

Bitacora para el manejo de secuencias ensambladas y búsqueda con *Blastn*

Elaborado por: Dra. Edith Elizondo Reyna

Como parte de la estancia posdoctoral en el Departamento de Acuicultura bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel del Río Portilla, CICESE, Ensenada. Período 2020-2021

Para el siguiente ejercicio es necesario tener el Blast instalado en la computadora

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/data-software/>
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/data-software/>).

Se utilizarán los contigs formados por el ensamblaje obtenido en la bitacora anterior SOAP

..

```
In [ ]: import os
        from pandas import Series, DataFrame
        import pandas as pd
        from Bio import SeqIO, AlignIO, SeqRecord
        from Bio.SeqRecord import SeqRecord
        from Bio.Seq import Seq
        import matplotlib.pyplot as plt
```

```
In [ ]: cd /LUSTRE/bioinformatica_data/lga/edith/data/microalgas/
```

```
In [ ]: os.makedirs('img',exist_ok=True)
```

```
In [ ]: ls
```

Se analizarán con blastn los contigs obtenidos a la base de datos *nt*

Verifique la localización de la base de datos, en este caso se encuentra en ~/DATA/nt/ o corrija si es necesario

```
In [ ]: !grep ">" CA2/CA2_out.contig |wc -l
!grep ">" CN2/CN2_out.contig |wc -l
!grep ">" MA2/MA2_out.contig |wc -l
!grep ">" MN2/MN2_out.contig |wc -l
!grep ">" XA2/XA2_out.contig |wc -l
!grep ">" XN2/XN2_out.contig |wc -l
```

```
In [ ]: !grep -c ">" CA2/CA2.fasta
!grep -c ">" CN2/CN2.fasta
!grep -c ">" MA2/MA2.fasta
!grep -c ">" MN2/MN2.fasta
!grep -c ">" XA2/XA2.fasta
!grep -c ">" XN2/XN2.fasta
```

```
In [ ]: pwd
```

```
In [ ]: !find CA2/CA2_out.contig
```

```
In [ ]: ls /LUSTRE/bioinformatica_data/BD/blast/db/NT/
```

Ejecuta el blastn en slurum

```
In [ ]: fout = open("blastn_CN2.sh", "w")
```

```

linea=""#!/bin/sh

#
#SBATCH -p cicese
#SBATCH --job-name=blastn
#SBATCH -e blastn.%N.%j.err

#SBATCH -o blastn.%N.%j.log
#SBATCH -t 6-00:00:00
#
#SBATCH -N 1
#SBATCH -n 24
#
#SBATCH --exclusive

cd $SLURM_SUBMIT_DIR
#

shell=`/bin/basename \ `/bin/ps -p $$ -ocomm=\`
if [ -f /usr/share/Modules/init/$shell ]
then
    . /usr/share/Modules/init/$shell
else
    . /usr/share/Modules/init/sh
fi

module load gcc-7.2
export LD_LIBRARY_PATH=/LUSTRE/apps/bioinformatica/ncbi
-blast-2.11.0/lib:$LD_LIBRARY_PATH
export BLASTDB=/LUSTRE/bioinformatica_data/BD/blast/db/
NT

#
cd /LUSTRE/bioinformatica_data/lga/edith/data/microalga
s/CN2
date > tiempoCN2_blastn.txt
time /LUSTRE/apps/bioinformatica/ncbi-blast-2.11.0/bin
/blastn \
    -query CN2.fasta \
    -db /LUSTRE/bioinformatica_data/BD/blast/db/NT/nt \
    -out CN2_blastn.tsv \
    -eval 1E-6 \

```

```

-max_target_seqs 1 \\
-num_threads 24 \\
-outfmt "6 std sskingdoms stitle staxids sscinames sco
mnames sbblastnames strand"
date >> tiempoCN2_blastn.txt

head CN2_blastn.tsv
echo ""
grep -c CN2_blastn.tsv

""
fout.write(linea)
fout.close()

