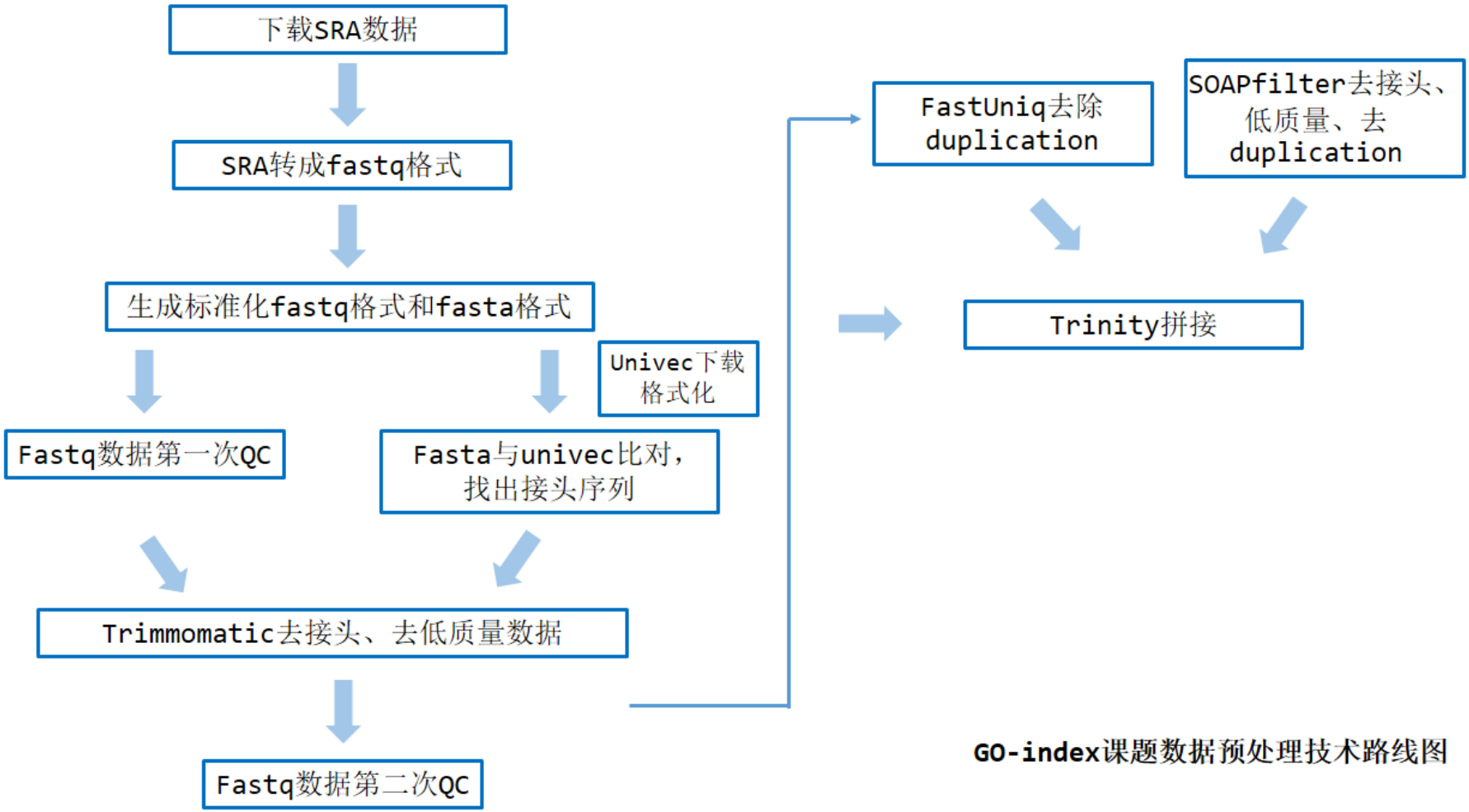
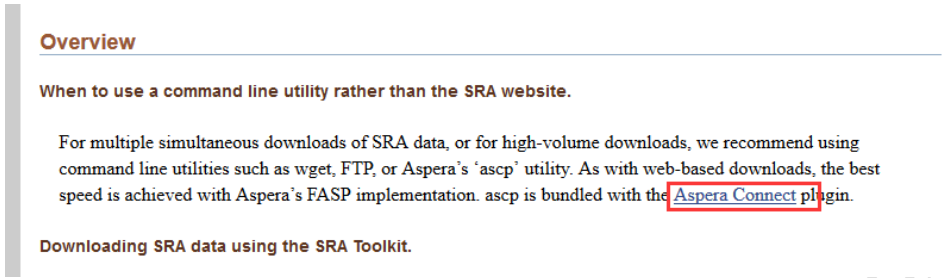


