Calidad de los transcriptomas

2025-03-03

Descripcion del equipo

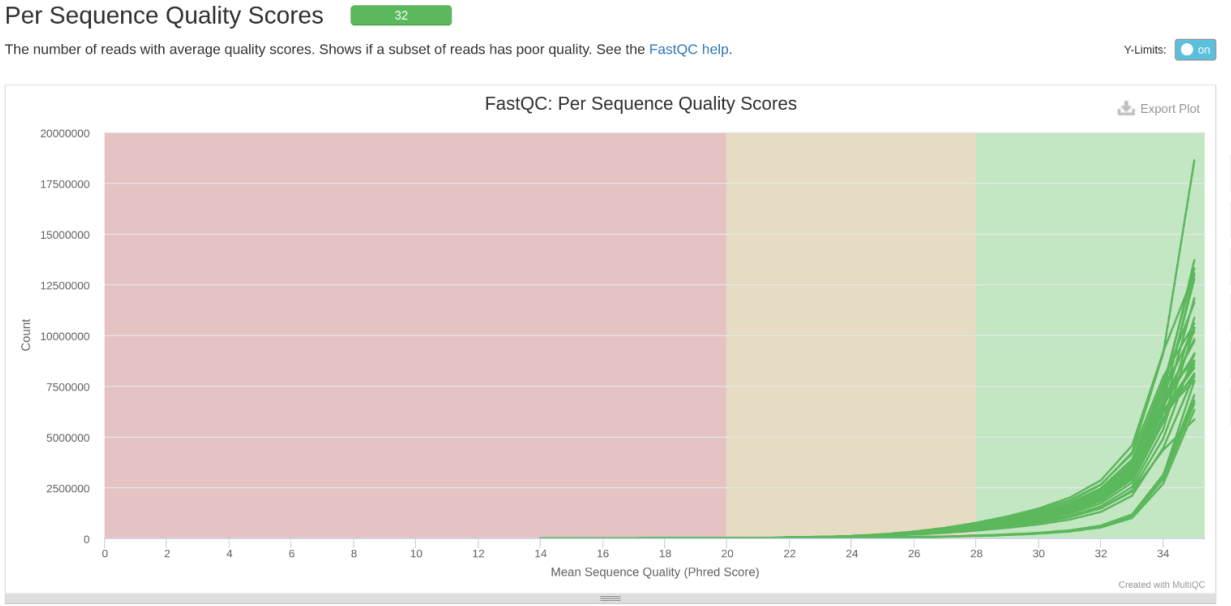
- **Equipo**: #1
- **Integrantes**:
  - Sofia Gamiño Estrada `sgamino`
  - Jorge Alfredo Suazo Victoria `jsuazo`
  - Emiliano Ferro Rodriguez `eferro`
- **Correo Electronico**:
  - ghobibohg@gmail.com
  - emiferro@comunidad.unam.mx
  - jasvpj@gmail.com