```

```
In [ ]: !head -100 blastn_CN2.sh
```

Mandar cola de trabajo en el servidor

```
In [ ]: !sbatch blastn_CN2.sh
```

```
In [ ]: !head tiempoCN2_blastn.txt
```

Comando que verifica el nudo donde esta llevandose a cabo el proceso en slurm

```
In [ ]: !squeue
```

```

In [ ]: fout = open("blastn_CA2.sh", "w")
        linea=""#!/bin/sh

        #
        #SBATCH -p cicese
        #SBATCH --job-name=blastn
        #SBATCH -e blastn.%N.%j.err

        #SBATCH -o blastn.%N.%j.log

```

```
#SBATCH -t 6-00:00:00
#
#SBATCH -N 1
#SBATCH -n 24
#
#SBATCH --exclusive

cd $SLURM_SUBMIT_DIR
#

shell=`/bin/basename \ `/bin/ps -p $$ -ocomm=\`
if [ -f /usr/share/Modules/init/$shell ]
then
    . /usr/share/Modules/init/$shell
else
    . /usr/share/Modules/init/sh
fi

module load gcc-7.2
export LD_LIBRARY_PATH=/LUSTRE/apps/bioinformatica/ncbi
-blast-2.11.0/lib:$LD_LIBRARY_PATH
export BLASTDB=/LUSTRE/bioinformatica_data/BD/blast/db/
NT

#
cd /LUSTRE/bioinformatica_data/lga/edith/data/microalgas/CA2
date > tiempoCA2_blastn.txt
time /LUSTRE/apps/bioinformatica/ncbi-blast-2.11.0/bin
/blastn \
    -query CA2.fasta \
    -db /LUSTRE/bioinformatica_data/BD/blast/db/NT/nt \
    -out CA2_blastn.tsv \
    -evalue 1E-6 \
    -max_target_seqs 1 \
    -num_threads 24 \
    -outfmt "6 std sskingdoms stitle staxids sscinames sco
mnames sbblastnames strand"
date >> tiempoCA2_blastn.txt

head CA2_blastn.tsv
echo ""
```

```
grep -c CA2_blastn.tsv

"""
fout.write(linea)
fout.close()
```

Mandar a la cola de trabajo del servidor

```
In [ ]: !sbatch blastn_CA2.sh
```

```
In [ ]: fout = open("blastn_MA2.sh", "w")
        linea="""#!/bin/sh

#
#SBATCH -p cicese
#SBATCH --job-name=blastn
#SBATCH -e blastn.%N.%j.err

#
#SBATCH -o blastn.%N.%j.log
#SBATCH -t 6-00:00:00
#
#SBATCH -N 1
#SBATCH -n 24
#
#SBATCH --exclusive

cd $SLURM_SUBMIT_DIR
#

shell=`/bin/basename \ `/bin/ps -p $$ -ocomm=\`
if [ -f /usr/share/Modules/init/$shell ]
then
    . /usr/share/Modules/init/$shell
else
    . /usr/share/Modules/init/sh
fi

module load gcc-7.2
export LD_LIBRARY_PATH=/LUSTRE/apps/bioinformatica/ncbi
-blast-2.11.0/lib:$LD_LIBRARY_PATH
```

```

export BLASTDB=/LUSTRE/bioinformatica_data/BD/blast/db/
NT

#
cd /LUSTRE/bioinformatica_data/lga/edith/data/microalgas/MA2
date > tiempoMA2_blastn.txt
time /LUSTRE/apps/bioinformatica/ncbi-blast-2.11.0/bin/blastn \\\
  -query MA2.fasta \\\
  -db /LUSTRE/bioinformatica_data/BD/blast/db/NT/nt \\\
  -out MA2_blastn.tsv \\\
  -evalue 1E-6 \\\
  -max_target_seqs 1 \\\
  -num_threads 24 \\\
  -outfmt "6 std sskingdoms stitle staxids sscinames sco\\
  mnames sbblastnames strand"
date >> tiempoMA2_blastn.txt

head MA2_blastn.tsv
echo ""
grep -c MA2_blastn.tsv

""
fout.write(linea)
fout.close()

