 145 |
| OTU_51   | 87  | 79  | 21  | 38   | 42  | 102 |
| OTU_1353 |     | 0   | 1   | 2    | 0   | 1   |
| OTU_1137 |     | 0   | 1   | 0    | 3   | 0   |
| OTU_18   | 166 | 150 | 126 | 318  | 130 | 265 |
| OTU_4    | 498 | 343 | 189 | 804  | 224 | 626 |
| OTU_3    | 459 | 690 | 340 | 1039 | 568 | 580 |
| OTU_704  | 3   | 14  | 12  | 8    | 9   | 4   |
| OTU_14   | 176 | 283 | 110 | 314  | 169 | 232 |

| Sample | berger_parker | buzas_gibson | chaol  |
|--------|---------------|--------------|--------|
| WT6    | 0.042         | 0.0381       | 1388.9 |
| WT3    | 0.0453        | 0.0425       | 1474.9 |
| OE4    | 0.0359        | 0.0414       | 1476.4 |
| WT2    | 0.0642        | 0.0244       | 1203.0 |
| OE5    | 0.0426        | 0.0396       | 1716.9 |
| WT1    | 0.0586        | 0.0293       | 1317.0 |
| WT4    | 0.0518        | 0.0359       | 1353.2 |
| OE5    | 0.0361        | 0.0441       | 1622.8 |
| OE2    | 0.0466        | 0.0472       | 1733.3 |
| OE6    | 0.0432        | 0.0523       | 1759.5 |
| WT5    | 0.0435        | 0.0252       | 1181.6 |
| OE1    | 0.0374        | 0.0524       | 1591.2 |
| K04    | 0.0558        | 0.0325       | 1474.1 |
| K01    | 0.0552        | 0.0409       | 1651.6 |
| K05    | 0.0732        | 0.025        | 1306.2 |
| K02    | 0.0509        | 0.0445       | 1675.3 |
| K03    | 0.0571        | 0.0329       | 1489.8 |
| K06    | 0.0518        | 0.0334       | 1215.9 |

图:  $10^1 \sim 3$  个点和统计信息

# 宏基因组有参分析基本思路

16S rRNA基因扩增子

宏基因组

u/vsearch ↓ QIIME 2

MetaPhlAn2  
Kraken

↓ HUMAnN2/bowtie2/diamond

物种组成

|       | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 |
|-------|----------|----------|----------|
| OTU_1 | 4        | 0        | 2        |
| OTU_2 | 1        | 0        | 0        |
| OTU_3 | 2        | 4        | 2        |

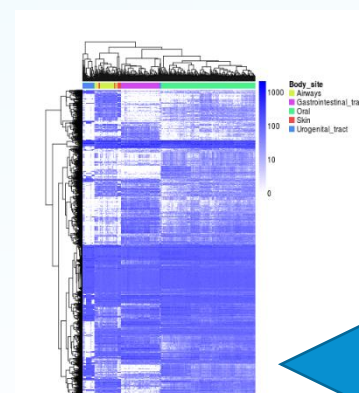
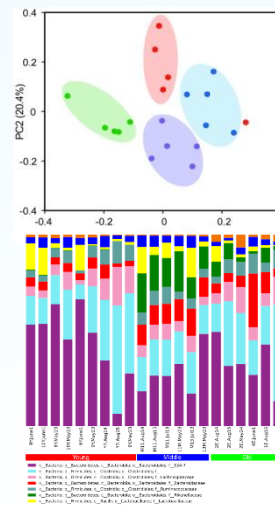
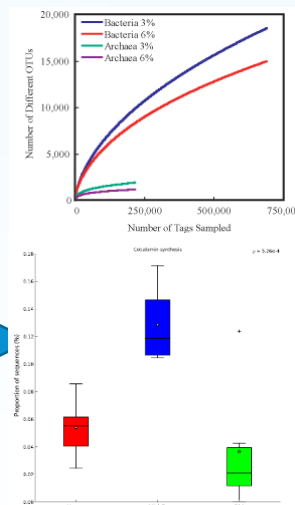
功能组成

|        | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 |
|--------|----------|----------|----------|
| K00001 | 20       | 15       | 18       |
| K00002 | 1        | 2        | 0        |
| K00003 | 4        | 5        | 4        |

PICRUST

Tax4Fun

STAMP /  
LEfSe / R



STAMP /  
LEfSe / R

# 宏基因组实验分析流程

DNA提取

随机打断  
测序

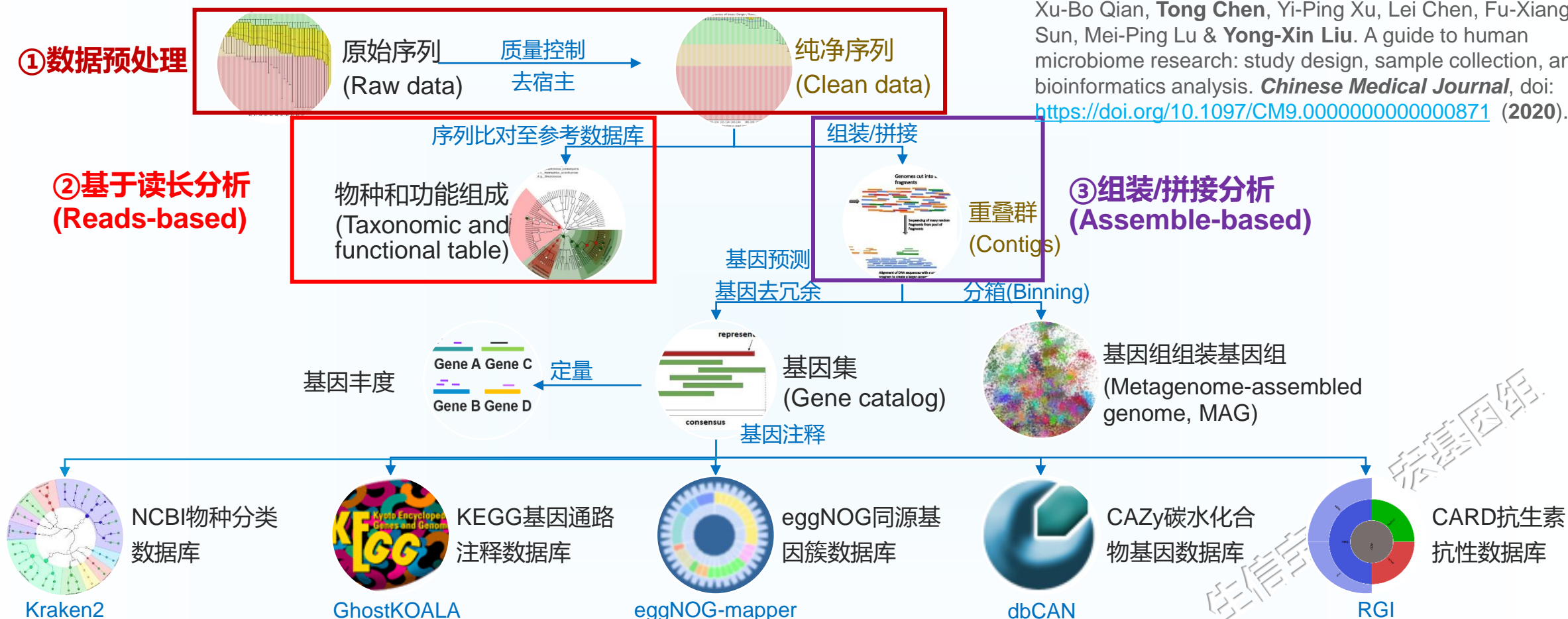
质控, (组装  
注释) 比对

物种功能  
组成分析



# 宏基因组分析流程

Xu-Bo Qian, **Tong Chen**, Yi-Ping Xu, Lei Chen, Fu-Xiang Sun, Mei-Ping Lu & **Yong-Xin Liu**. A guide to human microbiome research: study design, sample collection, and bioinformatics analysis. *Chinese Medical Journal*, doi: <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000871> (2020).



常用物种和功能基因注释数据库(图标右)和对应的软件(图标下)

# 宏基因组测序技术可以回答的科学问题

回答3个科学问题：

## 1. 样品中有什么？

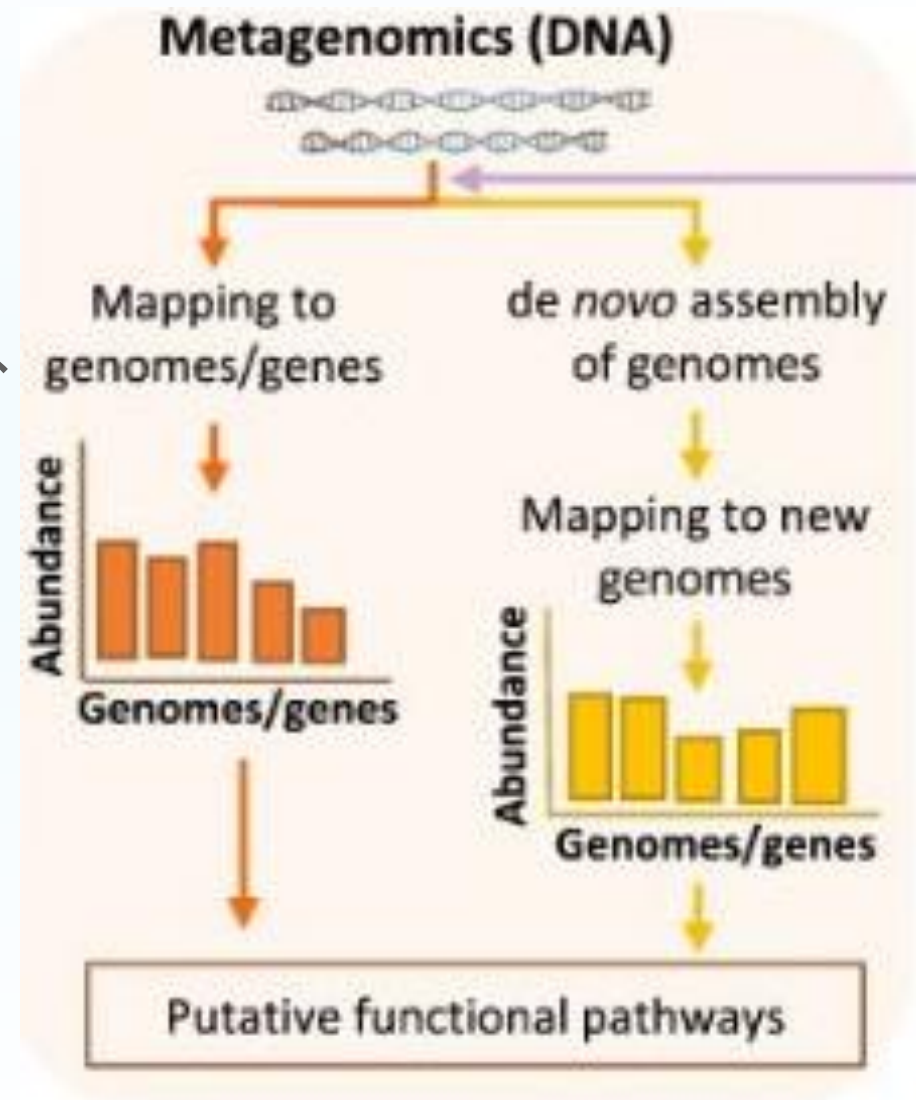
物种组成(包括宿主、细菌、真菌、病毒、原生动物等)