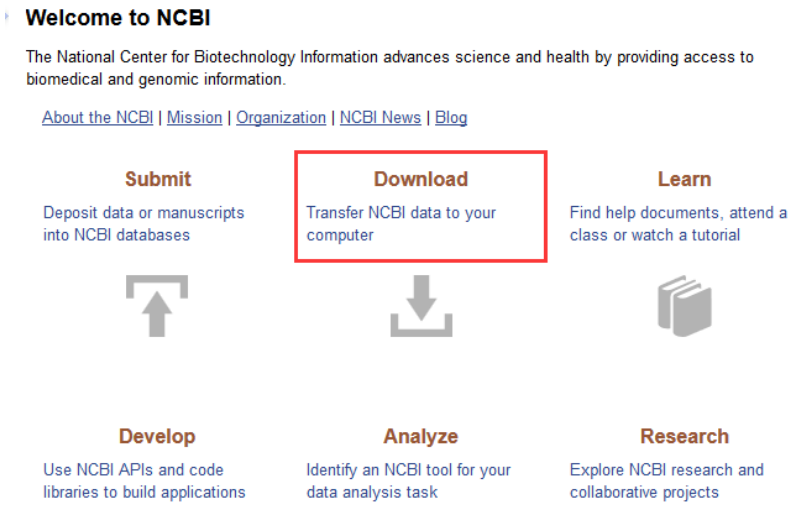
GO-index课题数据预处理技术路线图

下载 SRA 数据

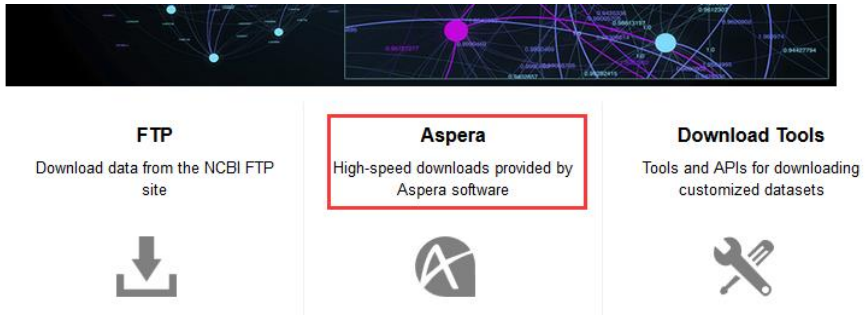
- 进入 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK158899/ 页面，点击进入 Aspera 的下载界面，下载 Aspera 软件.