```

```
In [ ]: !sbatch blastn_MA2.sh
```

```

In [ ]: fout = open("blastn_MN2.sh", "w")
        linea="" "#!/bin/sh

#
#SBATCH -p cicese
#SBATCH --job-name=blastn
#SBATCH -e blastn.%N.%j.err

#SBATCH -o blastn.%N.%j.log
#SBATCH -t 6-00:00:00
#
#SBATCH -N 1
#SBATCH -n 24

```

```
#
#SBATCH --exclusive

cd $SLURM_SUBMIT_DIR
#

shell=`/bin/basename \ `/bin/ps -p $$ -ocomm=\`
if [ -f /usr/share/Modules/init/$shell ]
then
    . /usr/share/Modules/init/$shell
else
    . /usr/share/Modules/init/sh
fi

module load gcc-7.2
export LD_LIBRARY_PATH=/LUSTRE/apps/bioinformatica/ncbi-
blast-2.11.0/lib:$LD_LIBRARY_PATH
export BLASTDB=/LUSTRE/bioinformatica_data/BD/blast/db/
NT

#
cd /LUSTRE/bioinformatica_data/lga/edith/data/microalgas/MN2
date > tiempoMN2_blastn.txt
time /LUSTRE/apps/bioinformatica/ncbi-blast-2.11.0/bin/
blastn \
    -query MN2.fasta \
    -db /LUSTRE/bioinformatica_data/BD/blast/db/NT/nt \
    -out MN2_blastn.tsv \
    -evalue 1E-6 \
    -max_target_seqs 1 \
    -num_threads 24 \
    -outfmt "6 std sskingdoms stitle staxids sscinames sco
mnames sbblastnames strand"
date >> tiempoMN2_blastn.txt

echo "" >> tiempoMN2_blastn.txt
head MN2_blastn.tsv >> tiempoMN2_blastn.txt
echo "" >> tiempoMN2_blastn.txt
grep -c MN2_blastn.tsv >> tiempoMN2_blastn.txt

" " "
```



```
fout.write(linea)
fout.close()
```

```
In [ ]: !sbatch blastn_MN2.sh
```

```
In [ ]: fout = open("blastn_XA2.sh", "w")
        linea=""#!/bin/sh

        #
        #SBATCH -p cicese
        #SBATCH --job-name=blastn
        #SBATCH -e blastn.%N.%j.err

        #SBATCH -o blastn.%N.%j.log
        #SBATCH -t 6-00:00:00
        #
        #SBATCH -N 1
        #SBATCH -n 24
        #
        #SBATCH --exclusive

        cd $SLURM_SUBMIT_DIR
        #

        shell=`/bin/basename \`/bin/ps -p $$ -ocomm=\`
        if [ -f /usr/share/Modules/init/$shell ]
        then
            . /usr/share/Modules/init/$shell
        else
            . /usr/share/Modules/init/sh
        fi

        module load gcc-7.2
        export LD_LIBRARY_PATH=/LUSTRE/apps/bioinformatica/ncbi
        -blast-2.11.0/lib:$LD_LIBRARY_PATH
        export BLASTDB=/LUSTRE/bioinformatica_data/BD/blast/db/
        NT

        #
        cd /LUSTRE/bioinformatica_data/lga/edith/data/microalgas/XA2
        date > tiempoXA2_blastn.txt
```

```

time /LUSTRE/apps/bioinformatica/ncbi-blast-2.11.0/bin
/blastn \\\
-query XA2.fasta \\\
-db /LUSTRE/bioinformatica_data/BD/blast/db/NT/nt \\\
-out XA2_blastn.tsv \\\
-evalue 1E-6 \\\
-max_target_seqs 1 \\\
-num_threads 24 \\\
-outfmt "6 std sskingdoms stitle staxids sscinames sco
mnames sbblastnames strand"
date >> tiempoXA2_blastn.txt

echo "" >> tiempoMN2_blastn.txt
head MN2_blastn.tsv >> tiempoMN2_blastn.txt
echo "" >> tiempoMN2_blastn.txt
grep -c MN2_blastn.tsv >> tiempoMN2_blastn.txt

""
fout.write(linea)
fout.close()