## 2. 样品中有哪些功能基因？

功能基因组成——潜在的功能

## 3. 组间物种和功能差异？

分组有关的物种分类(界/门/纲/目/科/属/种/株)和功能(通路/模块/同源簇/基因)



# 宏基因组基于读长(Reads-based)的分析流程

## 一. 软件安装和数据库部署

## 二. KneadData质控

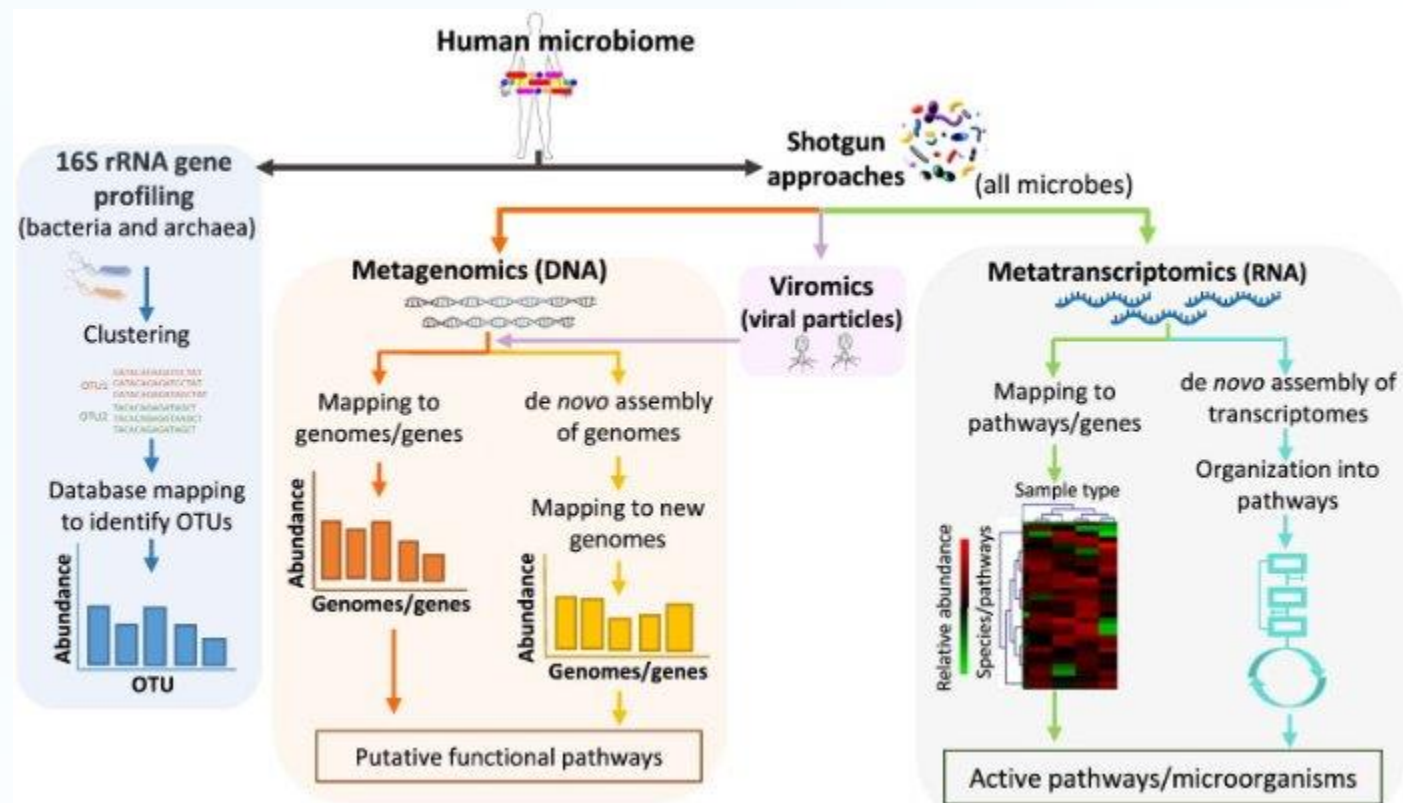
## 三. MetaPhlAn2物种组成

## 四. HUMAnN2功能组成

## 五. GraPhlAn可视化物种

## 六. LEfSe分析物种差异

## 七. STAMP功能组成分析

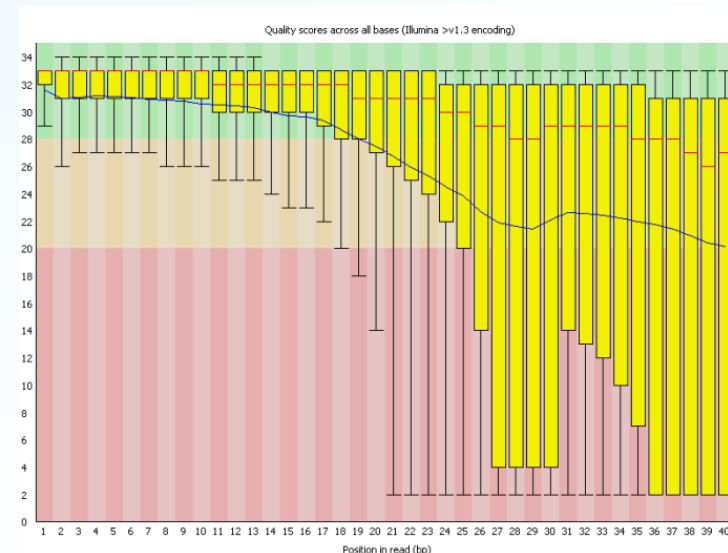


## 一. 软件安装和数据库部署

- Conda简介与安装
- 软件安装
- 数据库部署

## 二. KneadData质控

- FastQC评估和MultiQC汇总结果
- KneadData质控和去宿主
- FastQC再评估和MultiQC汇总



易生信



- Conda是(Python, R, Java, C等)软件包和环境管理系统, 用于安装多个版本的软件包及其依赖关系, 并在它们之间轻松切换。
- 开源软件, 支持Windows、MacOS和Linux(软件最多)三大主流系统
- 容易安装、升级软件及依赖包;
- 方便创建、保存、加载和切换不同的环境变量(如Python2/3)
- Conda由本地软件(Anaconda/Miniconda)和远程软件仓库组成
- 推荐安装Miniconda
- 生物软件安装必添加Bioconda频道

<https://conda.io/docs/>

# 推荐Miniconda3

- 最流行的Python数据科学管理平台
- <https://conda.io/miniconda.html> 推荐下载Linux python3 64位版本

# 下载软件，可根据官网下载最新版本

```
wget -c https://repo.anaconda.com/miniconda/Miniconda3-latest-Linux-x86_64.sh
```

# 安装，如管理员推荐安装目录设为conda，普通用户根据个人喜好设定或使用默认值~/miniconda3，其它选项全yes

```
bash Miniconda3-latest-Linux-x86_64.sh -b -f
```

[详细教程见：Nature Method：Bioconda解决生物软件安装的烦恼](#)



- BioConda是conda系统的生物信息软件专用频道，包括4部分：
- 可用软件清单 [http://bioconda.github.io/conda-package\\_index.html](http://bioconda.github.io/conda-package_index.html)
- 软件布署系统，方便用户定制软件及依赖关系
- [8627个生物信息软件/包及多版本](#)，如收录fastqc就有29个版本
- 超千人添加、修改、升级和维护软件清单
- [2017年发布于bioRxiv](#)；[2018年以通讯发表于Nature Methods](#)，以后可以优雅的引用它(吃水不忘挖井人)，三年内被引600+次
- 添加频道：conda config --add channels bioconda

Nature Method: Bioconda解决生物软件安装的烦恼 <https://bioconda.github.io/>

Grüning, B. et al. Bioconda: sustainable and comprehensive software distribution for the life sciences. *Nat. Methods* **15**, 475-476, doi:10.1038/s41592-018-0046-7 (2018).



# (可选)清华/北外维护的Anaconda镜像站加速下载

# 添加北外镜像加速下载

```
site= https://mirrors.bfsu.edu.cn/anaconda/
```

```
conda config --add channels ${site}/pkgs/free/
```

```
conda config --add channels ${site}/pkgs/main/
```

```
conda config --add channels ${site}/pkgs/r/
```

```
conda config --add channels ${site}/cloud/conda-forge/
```

```
conda config --add channels ${site}/cloud/bioconda/
```

# 如果不可用，请手动在conda配置文件 ~/.condarc 中手动删除





- 陈实富GitHub主页 <https://github.com/OpenGene>



fastp 0.23.2: Fastq序列质控

MutScan v1.14.1: 突变位置检测和可视化

repaq v0.3.0: Fastq序列高压缩比快速解压

Fastv 0.8.1: 微生物检测, 如SARS-CoV-2

- 沈伟GitHub主页 <https://github.com/shenwei356>

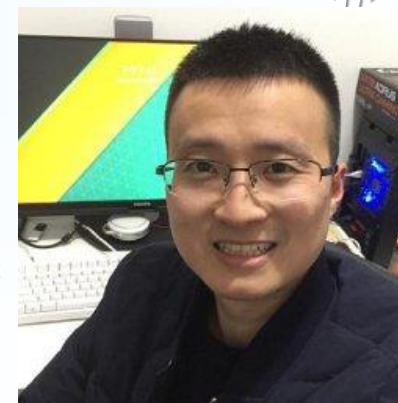
通用工具支持Windows / Linux / MacOS的32/64位系统, 支持下载或conda安装

seqkit 2.4: 序列处理

csvtk v0.25.0: 表格处理

taxonkit v0.14.1: NCBI物种信息查询和整理

rush v0.5.0: 任务并行管理软件



# fastp: fastq数据质量评估和质控

- 主页: <https://github.com/OpenGene/fastp>
- 安装 `conda install fastp -c bioconda`
- 下载 `wget http://opengene.org/fastp/fastp` 添加权限 `chmod a+x ./fastp`
- 示例: 适合单独质控或无需去宿主的环境样本, 分析速度极快  
`mkdir -p temp/qc`  
`i=C1`  
`fastp -i seq/${i}_1.fq.gz -o temp/qc/${i}_1.fastq -l seq/${i}_2.fq.gz -O temp/qc/${i}_2.fastq`
- 质控前后报告见 [fastp.html](#)