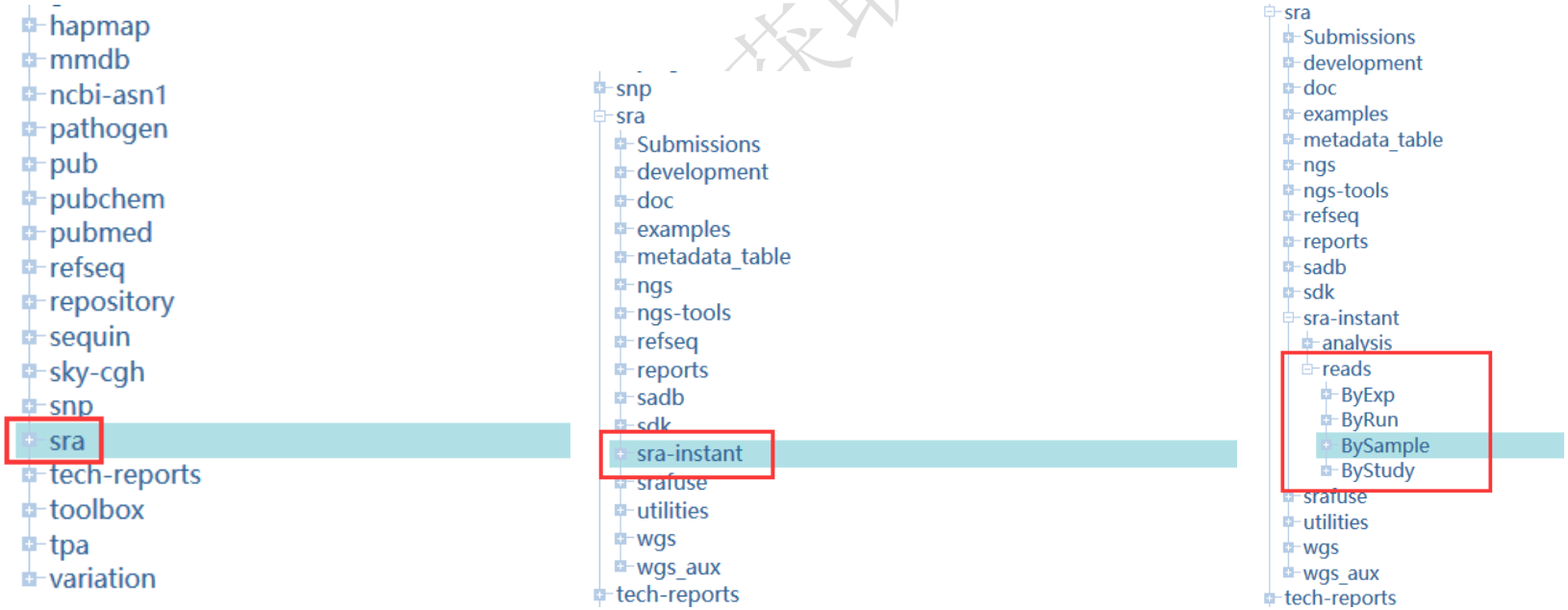
- 进入 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ ， 点击进入 Download 页面。



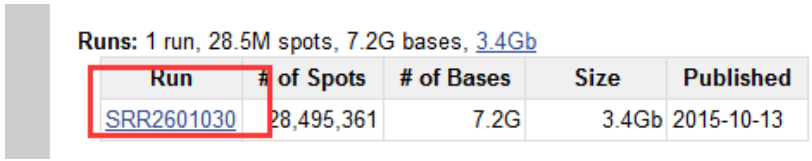
- 进入 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/download.shtml， 点击进入 Aspera。



- 依次展开



- reads 文件夹下有 4 个不同的文件夹，实际上是 4 种不同的检索方式，展开后都有对应的编号，只要是同一个数据，按照不同的方式有不同的编号，链接的都是同一个数据，最终都是 SRR 开头的数据。例如对于编号为 SRX1331783 的数据，我们按照 NCBI 的 SRA 类别检索后，得到以下信息：



Runs: 1 run, 28.5M spots, 7.2G bases, 3.4Gb

Run	# of Spots	# of Bases	Size	Published
SRR2601030	28,495,361	7.2G	3.4Gb	2015-10-13

- 如果通过 SRX 编号查找，就进入 ByExp,按照下图依次点开，找到后直接点击，如果安装了 Aspera,就可以自动唤起，然后下载。

- 按照 SRR 编号也是同理，都可以找到。

SRA 格式转换成 fastq 格式

- PE 数据：
  - /home/emma/tools_download/sratoolkit.2.6.3-ubuntu64/bin/fastq-dump **-A** /path/to/*.sra **--origfmt --split-3 -O** /path/to/outputdir/