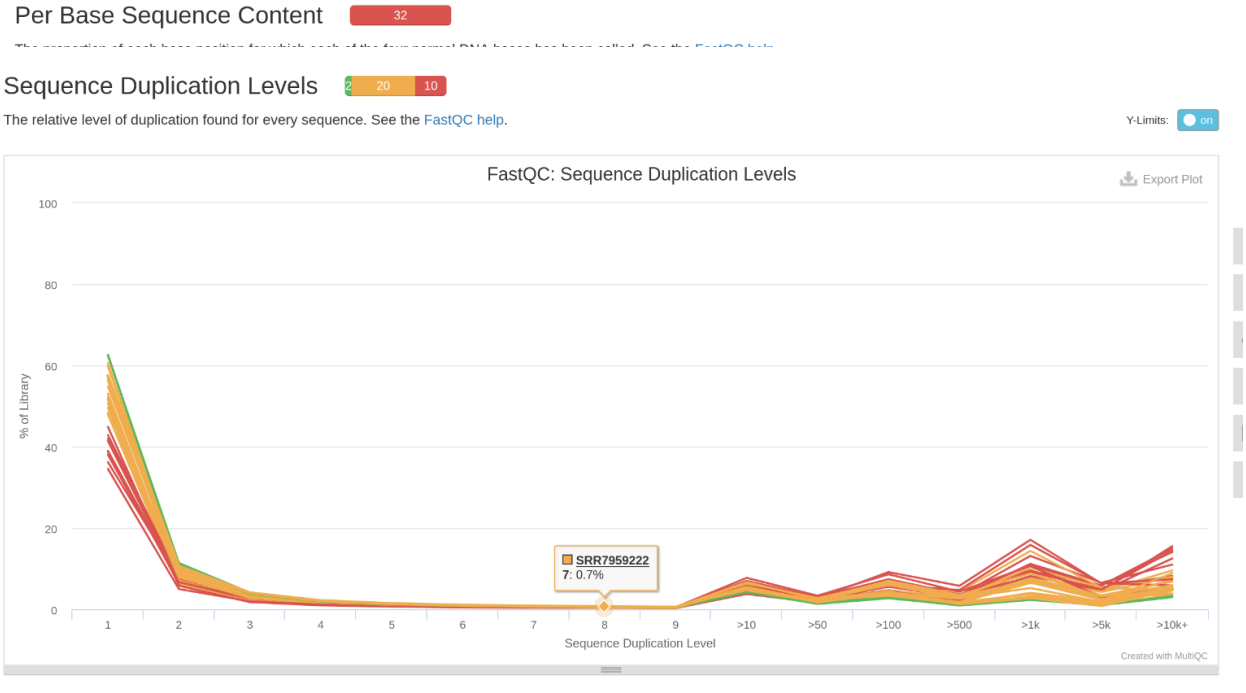
Descripcion de los datos

Descripción	Información
Bioproject	PRJNA494527
Especie	*Homo Sapiens*
Tipo de biblioteca	single-end
Método de Seleccion	RNA-Total
Número de transcriptomas	34
Número de réplicas biológicas	17 Replicas Biologicas por condicion (Control y Firma génica inducida por glucocorticoides en la piel humana)
Secuenciador Empleado	Illumina NextSeq 500
Profundidad de secuenciación de cada transcriptoma	12M a 40M
Tamaño de las lecturas	75 bp
Articulo Cientifico	Sarkar MK, Kaplan N, Tsoi LC, Xing X et al. Endogenous Glucocorticoid Deficiency in Psoriasis Promotes Inflammation and Abnormal Differentiation. J Invest Dermatol 2017 Jul;137(7):1474-1483. PMID: 28259685 Los datos se pueden descargar desde NCBI o usando ENA.

a

Calidad de las secuencias de los datos crudos





Conclusión sobre los datos

¿Son viables para continuar el análisis?

No, los datos como están no son viables para continuar con el análisis ya que hay muchas secuencias duplicadas (adaptadores) que pueden interferir al momento de alinear, ya que si los dejamos así pueden llegar a alinear en muchos sitios.

General Statistics

Copy table | Configure Columns | Plot | Showing 32/32 rows and 3/5 columns.

Sample Name	% Dups	% GC	M Seqs
SRR7959210	35.1%	46%	27.3
SRR7959211	43.0%	49%	24.7
SRR7959212	45.9%	49%	29.4
SRR7959213	31.9%	46%	31.4
SRR7959214	29.1%	45%	31.3
SRR7959215	32.5%	47%	27.0
SRR7959216	42.1%	49%	24.1
SRR7959217	61.1%	52%	27.2
SRR7959218	38.1%	50%	23.5
SRR7959219	36.3%	47%	28.9
SRR7959220	41.5%	48%	24.6
SRR7959221	29.3%	45%	23.5
SRR7959222	34.3%	45%	26.6

FastQC

FastQC is a quality control tool for high throughput sequence data, written by Simon Andrews at the Babraham Institute in Cambridge.

Sequence Quality Histograms

32

The mean quality value across each base position in the read. See the FastQC help.