# seqkit: fastq数据基本统计和操作

- seqkit: 序列梳理神器-统计、格式转换、长度筛选、质量值转换、翻译、反向互补、抽样、去重、滑窗、拆分等30项全能
- 安装 `conda install seqkit -c bioconda`
- 可选在 <https://github.com/shenwei356/seqkit/releases> 发布页下载
- 样本批量统计 `seqkit stat seq/*.fq.gz`

```
(base) yongxin@yongxin:/mnt/c/meta$ seqkit stat seq/*.fq.gz
```

| file           | format | type | num_seqs | sum_len   | min_len | avg_len | max_len |
|----------------|--------|------|----------|-----------|---------|---------|---------|
| seq/C1_1.fq.gz | FASTQ  | DNA  | 75,000   | 7,575,000 | 101     | 101     | 101     |
| seq/C1_2.fq.gz | FASTQ  | DNA  | 75,000   | 7,575,000 | 101     | 101     | 101     |
| seq/C2_1.fq.gz | FASTQ  | DNA  | 75,000   | 7,575,000 | 101     | 101     | 101     |
| seq/C2_2.fq.gz | FASTQ  | DNA  | 75,000   | 7,575,000 | 101     | 101     | 101     |

- # 质量评估软件fastqc

```
conda install fastqc  
fastqc -v # FastQC v0.12.1
```

- # 多样品评估报告汇总multiqc

```
conda install multiqc  
multiqc --version # multiqc, version 1.14
```

- # 质量控制流程kneaddata, 安装最新/指定版解决ID问题

```
conda install kneaddata  
kneaddata --version # 0.12.0  
# 如有问题, 可用=指定版本  
# conda install kneaddata=0.12.0
```

**注意记录安装软件版本!**

**默认安装工作环境兼容的最新版, 保证可运行且功能最全**

**有问题时安装指定版本, 确保分析结果正确;**





# 质控相关数据库安装——人类基因组

- # 查看可用数据库  
kneadata\_database
- # 包括人类基因组human\_genome bowtie2/bmtagger、转录组、小鼠基因组、核糖体SILVA128数据库
- # 如下载人类基因组bowtie2索引至指定数据目录  
mkdir -p ~/db/kneadata/human\_genome  
kneadata\_database --download human\_genome bowtie2  
~/db/kneadata/human\_genome
- 其它物种可自行下载并使用bowtie2建索引，可参考代码或下方链接教程



# 自定义基因组构建bowtie2索引-Kneaddata去宿主

- 大多数基因组可在ensembl genome下载。此处以拟南芥为例，访问<http://plants.ensembl.org/index.html>，选择Arabidopsis thaliana —— Download DNA sequence (FASTA)，选择toplevel右键复制链接

# 新建目录、进入并下载链接

```
mkdir -p ${db}/kneaddata/ath && cd ${db}/kneaddata/ath
```

```
wget -c http://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release-51/fasta/arabidopsis_thaliana/dna/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.dna.toplevel.fa.gz
```

```
gunzip Arabidopsis_thaliana.TAIR10.dna.toplevel.fa.gz
```

# 简化文件名

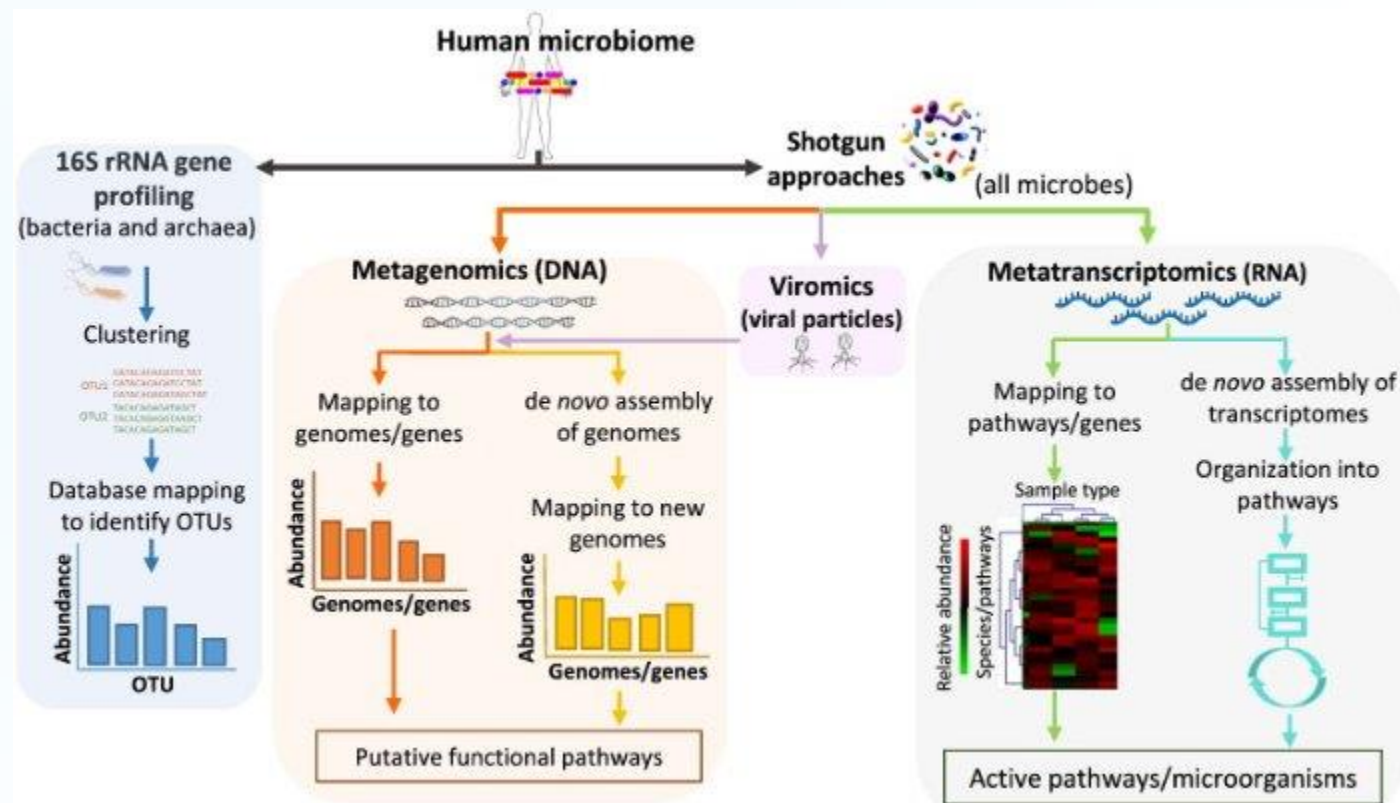
```
mv Arabidopsis_thaliana.TAIR10.dna.toplevel.fa tair10.fa
```

# bowtie2建索引，输入文件，输出文件前缀，9线程2分

```
time bowtie2-build -f tair10.fa tair10 --threads 9 --seed 1
```

# 宏基因组基于读长(Reads-based)的分析流程

- 一. 软件安装和数据库部署
- 二. **KneadData**质控
- 三. MetaPhlAn2物种组成
- 四. HUMAnN2功能组成
- 五. GraPhlAn可视化物种
- 六. LEfSe分析物种差异
- 七. STAMP功能组成分析



# 分析开始前必须设置环境变量

- # 公共数据库database位置, 如db公用可能为/db, 而自己下载可能为~/db
- **db=~/db**
- # Conda软件software安装目录, 如db公用可能为/conda, 而自己下载可能为~/miniconda3
- **soft=~/miniconda3**
- # wd为项目工作目录work directory, 如meta
- **wd=~/meta**





# 了解宏基因组分析起始文件(上传到服务器)

- 测序数据：成对测序文件seq/\*.fq.gz，通常为压缩的gz格式

**C1\_1.fq.gz C2\_1.fq.gz**  
**C1\_2.fq.gz C2\_2.fq.gz**

@SRR3586062.883556

CTTGGGGCTGCTGAGCTTCATGCTCCCCTCCTGCCTCAAGGACAATAAGGAGATCTTCGACAAGCCTGCAGCAGCTCGCATCG

+

CCFFFFFFHHHHHHIJJJJJJJIJJJJJJGIIJDGIJEIIJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJHHHHFFFFECEEEDDDDD?BDD

@SRR3586062.3376311

GACGGTGTCTCAGGACCCTTCAGTGCCTTCATGATCTGCTCAGAGGTGATGGAGTCACGGACGAGATTCGTCGTGTCAGCAC

+

@@@DDDDAFF?DF;EH+ACHIIICHDEHGIGBFE@GCGDGG?D?G@BGHG@FHC GC;CC:;8ABH>BECCBCB>;8ABCCC@A

- 实验设计：样本名和分组 result/metadata.txt

| SampleID | Group  | Replicate | Sex    | Individual | GSA       | CRR       |
|----------|--------|-----------|--------|------------|-----------|-----------|
| C1       | Cancer |           | 1 Male | p136       | CRA002355 | CRR117732 |
| C2       | Cancer |           | 2 Male | p143       | CRA002355 | CRR117733 |



- 常用Illumina NovaSeq6000 PE150, 或BGI-Seq500 PE100
- 数据质量评估——FastQC

Andrews, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. (2010). [Cited by 12235](https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)  
<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