- SE 数据：
  - /home/emma/tools_download/sratoolkit.2.6.3-ubuntu64/bin/fastq-dump **-A** /path/to/*.sra **–origfmt** -O /path/to/outputdir/

- 参数解释：
  - **-A** 下载的 sra 文件
  - **--split-3** 如果下载的 SRA 文件中只有一个文件，那么这个参数就会被忽略。如果原文件中有两个文件，那么它就会把成对的文件按*_1.fastq, *_2.fastq 这样分开。如果还有出现了第三个文件，就意味着这个文件本身是未成配对的部分。可能是当初提交的时候因为事先过滤过了一下，所以有一部分数据被删除了。
  - **--origfmt** 如果不加该参数，sra 转换成 fq 以后的序列 ID 带有 SRA 的标识，如 SRR001666.1 071112_SLXA-EAS1_s_7:5:1:817:345 length=72。加–origfmt 参数后，得到的序列 ID 是提交时的序列 ID，如 HWI-ST758:138:C394CACXX:6:1101:1216:2026。
  - **-O** 输出路径

生成标准的 fastq 格式和 fasta 格式

- （对于 PE 而言）标准的 fastq 格式，序列 ID 后面需要数值 1 和 2 表示互为 read pair。Trinity 拼接处理 PE 时需要这个

信息。Fastq 标准格式参见 https://en.wikipedia.org/wiki/FASTQ_format 的 **Illumina sequence identifiers**。

- 因为 blast 目前不能直接处理 fastq，需要将 fastq 转成 fasta。
- perl **/path/to/modified.pl** /path/to/*.fastq /path/to/modified.fq /path/to/modified.fa

Fastq 第一次 QC

- 使用 FastQC 做评估（业内常用 QC 工具）。
- /home/emma/tools_download/sratoolkit.2.6.3-ubuntu64/bin/Fastqc/fastqc -f fastq /path/to/*_1.fq /path/to/*_2.fq -o /path/to/outputdir
- 由于 RNA-seq 自身特性，即便是经过预处理（去接头和去低质量）FastQC 的很多模块都会出现 Warn 甚至 Fail（参见 https://www.biostars.org/p/160440/）。
  - **Per tile sequence quality**（参见 http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/Help/3%20Analysis%20Modules/12%20Per%20Tile%20Sequence%20Quality.html，和 https://www.biostars.org/p/170625/ ）。Hiseq 测序仪物理分区。横坐标是 cycle 数目，纵坐标是 tile 的标识。这个模块 warn 或者 fail 是测序仪器的问题，没有补救方法。权衡利弊，或者要把整个 tile 的数据删除。
  - **Per base sequence content**（https://sequencing.qcfail.com/articles/positional-sequence-bias-in-random-primed-libraries/）。 RNAseq 的前 12-13bp 几乎都会出现波动，这是由于反转录时的 random priming 并非真的那么 random（参见 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2896536/ ），无法消除。同样原因会导致 Kmer Content 模块的前 10 几 bp 的波动，也无法消除。

- **Per sequence GC content**（参见 https://www.biostars.org/p/103348/）
- **Sequence Duplication Levels**（参见 https://sequencing.qcfail.com/articles/libraries-can-contain-technical-duplication/ ）。RNAseq 的 duplication 问题很难处理。有的研究不去 duplication，直接后续分析，有些研究去 duplication。去 dupllication 又分两种。**FastUniq** 是把 PE 两端完全相同的 reads 去掉，**SOAPfilter** 看 reads 片段（前 50 or 75bp？）是否相同。SOAPfilter 主要是考虑到 Illumina 的测序特点，越往后测序错误会越多，原本是 duplication 的 reads 由于测序错误而被看成不是 duplication。**我认为先测试一下，用三种数据（SOAPfilter 去 duplication 后数据，FastUniq 去 duplication 后数据，没有去 duplication 数据）进行 trinity 拼接，看哪个效果好。**
- **Overrepresented sequences** 对我们来说比较有价值。因为从 SRA 上下载数据无法知道其 adapter（及 index）信息，overrepresented 的序列可能是接头序列。如果在该模块中出现且不是 adapter 序列，应对其进行 blast 确认其来源是污染还是样本本身的序列（特别是 RNAseq 某些高表达的序列）。