Y-Limits: on

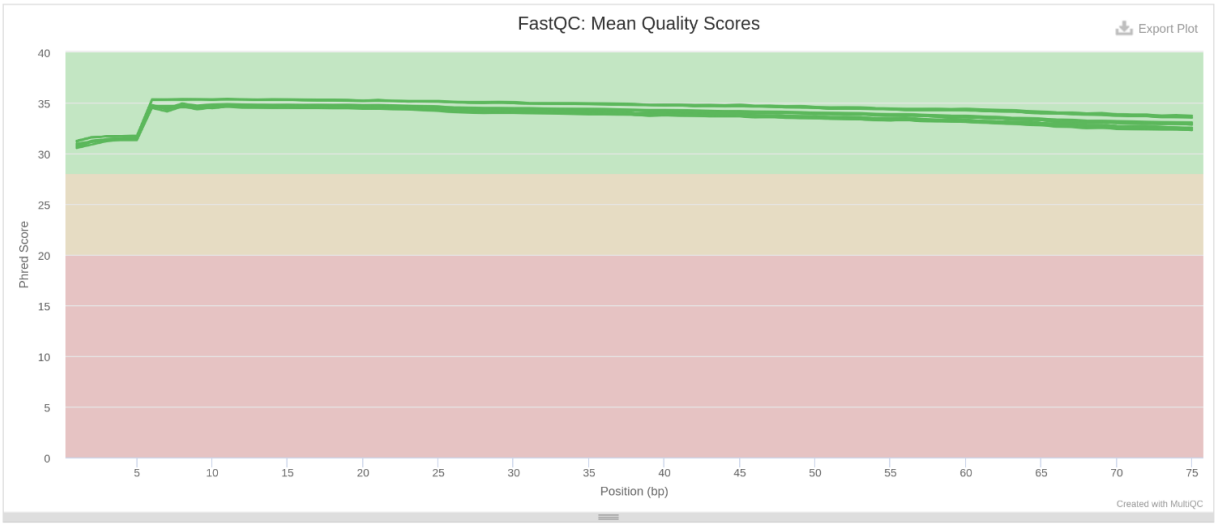
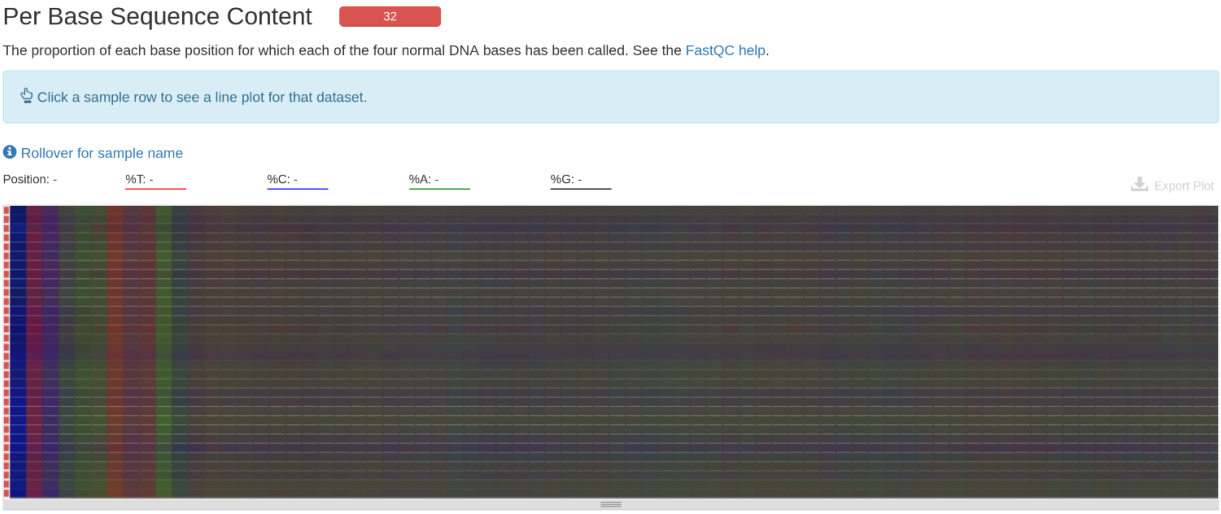


Figure 1:


Per Base Sequence Content
32
The proportion of each base position for which each of the four normal DNA bases has been called. See the FastQC help.
Click a sample row to see a line plot for that dataset.
Rollover for sample name
Position: -
%T: -
%C: -
%A: -
%G: -
Export Plot