- 去除引物、接头和低质量序列——Trimmomatic

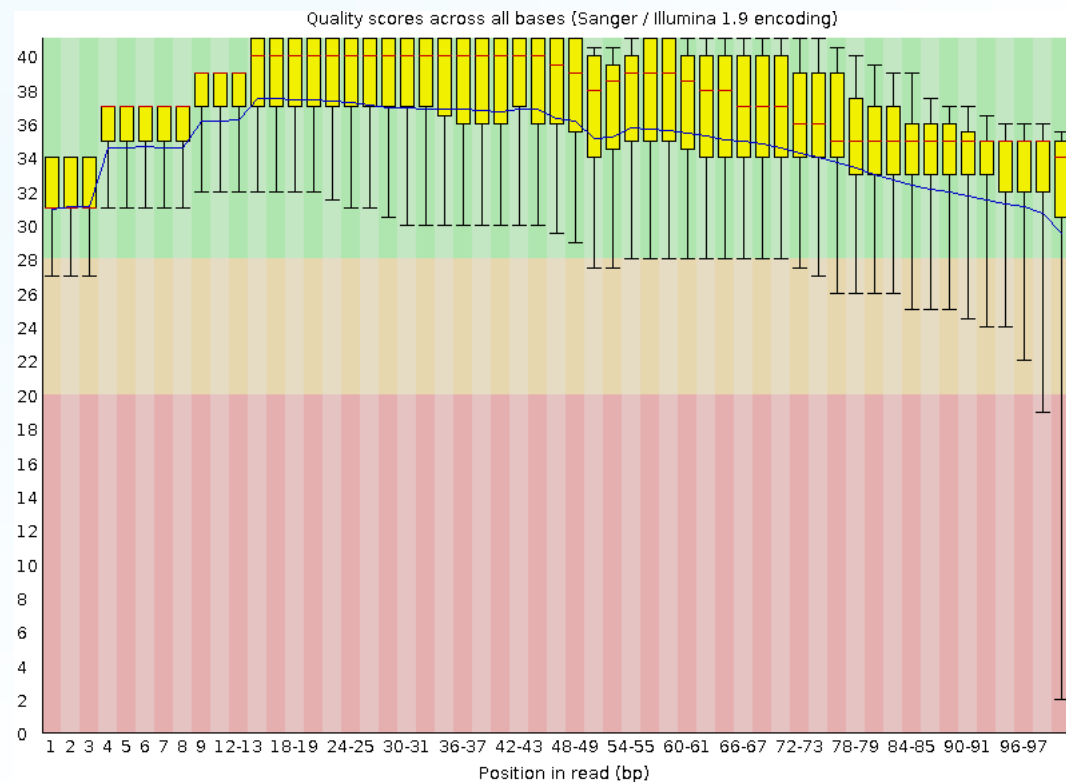
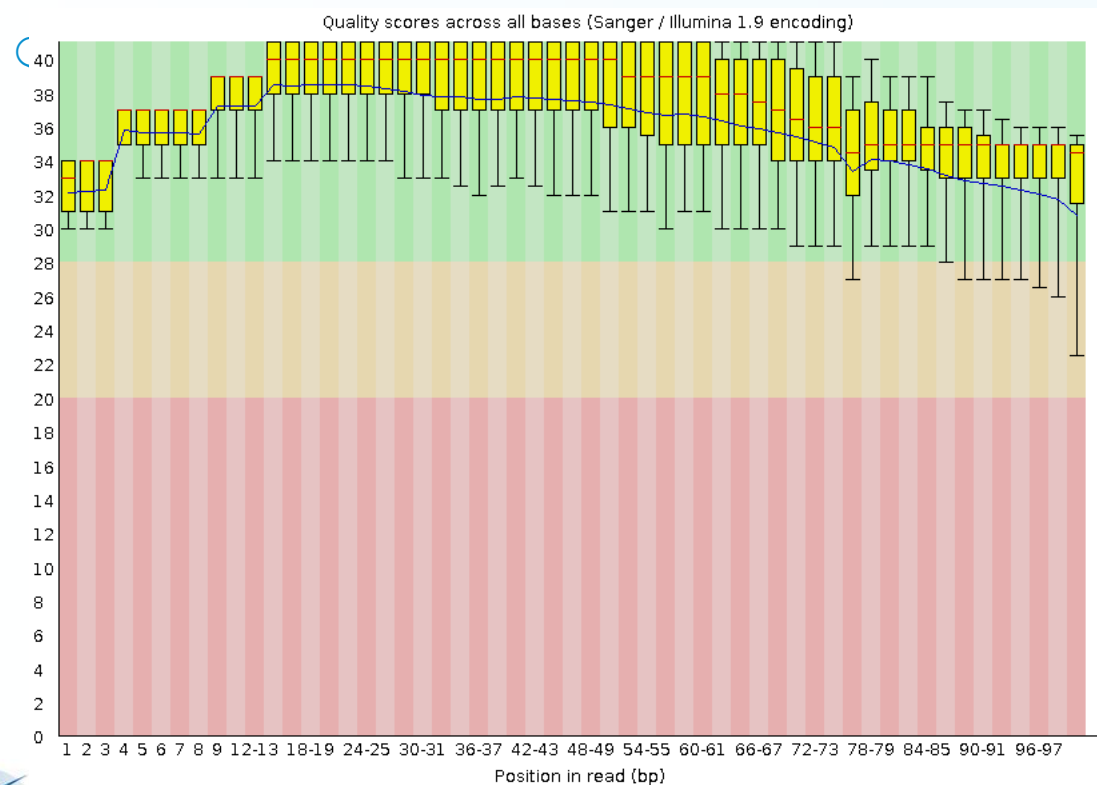
Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114-2120, doi:10.1093/bioinformatics/btu170 (2014). [Cited by 39668](#)

- 去除宿主——Bowtie 2比对宿主基因组; 筛选非宿主序列

Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* **9**, 357, doi:10.1038/nmeth.1923 (2012). [Cited by 38410](#)



- fastqc seq/\*.gz -t 1 # fastqc批量, 12个双端样本24个文件, 设置1线程即仅允许1个文件同时处理, 可根据服务器性能合理选择



## FastQC质量评估报告中的重要结果。

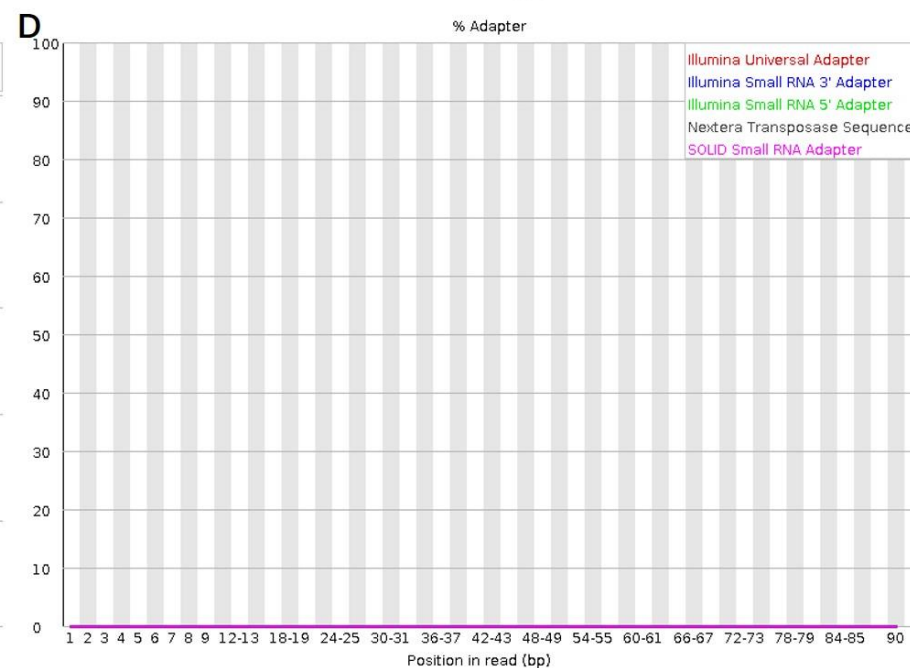
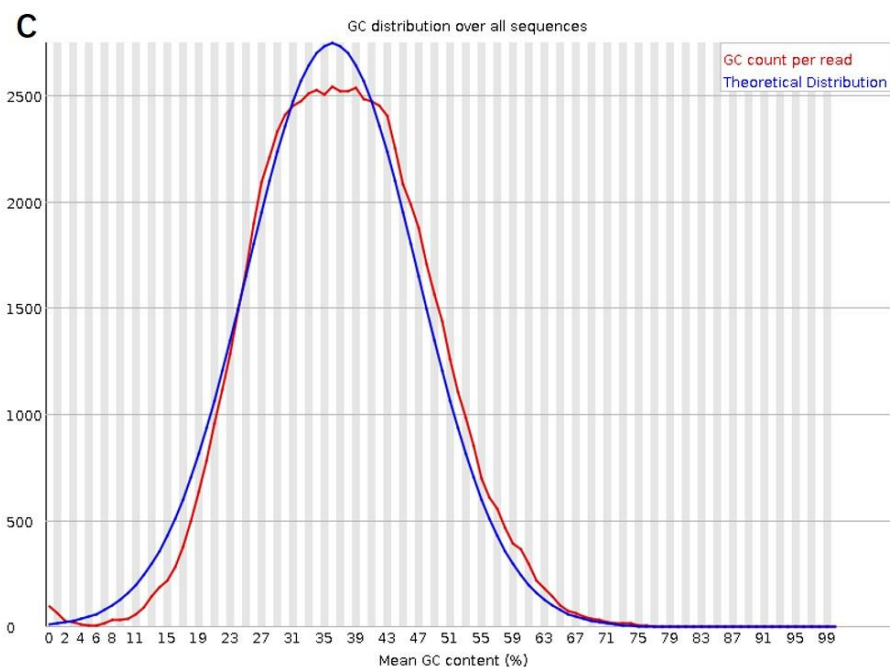
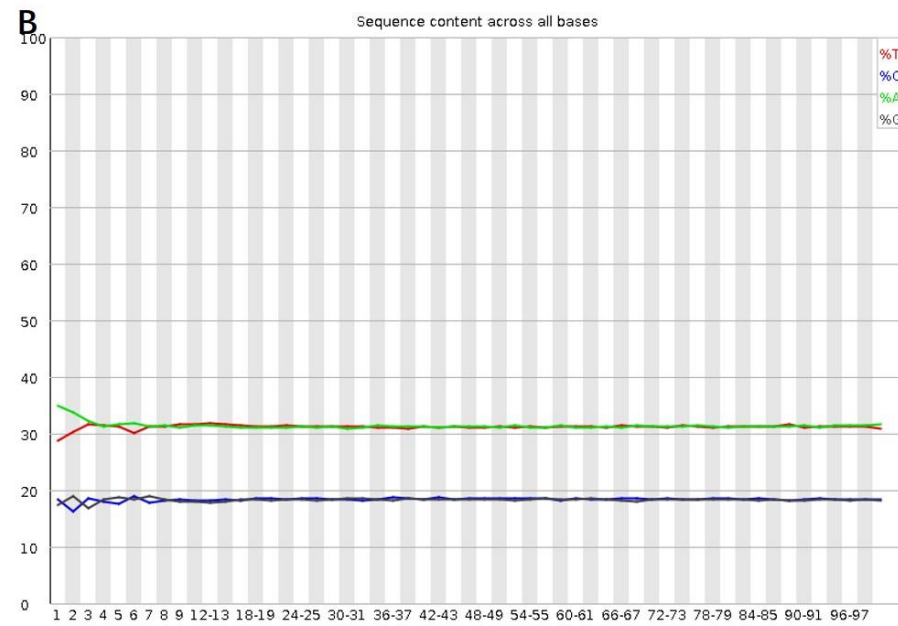
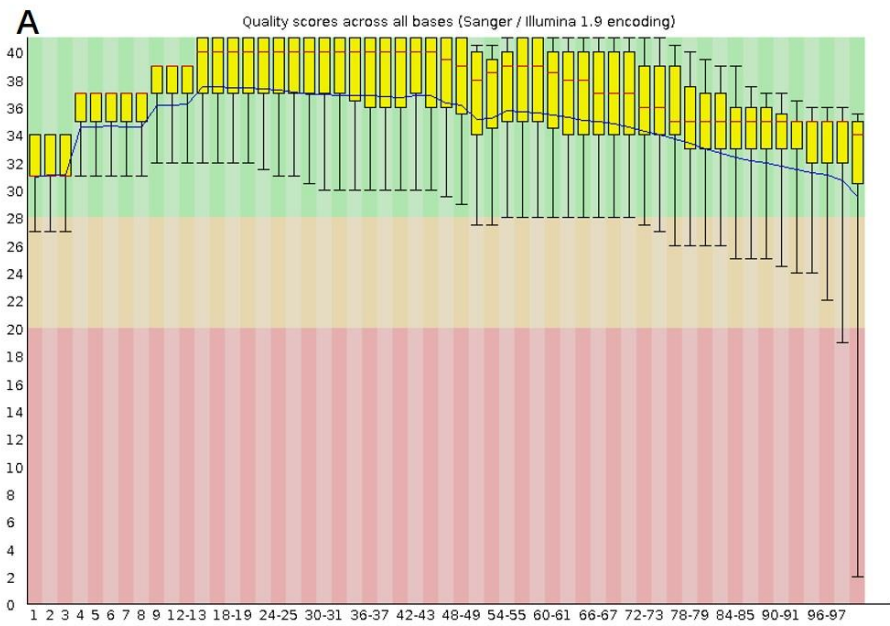
A. 每个碱基的质量(Per base sequence quality)。