Fasta 与 univec 比对，找出接头序列

- 安装 blast+（sudo apt-get install blast+）
- 下载 univec 数据（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/univec/ ）
- 将 univec 数据库格式化：makeblastdb **-in** UniVec **-dbtype** nucl **-out** UniVec_formatted **-parse_seqids**
- makeblastdb（我的理解是对其建索引）参数解释（http://blog.csdn.net/likelet/article/details/7567426 ）：
  - **-in** 输入
  - **-dbtype** 要格式化的数据库是核酸序列还是蛋白序列
  - **-out** 输出名称

- **-parse_seqid** 推荐加上，现在有啥原因还没搞清楚

- 将*_1.fa 、*_2.fa 分别和 univec 进行比对：blastn **-query** *_1.fa **-out** *_1.blast **-db** UniVec **-outfmt** “6 qseqid qlen sallseqid slen qstart qend sstrand evalue length pident” **-evalue** 1e-10 **-num_threads** 2 **-max_target_seqs** 1

- blastn 参数解释（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279675/ ）：
  - **-query** 自己的输入文件（*_1.fa 或*_2.fa）
  - **-out** 输出
  - **-db** 作为比对的数据库（univec）
  - **-outfmt** 自己定义输出格式，数字 6 表示输出格式以 tab 键分隔；qseqid 是 query（也就是我们的 read）的 ID，qlen 是 query 的序列长度，sallseqid 是（数据库中序列，在这里是 univec）与 query 比对上的 ID（由于后面参数-max_target_seqs 1，这里 sallseqid 最后也只会出现 1 个 seqid），slen 是比对上的 seq 的长度，qstart 是 alignment 部分在 query 序列上的起始位置，qend 是 alignment 部分在 query 序列上的终止位置（通过这两个位置可以知道比对在测序序列的 3’端还是 5’端），sstrand 是比对上 seq 的正链还是反链，evalue 是该 alignment 的 Evalue 值，length 是指 alignment 部分的长度，pident 是 univec 中 seq 和测序序列 read 之间（alignment 部分）相似度。
  - **-evalue** （将数据库大小、query 长度等考虑在内）偶然出现这样比对的可能性；Evalue 值越小，表示可能性越小。
  - **-num_threads** 线程数目，在硬件容许的情况下，数值越大速度越快
  - -max_target_seqs 设置显示比对上的序列数目
- 得到 blast 结果以后进行排序和统计，得到最可能 adapter 序列。
  - 使用 awk、sort、uniq 命令进行组合：awk '{print $3, $4, $5, $6, $7, $8}' *_1.blast | grep "NGB" |sort -k 1 | uniq -c | sort -n -r | head -50 | less –S
  - $3 是 univec 中的序列 seqID
  - $4 是 seq 的长度（如果比对上的 seq 本身很长，而 alignment 部分只有很短，那这 seq 是 adapter 序列的可能性比较

小）

- $5 是 alignment 在 read 的起始位置，$6 是 alignment 在 read 的终止位置，可以判断接头污染在 read 的 3’端还是 5’端（根据 hiseq2000PE 的测序原理接头污染应该是在 3’端）
- $7 是 Evalue，命令行中已经设置了 evalue 为 1e-10，evalue 大于这个 1e-10 的 alignment 结果不会输出
- $8 是 alignment 的长度，alignment 长度太短没有意义
- grep “NGB” 是因为在 seqID 中带有“NGB”字眼的 seq 是商业测序用的接头
- sort –k 1 | uniq –c | sort –n –r | head -50 | less –S 排序统计最后显示前 50 个比对上 seq（排名越靠前越有可能是该 SRA 数据使用的 adapter）