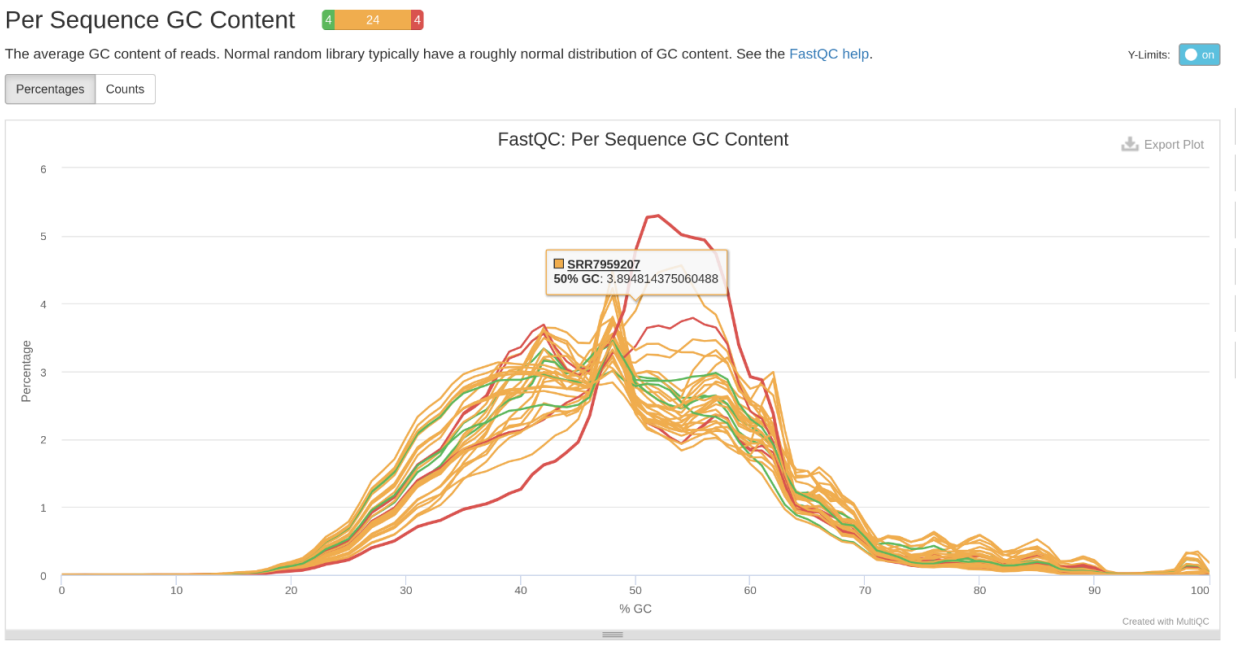

Per Sequence GC Content
4
24
4
The average GC content of reads. Normal random library typically have a roughly normal distribution of GC content. See the FastQC help.
Y-Limits:
on
Percentages
Counts
FastQC: Per Sequence GC Content
Export Plot
SRR7959207
50% GC: 3.894814375060488
Percentage
% GC
Created with MultiQC

Figure 2:

Figure 3:

Esto es evidente gracias a la alta cantidad de transcriptomas con un contenido de GC no adecuado, el hecho de que todos los fastq muestran una cantidad desbalanceada de bases por secuencia, las secuencias sobrerepresentadas en una cantidad alta y los niveles altos de duplicación. Todos estos son signos de que los archivos fastq estan crudos.

Algo importante a notar es el contenido de GC. Errores en este test pueden deberse a contaminaciones del tejido epitelial por virus o bacterias, lo cual no es nada raro en la piel humana. Es importante considerar esto, ya que en caso de que no mejore se tendría que volver a mandar a secuenciar pero ahora en condiciones esteriles y más estrictas. H

¿Qué pasos deben seguirse para mejorar la calidad de los datos?

Aparte de los adaptadores en las reads, tenemos una calidad de transciptomas muy buena y con buena covertura, por lo cual la secuenciación fue sin problemas.