B. 序列中每个位置上碱基的含量(Per base sequence content)。

C. 所有序列的GC含量(Per sequence GC content)分布与理论值分布曲线。

D. 接头含量(Adapter Content)。

以样本C2右端序列为列, 详见seq/C2\_2\_fastqc.html





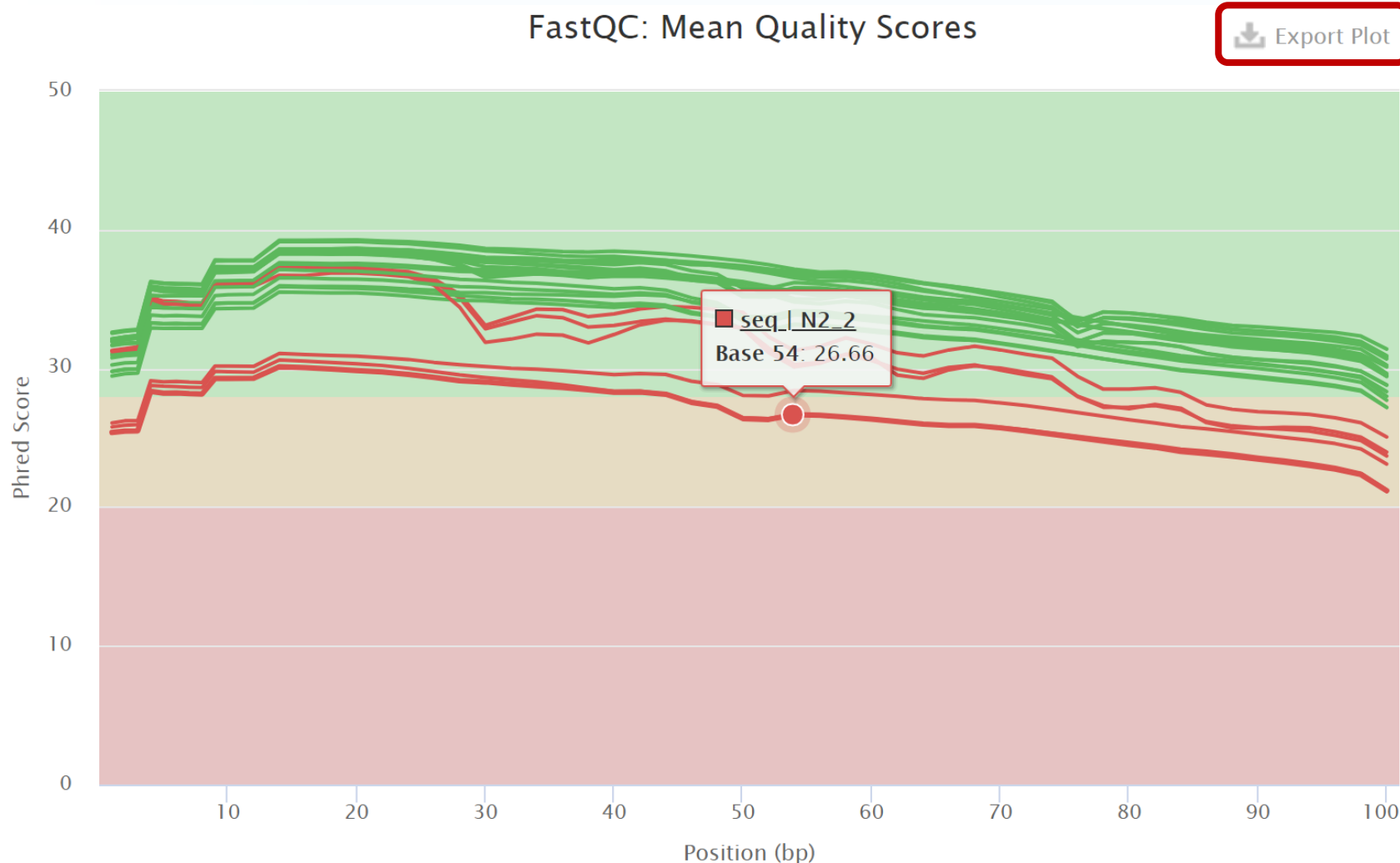
# MultiQC多样本汇总比较

- # 生成多样品报告比较
- `multiqc -d seq/ -o result/qc`
- # 查看右侧result/qc目录中multiqc\_report.html, 可交互式报告

| Sample Name ▲ | % Dups | % GC | M Seqs |
|---------------|--------|------|--------|
| seq   C1_1    | 0.1%   | 37%  | 0.1    |
| seq   N1_1    | 1.6%   | 40%  | 0.1    |
| seq   C1_2    | 0.2%   | 37%  | 0.1    |
| seq   N1_2    | 3.4%   | 40%  | 0.1    |

Philip Ewels, Måns Magnusson, Sverker Lundin & Max Käller. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32, 3047-3048, doi:10.1093/bioinformatics/btw354 (2016). [Cited by 689](#)

# 图片和数据导出



Export Plot

Toolbox



## MultiQC Toolbox

### Export Plots

Images

Data

1200

px

800

px

☒ Aspect ratio

PNG

Plot scaling

2

X

### Choose Plots

☒ All

☐ None

☒ fastqc\_per\_base\_sequence\_quality\_plot

☐ fastqc\_per\_sequence\_quality\_scores\_plot

☐ fastqc\_per\_base\_sequence\_content\_plot

☐ fastqc\_per\_sequence\_gc\_content\_plot

☐ fastqc\_per\_base\_n\_content\_plot

☐ fastqc\_sequence\_duplication\_levels\_plot

☐ fastqc\_overrepresented\_sequences\_plot

☐ fastqc\_adapter\_content\_plot

☐ tableScatterPlot



Download Plot Images

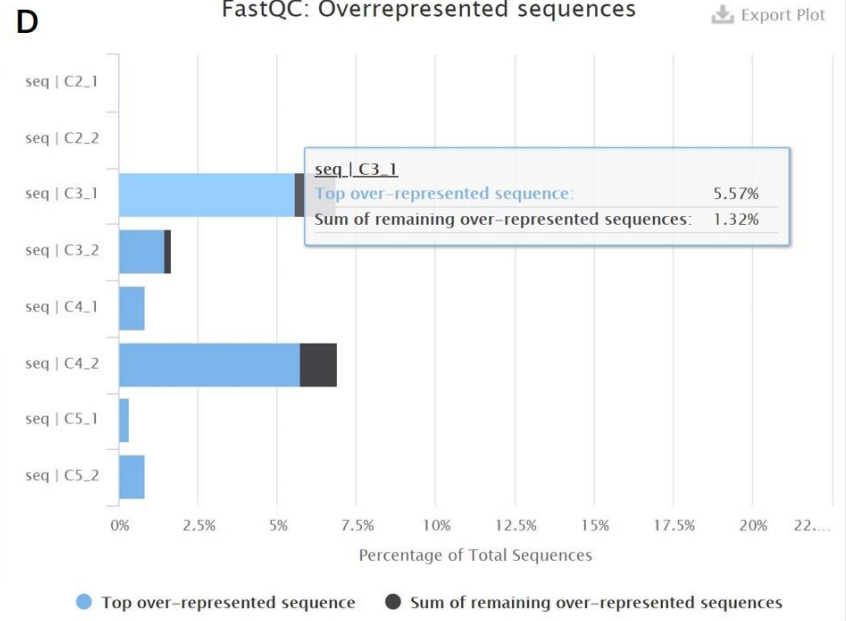
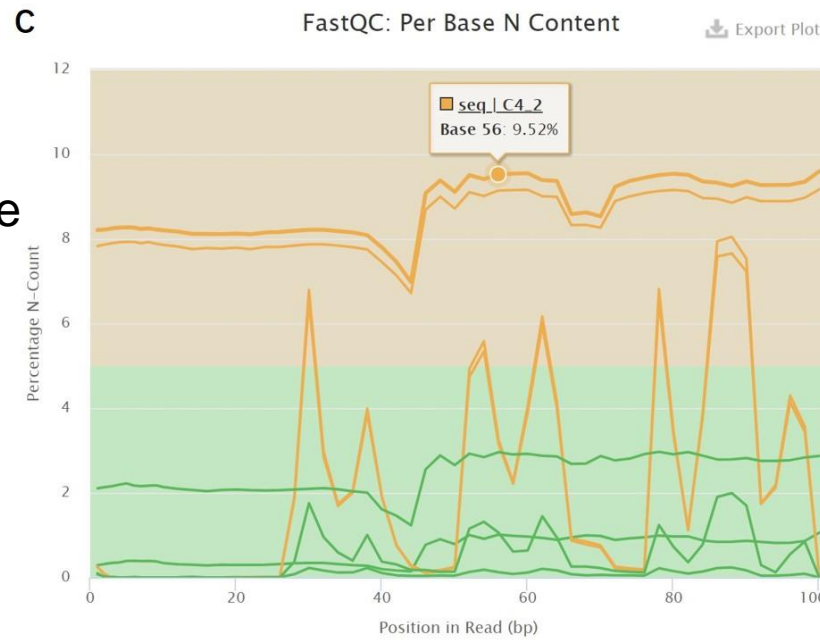
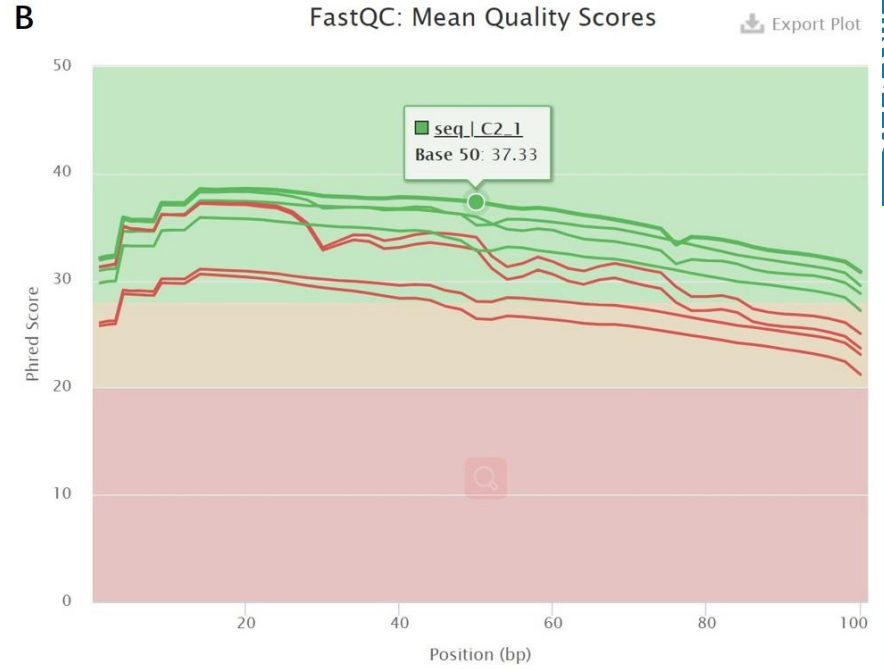
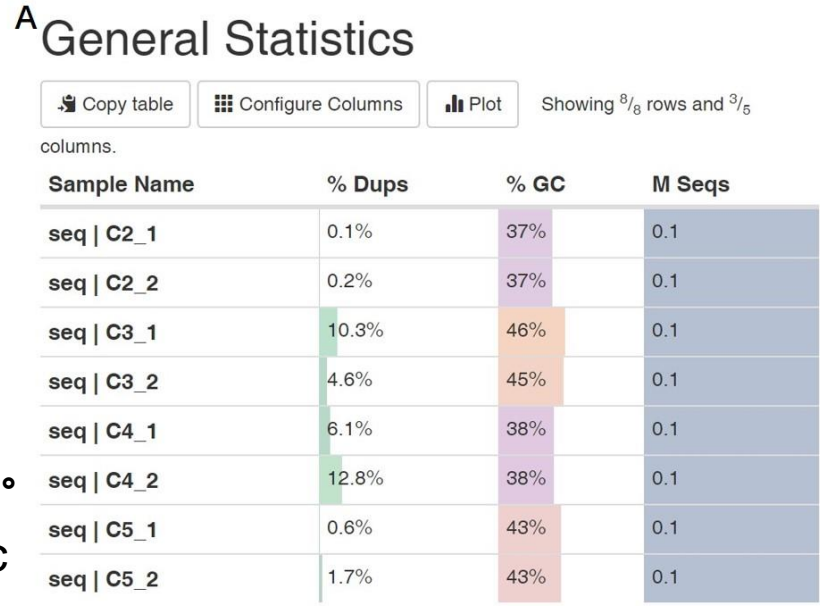