```

```
In [ ]: !sbatch blastn_XA2.sh
```

```

In [ ]: fout = open("blastn_XN2.sh", "w")
        linea=""#!/bin/sh

        #
        #SBATCH -p cicese
        #SBATCH --job-name=blastn
        #SBATCH -e blastn.%N.%j.err

        #SBATCH -o blastn.%N.%j.log
        #SBATCH -t 6-00:00:00
        #
        #SBATCH -N 1
        #SBATCH -n 24
        #
        #SBATCH --exclusive

        cd $SLURM_SUBMIT_DIR
        #

```

```

shell=`/bin/basename \ `/bin/ps -p $$ -ocomm=\`
if [ -f /usr/share/Modules/init/$shell ]
then
    . /usr/share/Modules/init/$shell
else
    . /usr/share/Modules/init/sh
fi

module load gcc-7.2
export LD_LIBRARY_PATH=/LUSTRE/apps/bioinformatica/ncbi-
blast-2.11.0/lib:$LD_LIBRARY_PATH
export BLASTDB=/LUSTRE/bioinformatica_data/BD/blast/db/
NT

#
cd /LUSTRE/bioinformatica_data/lga/edith/data/microalgas/
XN2
date > tiempoXN2_blastn.txt
time /LUSTRE/apps/bioinformatica/ncbi-blast-2.11.0/bin/
blastn \
    -query XN2.fasta \
    -db /LUSTRE/bioinformatica_data/BD/blast/db/NT/nt \
    -out XN2_blastn.tsv \
    -evalue 1E-6 \
    -max_target_seqs 1 \
    -num_threads 24 \
    -outfmt "6 std sskingdoms stitle staxids sscinames sco
mnames sbblastnames strand"
date >> tiempoXN2_blastn.txt

echo "" >> tiempoMN2_blastn.txt
head MN2_blastn.tsv >> tiempoMN2_blastn.txt
echo "" >> tiempoMN2_blastn.txt
grep -c MN2_blastn.tsv >> tiempoMN2_blastn.txt
echo "" >> tiempoMN2_blastn.txt
"""

fout.write(linea)
fout.close()

```

In []: !sbatch blastn_XN2.sh

```
In [ ]: cd /LUSTRE/bioinformatica_data/lga/edith/data/microalgas/
```

Comando para verificar el contenido de los archivos *.err que se generan como resultado de las corridas

```
In [ ]: !for f in blastn.*.err; do echo $f; ls -lh $f; head $f; echo "-----"; done
```

Verificar el archivo de blast XA2 que muestra error en blastn.nodo17.166792.err

```
In [ ]: !head blastn.nodo17.166792.err
```

```
In [ ]: !head blastn.nodo17.166792.log
```

Este error corresponde al archivo blastn_XA2.sh por lo que hay que visualizarlo

```
In [ ]: !head -100 blastn_XA2.sh
```

se visualiza el contenido del archivo de salida XA2_blastn.tsv

```
In [ ]: %%bash
head XA2/XA2_blastn.tsv
echo "numero de resultados es:"
wc -l XA2/XA2_blastn.tsv
```

```
In [ ]: ls -lh *.tsv
```

```
In [ ]: ls -ld *.tsv
```

se visualizan los archivos .tsv que son los que tienen la informacion del blastn

```
In [ ]: ls */*.tsv
```

se copian los archivos .tsv desde Lustre hasta mi carpeta tsv en mi direccion de omica

```
In [ ]: %%bash
        for f in ls */*.tsv
        do
        echo $f
        cp $f ~/data/microalgas/tsv/
        done
```

```
In [ ]: cd ~/data/microalgas/
```

El comando tar es usado para comprimir los archivos de interés que posteriormente serán descargados del directorio y así ser analizados en excel cada resultado de blastn. Y para empaquetar una compresión de alguna carpeta se debe usar el algo así como comprimir archivo/s o carpeta/s, se debe realizar de la siguiente manera:

!tar -czv

```
In [ ]: !tar -czvf tsv.tar.gz ./tsv
```

```
In [ ]: cd /LUSTRE/bioinformatica_data/lga/edith/data/microalgas
```

```
In [ ]: !grep ">" ~/data/microalgas
```

```
In [ ]: !grep ">"  
~/Documents/secuenciacion_masiva/sec2019/microalgas/CN2  
/CN2_clc/Contig_CN2_T.fasta |wc -l
```

```
In [ ]: !grep ">"  
~/Documents/secuenciacion_masiva/sec2019/microalgas/MA2  
/MA2_clc//Contig_MA2_T.fasta |wc -l
```

```
In [ ]: !grep ">"  
~/Documents/secuenciacion_masiva/sec2019/microalgas/MN2  
/MN2_clc/Contig_MN2_T.fasta |wc -l
```

```
In [ ]: !grep ">"  
~/Documents/secuenciacion_masiva/sec2019/microalgas/XA2  
/XA2_clc/Contig_XA2_T.fasta |wc -l
```

```
In [ ]: !grep ">"  
~/Documents/secuenciacion_masiva/sec2019/microalgas/XN2  
/XN2_clc/Contig_XN2_T.fasta |wc -l
```

```
In [ ]: pwd
```

```
In [ ]: ls
```

```
In [ ]: !head -2 CA2_blastn.tsv
```

```
In [ ]: encabezado =("qseqid", "sseqid", "pident", "length", "m  
ismatch", "gapopen","qstart",  
                    "qend", "sstart","send", "evalue", "bitsco  
re", "sskingdoms", "stitle",  
                    "staxids", "sscinames", "scomnames", "sbla  
stnames")
```

```
In [ ]: ftab=pd.read_csv("CA2_blastn.tsv", header=None, sep = "\t", names= encabezado)
ftab.head()
```

```
In [ ]: len(ftab)
```

```
In [ ]: ftab1= ftab.groupby("sskingdoms")["qseqid"].count()
ftab1 = DataFrame(ftab1)
ftab1
```

Cuántos contigs no son eucariotas?

Guardo la base de datos en formato csv

```
In [ ]: ftab.to_csv("CA2_blastn.csv", header=True, index= None)
```

en caso de haber el hecho el análisis previo y querer recuperar el archivo anterior

```
In [ ]: ftab= pd.read_csv("contigs_blastn.csv")
ftab.head(2)
```

Hay algún contig con más de una asignación (duplicados)?

```
In [ ]: ftab1= ftab.groupby("qseqid")["qseqid"].count()
ftab1 = DataFrame(ftab1)
ftab1
```

Es necesario eliminar duplicados

```
In [ ]: ftab1 =ftab.drop_duplicates(subset = 'qseqid', keep='first', inplace = False)
ftab1
```

Cuántos grupos hay a parte del que pertenece la especie analizada?

```
In [ ]: ftab2= ftab1.groupby(["sskingdoms", "sblastnames"])[ "qseqid"].count()
ftab2 = DataFrame(ftab2)
ftab2
```

```
In [ ]: ftab2= ftab1.groupby(["sskingdoms", "sscinames"])[ "qseqid"].count()
ftab2.sort_values(axis = 0, ascending=False, inplace=True)
ftab2
```

Procedimiento para simplificar tabla y graficar las 10 primeras categorías y el resto ponerlas en "otras"


```
In [ ]: lineal0=ftab2[:10]
        lineal1=ftab2[10:]
        #lineal0
        otro=sum (lineal1)
        #otro
        otros = pd.DataFrame({0:otro}, index=["Other"])
        otros
        lineal0=lineal0.append(otros)
        lineal0
```

```
In [ ]: lineal0.plot(kind='barh', figsize= (8,6))
        plt.axis([-1, max(lineal0[0])+5, -1, 10.8], label=None)
        plt.legend().set_visible(False)
        plt.xlabel("Frecuencia")
        plt.ylabel("Especies")
        plt.title("Especies con resultado de blastn")
        plt.show()
```