Trimmomatic 去接头、去低质量数据

- Trimmomatic manual 参见

  http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic/TrimmomaticManual_V0.32.pdf

- PE 数据：
  - java -jar /home/emma/tools_download/Trimmomatic/trimmomatic-0.36.jar PE -threads 2 *_1.fq *_2.fq forward_paired.fq forward_unpaired.fq reverse_paired.fq reverse_unpaired.fq ILLUMINACLIP:/home/emma/tools_download/Trimmomatic/adapters/HaliotisTuberculata.fa:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:40

- SE 数据：
  - java -jar /home/emma/tools_download/Trimmomatic/trimmomatic-0.36.jar SE raw.fq clean.fq ILLUMINACLIP:TruSeq3-SE:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:40

- 输入：PE 情况下是两个输入文件，SE 情况下是一个输入文件。
- 输出：PE 情况下的输出是 4 个文件（两个 pair reads 文件，两个 single read 文件）；SE 情况下一个输出文件。
- Trimmomatic 需要自己准备接头文件（如 /home/emma/tools_download/Trimmomatic/adapters/HaliotisTuberculata.fa）。除了正常比对的方法根据接头序列以外，Trimmomatic 还针对 PE 测序的特点进行接头序列判断。（1）PE 测序可能出现空载，即两个接头之间没有 insert；（2）insert 长度太短；这两种情况都导致测序“测通”了，这时同一个 insert 片段的两个 read 会出现互补片段。Trimmomatic 利用这个特点判断接头。

  /home/emma/tools_download/Trimmomatic/adapters/HaliotisTuberculata.fa 文件内容见附录。
- 参数解释：
  - PE/SE：表示调用 PE 模式还是 SE 模式
  - ILLUMINACLIP：This step is used to find and remove Illumina adapters（Trimmomatic 称自己是针对 illumina 的数据特点）。 ILLUMINACLIP:<fastaWithAdaptersEtc>:<seed mismatches>:<palindrome clip threshold>:<simple clip threshold>，其中<fastaWithAdaptersEtc>是前面所说的 adapter 文件，<seed mismatches>是匹配时允许的错配碱基数目，<palindrome clip threshold>和<simple clip threshold>是得分阈值，超过该阈值就判断为 adapters。因为 Trimmomatic 有两种判断 adpter 的方式，所以有两个阈值。上面给出的数值是经验值。
  - LEADING，TRAILING，SLIDINGWINDOW 是为了去除低质量数据，其中 LEADING 是 5’端质量值低于 3 的碱基，TRAILING 是 3’端质量值低于 3 的碱基。Illumina 官方认为碱基质量值小于 3 的碱基就是很不可靠的碱基。SLIDINGWINDOW 是通过窗口的模式来判断质量是否可靠，（SLIDINGWINDOW 是不是可以用来减轻 Per tile sequence quality 的 quality 问题），SLIDINGWINDOW:<windowSize>:<requiredQuality>，命令行中 4 和 20 是经验值。

- MINLEN 设置输出结果最短的 read 长度，小于此阈值的 read 不输出。

经过去除接头、去接头得到的 reads 进行第二次 fastqc

- 命令参见第一次 fastqc。

Trimmomatic 接头文件：

```
>PrefixPE/1
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
>PrefixPE/2
GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACAGTCAACAATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
>PCR_Primer1
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
>PCR_Primer1_rc
AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCATT
>PCR_Primer2
GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACAGTCAACAATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
>PCR_Primer2_rc
CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGTTGACTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC
>FlowCell1
TTTTTTTTTTAATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
>FlowCell2
TTTTTTTTTTCAAGCAGAAGACGGCATACGA
```