# MultiQC质量评估汇总

## 报告中的重要结果。

- A. 综合统计(General Statistics)。
- B. 平均质量值(Mean Quality Scores)。
- C. 每个碱基的N含量(Per Base N Content)。
- D. 过多序列的比例(Overrepresented sequences)。

本报告汇总了样本C2-5共4个样本包含的8个序列评估报告的汇总, 详见multiqc\_report.html。



# KneadData — 宏基因组质控和去宿主流程

- 质控包括去除低质量和接头、比对宿主基因组、去除宿主序列三步
- 依赖Trimmomatic、Bowtie 2、Samtools、Python等
- 由Huttenhower实验室提供了此步的解决方案：KneadData  
<http://huttenhower.sph.harvard.edu/kneaddata>
- 文章还在投稿中 (TBD)，已经被引用近500次
- 流程采用Python编写，支持pip和Conda安装
- 预构建了人类、小鼠数据库；可自定义Bowtie 2索引数据库





## The Huttenhower Lab

Department of Biostatistics, Harvard T.H. Chan School of Public Health

[HOME](#)[RESEARCH](#)[TEACHING](#)[DOCUMENTATION](#)[PEOPLE](#)[CONTACT](#)[PUBLICATIONS](#)

## The Huttenhower Lab

My lab in the [Biostatistics Department](#) at the [Harvard T.H. Chan School of Public Health](#) focuses on understanding the function of [microbial communities](#), particularly that of the [human microbiome](#) in health and disease. This entails a combination of computational methods development for wrangling large data collections, as well as biological analyses and laboratory experiments to link the microbiome in human populations to specific microbiological mechanisms. In particular, we've worked extensively with the [NIH Human Microbiome Project](#) to help develop the first comprehensive map of the healthy Western adult microbiome, and there's plenty of work left to keep us busy understanding how human-associated microbial communities can be used as a means of diagnosis or therapeutic intervention on the continuum between health and disease.

Specific research areas we're working on include:

**Computational models for functional genomics in microbial communities.** These typically involve bioinformatic algorithm development to relate the



基因组学





# Curtis Huttenhower Google学术主页



Curtis Huttenhower

Department of Biostatistics, [Harvard School of Public Health](#)  
在 [hsph.harvard.edu](#) 的电子邮件经过验证

[computational metagenomics](#) [human microbiome](#) [biological data mining](#)



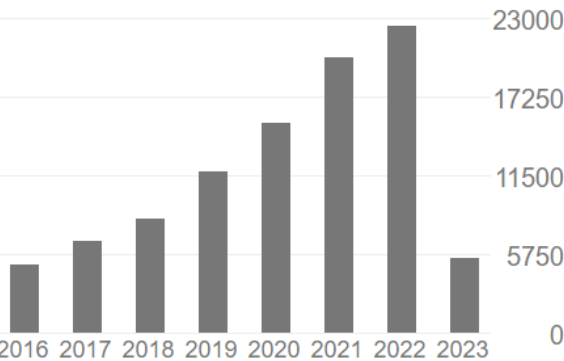
[10篇Nature专题报导人类微生物组计划2\(iHMP\)成果及展望](#)  
[Nature: iHMP之“微生物组与炎症性肠病”](#)

| 标题   | 引用次数 | 年份   |
|--|------|------|
| <a href="#">Metagenomic biomarker discovery and explanation</a><br>N Segata, J Izard, L Waldron, D Gevers, L Miropolsky, WS Garrett, ...<br>Genome biology 12, 1-18  | 9674 | 2011 |
| <a href="#">Structure, function and diversity of the healthy human microbiome</a><br>nature 486 (7402), 207-214  | 8947 | 2012 |
| <a href="#">Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2</a><br>E Bolyen, JR Rideout, MR Dillon, NA Bokulich, CC Abnet, GA Al-Ghalith, ...<br>Nature biotechnology 37 (8), 852-857 | 8640 | 2019 |
| <a href="#">Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences</a><br>MGI Langille, J Zaneveld, JG Caporaso, D McDonald, D Knights, ...<br>Nature biotechnology 31 (9), 814-821     | 7427 | 2013 |
| <a href="#">The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease</a><br>D Gevers, S Kugathasan, LA Denson, Y Vázquez-Baeza, W Van Treuren, ...<br>Cell host & microbe 15 (3), 382-392                                   | 2792 | 2014 |

引用次数

[查看全部](#)

|        | 总计     | 2018 年至今 |
|--------|--------|----------|
| 引用     | 106293 | 83979    |
| h 指数   | 123    | 110      |
| i10 指数 | 242    | 223      |



开放获取的出版物数量

[查看全部](#)

10 篇文章 226 篇文章

无法查看的文章 可查看的文章

根据资助方的强制性开放获取政策



易汉博基因科技(北京)有限公司  
EHBIO Gene Technology (Beijing) co., LTD

实验室主页: <http://huttenhower.sph.harvard.edu/>  
Google学术主页: <https://scholar.google.co.jp/citations?hl=zh-CN&user=yFncM6AAAAAJ>

# KneadData——宏基因组质控流程依赖关系

- <http://huttenhower.sph.harvard.edu/kneaddata>
- Trimmomatic (version  $\geq 0.33$ ) (automatically installed)
- Bowtie2 (version  $\geq 2.2$ ) (automatically installed)
- Python (version  $\geq 2.7$ )
- Java Runtime Environment
- TRF (optional)
- FastQC (optional)
- SAMTools (only required if input file is in BAM format)



# 以C1单样品质控为例(正对照确保软件可用)

- **-i输入文件, -o输出目录, -v输出计算过程, -t线程数, --trimmomatic位置和参数, --bowtie2-options 参数, -db 宿主基因组索引位置**

```
time kneaddata -i seq/C1_1.fq.gz -i seq/C1_2.fq.gz \
```

```
-o temp/qc -v -t 3 --remove-intermediate-output \
```

```
--trimmomatic ~/miniconda3/envs/kneaddata/share/trimmomatic/ --trimmomatic-  
options
```

```
'ILLUMINACLIP:~/miniconda3/envs/kneaddata/share/trimmomatic/adapters/TruSe  
q2-PE.fa:2:40:15 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:50' \
```

```
--bowtie2-options '--very-sensitive --dovetail' -db  
~/db/kneaddata/human_genome/hg37dec_v0.1
```

**多个样品如何批量分析, 并管理好资源分配呢?**

# 并行管理软件 rush / parallel

- 现实中是有一大堆样品，for可以单个或全部提交任务效率都很低，如何让服务器性能允许下并行加速分析，并有序管理队伍呢？
- 国人开发了跨平台的并行管理工具rush，[官网下载](https://github.com/shenwei356/rush)或 conda安装  
conda install rush  
官网：<https://github.com/shenwei356/rush>
- (可选)Parallel是Perl语言编写，可提供并行任务数量管理的功能，保证任务高效有序完成，作者要求引用，如不想引用也可付10000欧元购买。可以直接在Ubuntu仓库中安装或conda安装  
sudo apt install parallel  
conda install parallel

# 方法1. rush并行管理质量控制(质控)实例

- 样本名列表从命令行管道传入, -j 2控制2个任务并行, 红色为需要修改的部分

```
tail -n+2 result/metadata.txt|cut -f1|rush -j 2 \  
  "kneaddata -i seq/{1}_1.fq.gz -i seq/{1}_2.fq.gz \  
  -o temp/qc -v -t 3 --remove-intermediate-output \  
  --trimmomatic ~/miniconda3/envs/kneaddata/share/trimmomatic/ \  
  --trimmomatic-options 'ILLUMINACLIP:  
~/miniconda3/envs/kneaddata/share/trimmomatic/adapters/TruSeq2-  
PE.fa:2:40:15 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:50' \  
  --reorder --bowtie2-options '--very-sensitive --dovetail' \  
  -db ~/db/kneaddata/human_genome/hg37dec_v0.1"
```





## (备选)方法2. parallel并行

- 示例：对所有样品进行质控，同时保持最多3个样本在运行。
- -j为任务数，--xapply是对两个参数按顺序使用而非组合方式

**parallel -j 3 --xapply \**

```
"kneaddata -i seq/{1}_1.fq.gz -i seq/{1}_2.fq.gz\  
-o temp/qc -v -t 3 --remove-intermediate-output \  
--trimmomatic ~/miniconda3/envs/kneaddata/share/trimmomatic/ --trimmomatic-options  
'ILLUMINACLIP ~/miniconda3/envs/kneaddata/share/trimmomatic/adapters/TruSeq2-  
PE.fa:2:40:15 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:50' \  
--bowtie2-options '--very-sensitive --dovetail' -db ~db/kneaddata/human_genome/hg37dec_v0.1"  
\  
::: `tail -n+2 result/metadata.txt|cut -f1`
```