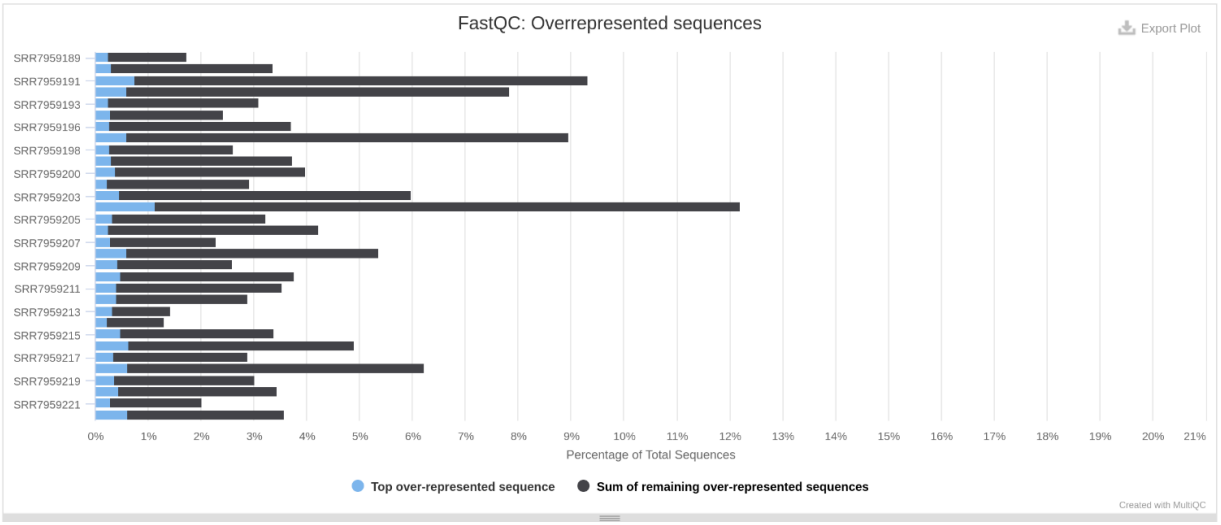
El principal problema que veo aparte de los adpatadores es checar que tanta contaminación tienen nuestras muestras con microorganismos, y que tanto pueden afectar la calidad de nuestras lecturas. En caso de que sea muy prevalente, sería bueno separar las lecturas entre las células epiteliales y los micro-organismos.

Entonces:

1. Hacer trimming de los adaptadores, cuidando que la longitud de nuestras reads se mantenga entre 50 y 60.
2. Volver a hacer un multiqc como este y volver a evaluar las calidades.
3. Checar si ha cambiado el contenido de GC. En caso de que no, seguir con los siguientes pasos.
4. Identificar la especie a la que pertenecen los transcritos contaminantes, y agruparlos para dejarlos fuera de nuestras lecturas.

Overrepresented sequences 31

The total amount of overrepresented sequences found in each library. See the FastQC help for further information.



Adapter Content 32

The cumulative percentage count of the proportion of your library which has seen each of the adapter sequences at each position. See the FastQC help. Only samples with ≥ 0.1% adapter contamination are shown.

Y-Limits: on

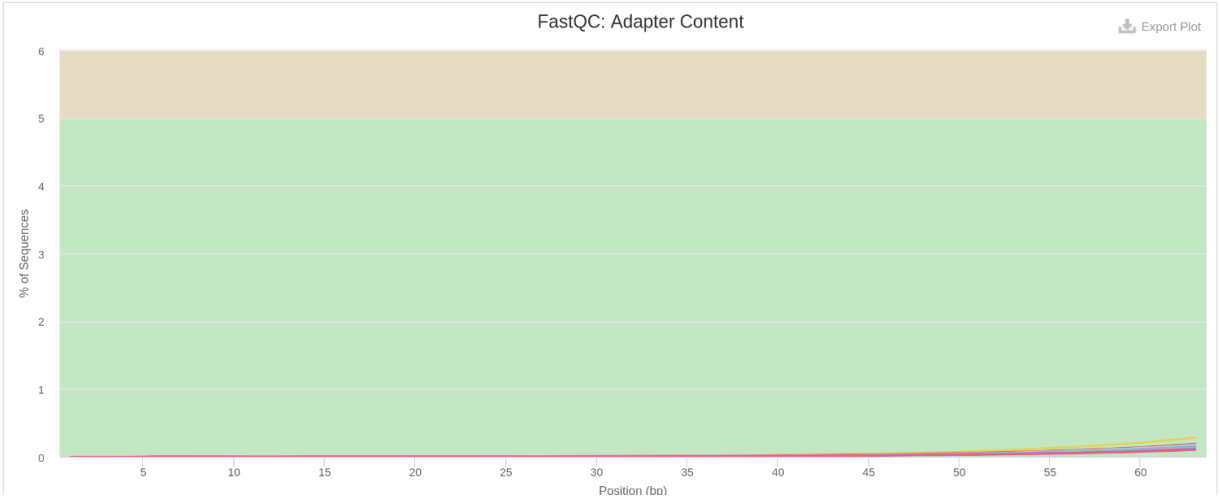


Figure 4:

5. Volver a hacer un multiqc, y repetir los pasos a partir del 3 en caso de ser necesario.