# 质控去宿主 结果文件简化统一(与质控一致)

- awk的system命令批处理系统命令，mv实现移动即改名
- # 移动实现简化名，如C1\_1\_kneaddata\_paired\_1.fastq为C1\_1.fastq  
awk '{system("mv `pwd`/temp/qc/"\$1"\_1\_kneaddata\_paired\_1.fastq  
temp/qc/"\$1"\_1.fastq")}' <(tail -n+2 result/metadata.txt)  
# 右端链接为新简化名  
awk '{system("mv `pwd`/temp/qc/"\$1"\_1\_kneaddata\_paired\_2.fastq  
temp/qc/"\$1"\_2.fastq")}' <(tail -n+2 result/metadata.txt)  
# 检查结果  
ls -l temp/qc/
- for循环仅能使用单个变量，awk命令适合基于metadata多个列变量的  
文件下载、重命名、链接等批量操作



# 质控结果汇总表

# 合并所有样本统计结果为表

```
kneaddata_read_count_table --input temp/qc -output temp/kneaddata.txt
```

# 筛选重要的列，并查看结果

```
cut -f 1,2,4,12,13 temp/kneaddata.txt | sed 's/_1_kneaddata/' > result/qc/sum.txt
```

```
cat result/qc/sum.txt
```

| Sample | raw pair1 | raw pair2 | trimmed pair1 | trimmed pair2 | decontam pair1 | decontam pair2 | final pair1 | final pair2 | final orpha | final orpha |
|--------|-----------|-----------|---------------|---------------|----------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| C1     | 75000     | 75000     | 65243         | 65243         | 64809          | 64809          | 64809       | 64809       | 670         | 6042        |
| C2     | 75000     | 75000     | 47971         | 47971         | 30944          | 30944          | 30944       | 30944       | 1210        | 7632        |
| C3     | 75000     | 75000     | 49504         | 49504         | 28643          | 28643          | 28643       | 28643       | 950         | 5469        |
| C4     | 75000     | 75000     | 60685         | 60685         | 57149          | 57149          | 57149       | 57149       | 848         | 6631        |
| C5     | 75000     | 75000     | 62110         | 62110         | 61928          | 61928          | 61928       | 61928       | 977         | 8705        |
| C6     | 75000     | 75000     | 65249         | 65249         | 65211          | 65211          | 65211       | 65211       | 727         | 6349        |
| N1     | 75000     | 75000     | 60059         | 60059         | 53662          | 53662          | 53662       | 53662       | 753         | 6276        |
| N2     | 75000     | 75000     | 46195         | 46195         | 31873          | 31873          | 31873       | 31873       | 1050        | 7098        |
| N3     | 75000     | 75000     | Sample        | raw pair1     | trimmed pair1  | final pair1    | final pair2 |             |             |             |
| N4     | 75000     | 75000     | -----         | -----         | -----          | -----          | -----       |             |             |             |
| N5     | 75000     | 75000     | C1            | 75000.0       | 65316.0        | 64276.0        | 64276.0     |             |             |             |
| N6     | 75000     | 75000     | C2            | 75000.0       | 48082.0        | 29293.0        | 29293.0     |             |             |             |

```
csvtk -t pretty result/qc/sum.txt
```

# 质控结果统计和可视化

## ○ # 用R代码统计下质控结果

Rscript -e

```
"data=read.table('result/qc/sum.txt',  
header=T, row.names=1, sep='\t');  
summary(data)"
```

## ○ # R转换宽表格为长表格

```
Rscript -e "library(reshape2);  
data=read.table('result/qc/sum.txt',  
header=T, row.names=1, sep='\t');  
write.table(melt(data),  
file='result/qc/sum_long.txt', sep='\t',  
quote=F, col.names=T, row.names=F)"
```

Essential parameters

Legend variable \*

variable

Legend variable order

× raw.pair1  
× trimmed.pair1  
× final.pair1  
× final.pair2

Y-axis variable \*

value



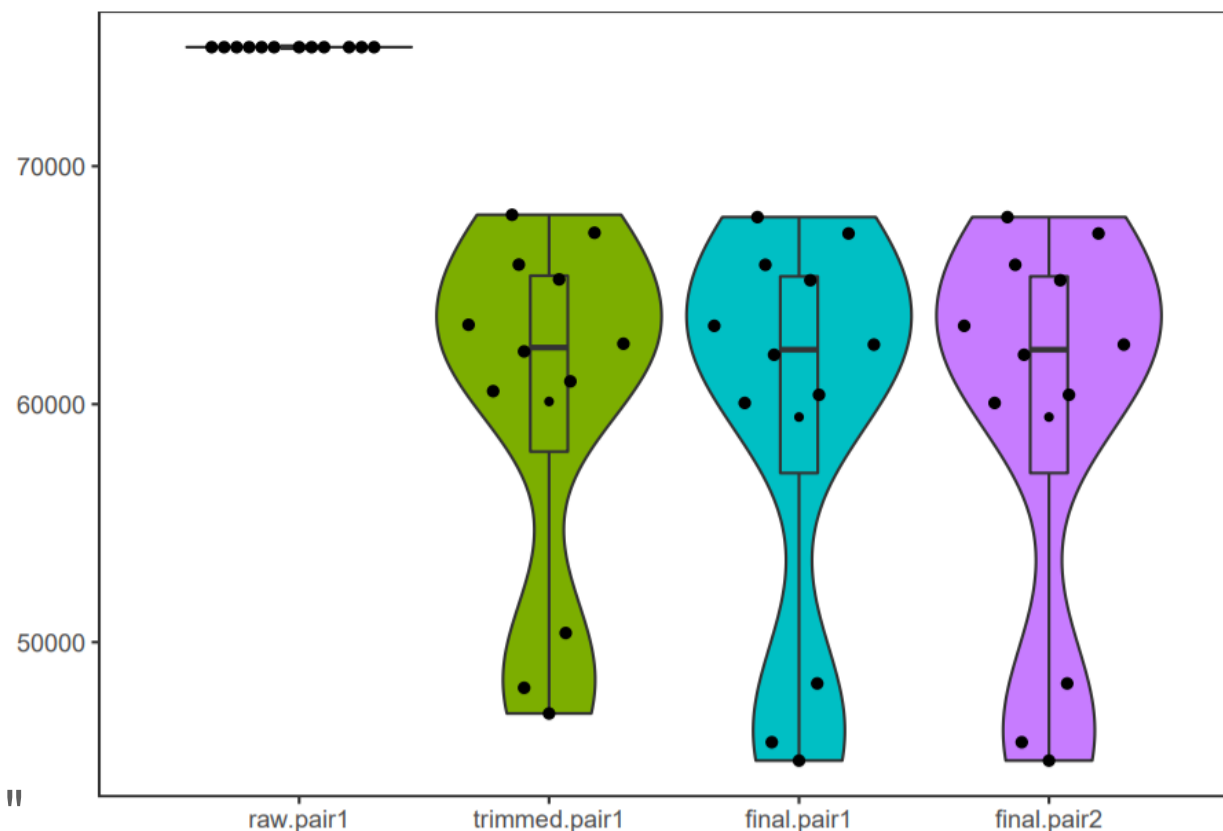
Box+Jitter+Violin

X-axis variable

variable

plot

E.g. B, D, C, E



<https://www.bic.ac.cn/ImageGP/index.php/Home/Index/Boxplot.html>



# 1.4 质控后质量再评估

## trimmomatic + bowtie2 + fastqc 三个软件报告汇总



```
fastqc temp/qc/*_1_kneaddata_paired_* -t 6
multiqc -d temp/qc/ -o result/qc/ # 结果为multiqc_report_1.html
```

| Sample Name                         | % Aligned | % Dropped ▼ | % Dups | % GC | M Seqs |
|-------------------------------------|-----------|-------------|--------|------|--------|
| decompressed_dclWWc_N2_1            |           | 25.7%       |        |      |        |
| decompressed_tx4J0T_C3_1            |           | 22.3%       |        |      |        |
| decompressed_uwtl85_C2_1            |           | 21.6%       |        |      |        |
| C2_1_kneaddata.trimmed.single.1     | 4.5%      |             |        |      |        |
| C3_1_kneaddata.trimmed.single.1     | 4.2%      |             |        |      |        |
| N2_1_kneaddata.trimmed.single.1     | 3.7%      |             |        |      |        |
| temp   qc   N5_1_kneaddata_paired_1 |           |             | 0.1%   | 45%  | 0.1    |
| temp   qc   C2_1_kneaddata_paired_1 |           |             | 3.9%   | 44%  | 0.0    |
| temp   qc   C2_1_kneaddata_paired_2 |           |             | 3.9%   | 44%  | 0.0 39 |

质控步骤，扔掉低质量的比例

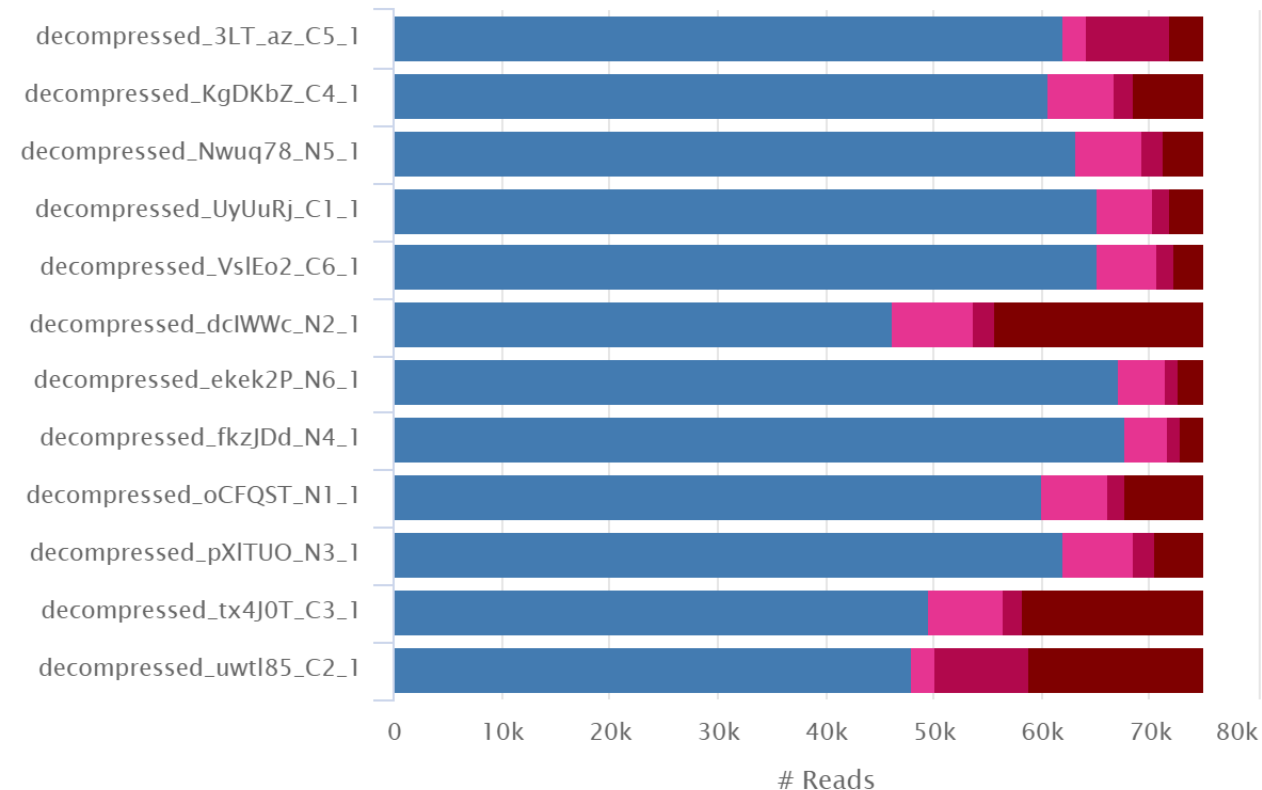
去宿主步骤，宿主含量

质量评估步骤，基本信息



# Trimmomatic质控+Bowtie2比对宿主柱状图展示

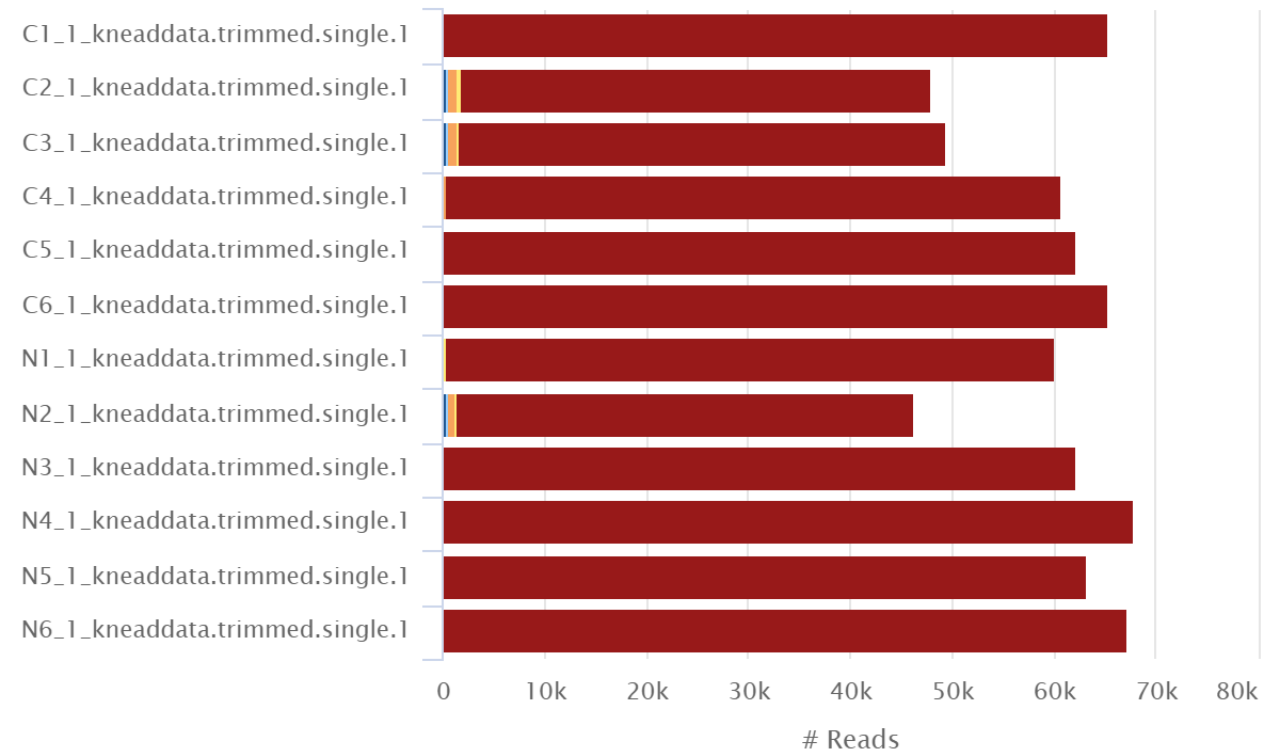
Trimmomatic: Surviving Reads



● Surviving Reads ● Forward Only Surviving ● Reverse Only Surviving  
● Dropped

Created with MultiQC

Bowtie 2: PE Alignment Scores

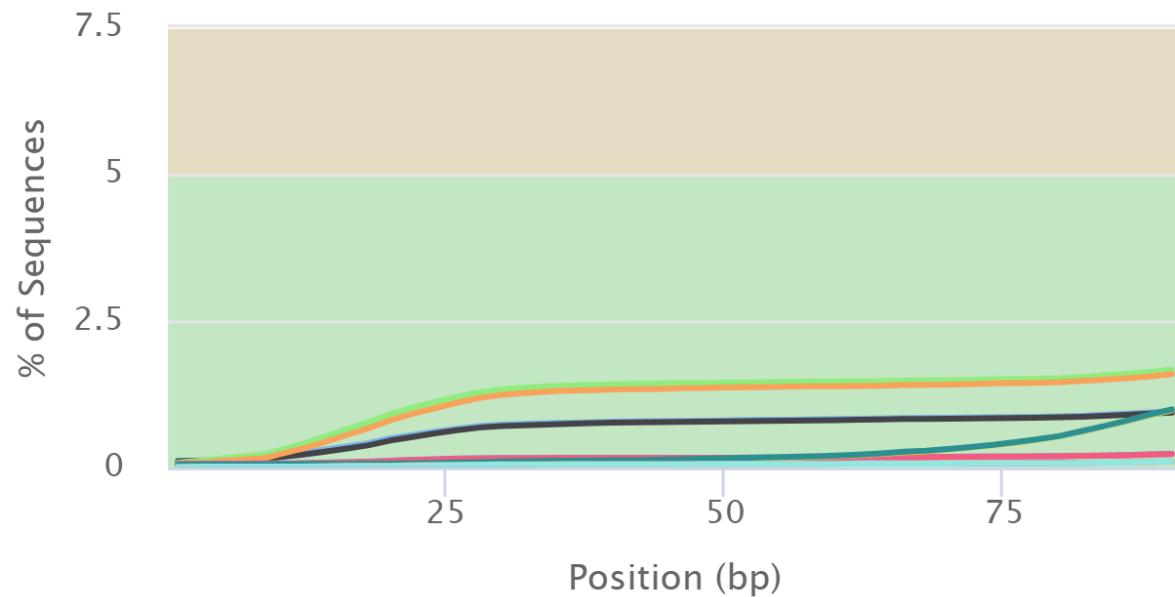


● PE mapped uniquely ● PE mapped discordantly uniquely  
● PE one mate mapped uniquely ● PE multimapped ● PE one mate multimapped  
● PE neither mate aligned

Created with MultiQC

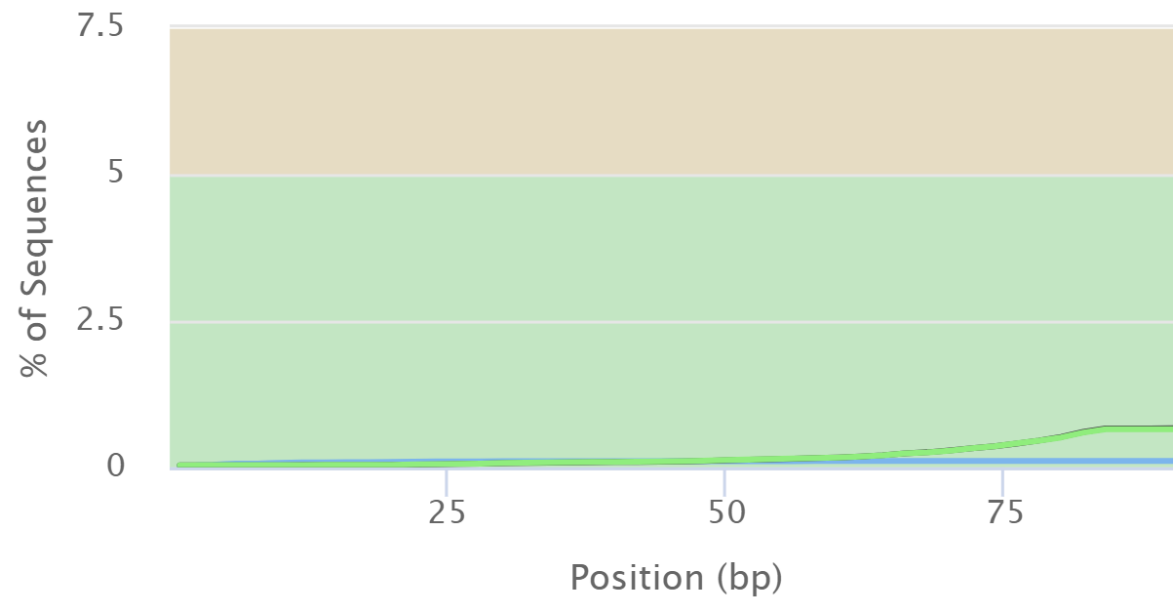
# 接头含量 FastQC: Adapter Content

FastQC: Adapter Content



Created with MultiQC

FastQC: Adapter Content



Created with MultiQC

质控前 vs 质控后

- Conda是软件安装和管理神器，Bioconda频道是生物学家的福音，8千多个生信软件及数十万个版本满足你各种需求，记得引用它；
- 很多软件还依赖数据库需要手动下载，如人类基因组用于去宿主；
- 哈佛大学Huttenhover组编写的质控流程KneadData，整合质控需要的Trimmomatic, Bowtie 2等软件和宿主基因组数据库，解决软件数据库选择和安装、流程脚本、参数选择等众多烦恼；
- MultiQC用于质控前后的评估和汇总，包括FastQC、Trimmomatic和Bowtie 2的汇总、可视化，方便阅读、比较和图表导出；
- 多任务管理专家 rush，备选parallel (Perl编写、依赖包容易报错)



- [宏基因组公众号文章目录](#)      [生信宝典公众号文章目录](#)
- [科学出版社《微生物组数据分析》——50+篇](#)
- [Bio-protocol《微生物组实验手册》——153篇](#)
- [Protein Cell: 扩增子和宏基因组数据分析实用指南](#)
- [CMJ: 人类微生物组研究设计、样本采集和生物信息分析指南](#)
- [加拿大生信网 <https://bioinformatics.ca/> 宏基因组课程中文版](#)
- [美国高通量开源课程 <https://github.com/ngs-docs>](#)
- [Curtis Huttenhower <http://huttenhower.sph.harvard.edu/>](#)
- [Nicola Segata <http://segatalab.cibio.unitn.it/>](#)





扫码关注生信宝典，学习更多生信知识



扫码关注宏基因组，获取专业学习资料

# 易生信，没有难学的生信知识