פרוטוקול עיבוד 16S – בהדגמה על נתוני ניסוי כימותרפיה ID: 351316

חומר צפייה מומלץ: https://www.youtube.com/watch?v=cEbYCzTzQr8

f1000research-368555.pdf

פרוטוקול עבודה מוצלח:

מיקום הקבצים ב-Dropbox:
sequencing files/chemotherapy/Raw/16S_Chemo_351316

כניסה לשרת:

שם השרת: matrix.lnx.biu.ac.il
שם משתמש:
סיסמא:
ישר כאשר השרת עולה:
bash

source /home/private/software/packages/miniconda2/bin/activate qiime2-2020.8

(הדומיין משתנה מ-nissan ל-qiime2-2020.8). מדובר בעצם בכלי qiime2, המותאם לעבודה עם ריצוף מיקרוביאלי.

*הערה: אע"פ שכתוב כאן שהגרסה היא qiime2-2020.8, הגרסה יכולה להשתנות ולהיות עדכנית יותר, אבל בשרת היא תהיה שמורה עם אותו השם ע"מ שהפקודה תישאר זהה.

הקדמה כללית:

האזור שמרוצף במעבדה הוא בד"כ V4, כי הוא האזור הקבוע היחיד שמסוגל לטרגט חיידקים מסוימים שאנו רוצים בהם (כמו b. adolescentis). אזור זה הוא באורך של כ-254 נוקלאוטידים, ואת הרצף הזה אנחנו מרצפים ב"חתיכות" של 250 נוקלאוטידים בכל ריד.

שלב 1 – העברת הקבצים לשרת Matrix ולתצורת qza

קבצי ה-raw data המגיעים מהריצוף הינם בתצורת fastq.gz.
ככלל, הקבצים יגובו קודם כל בdropbox, משם נוכל לטעון אותם בכל עבודה חדשה.
1. נכנס לתיקיית העבודה הרצויה בשרת, נפתח תיקיית raw_data (**mkdir raw_data**) ולתוכה נעביר את הקבצים הדחוסים (גרירה מתיקייה ב-dropbox השולחני אל תוך תיקיית raw_data)
2. נוודא כי הקבצים עברו:

```
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix raw_data]$ ls
351316-Chemo10_S96_L001_R1_001.fastq.gz   351316-Chemo20_S106_L001_R1_001.fastq.gz
351316-Chemo10_S96_L001_R2_001.fastq.gz   351316-Chemo20_S106_L001_R2_001.fastq.gz
351316-Chemo11_S97_L001_R1_001.fastq.gz   351316-Chemo21_S107_L001_R1_001.fastq.gz
351316-Chemo11_S97_L001_R2_001.fastq.gz   351316-Chemo21_S107_L001_R2_001.fastq.gz
351316-Chemo12_S98_L001_R1_001.fastq.gz   351316-Chemo22_S108_L001_R1_001.fastq.gz
351316-Chemo12_S98_L001_R2_001.fastq.gz   351316-Chemo22_S108_L001_R2_001.fastq.gz
351316-Chemo13_S99_L001_R1_001.fastq.gz   351316-Chemo2_S88_L001_R1_001.fastq.gz
351316-Chemo13_S99_L001_R2_001.fastq.gz   351316-Chemo2_S88_L001_R2_001.fastq.gz
351316-Chemo14_S100_L001_R1_001.fastq.gz  351316-Chemo3_S89_L001_R1_001.fastq.gz
351316-Chemo14_S100_L001_R2_001.fastq.gz  351316-Chemo3_S89_L001_R2_001.fastq.gz
351316-Chemo15_S101_L001_R1_001.fastq.gz  351316-Chemo4_S90_L001_R1_001.fastq.gz
351316-Chemo15_S101_L001_R2_001.fastq.gz  351316-Chemo4_S90_L001_R2_001.fastq.gz
351316-Chemo16_S102_L001_R1_001.fastq.gz  351316-Chemo5_S91_L001_R1_001.fastq.gz
351316-Chemo16_S102_L001_R2_001.fastq.gz  351316-Chemo5_S91_L001_R2_001.fastq.gz
351316-Chemo17_S103_L001_R1_001.fastq.gz  351316-Chemo6_S92_L001_R1_001.fastq.gz
351316-Chemo17_S103_L001_R2_001.fastq.gz  351316-Chemo6_S92_L001_R2_001.fastq.gz
351316-Chemo18_S104_L001_R1_001.fastq.gz  351316-Chemo7_S93_L001_R1_001.fastq.gz
351316-Chemo18_S104_L001_R2_001.fastq.gz  351316-Chemo7_S93_L001_R2_001.fastq.gz
351316-Chemo19_S105_L001_R1_001.fastq.gz  351316-Chemo8_S94_L001_R1_001.fastq.gz
351316-Chemo19_S105_L001_R2_001.fastq.gz  351316-Chemo8_S94_L001_R2_001.fastq.gz
351316-Chemo1_S87_L001_R1_001.fastq.gz    351316-Chemo9_S95_L001_R1_001.fastq.gz
351316-Chemo1_S87_L001_R2_001.fastq.gz    351316-Chemo9_S95_L001_R2_001.fastq.gz
```

3. כעת, נבצע פתיחה של הדחיסה עם הפקודה: **gunzip *.fastq.gz, ונוודא לאחר סיומה כי כל הקבצים נפתחו:**

```
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix raw_data]$ ls
351316-Chemo10_S96_L001_R1_001.fastq   351316-Chemo20_S106_L001_R1_001.fastq
351316-Chemo10_S96_L001_R2_001.fastq   351316-Chemo20_S106_L001_R2_001.fastq
351316-Chemo11_S97_L001_R1_001.fastq   351316-Chemo21_S107_L001_R1_001.fastq
351316-Chemo11_S97_L001_R2_001.fastq   351316-Chemo21_S107_L001_R2_001.fastq
351316-Chemo12_S98_L001_R1_001.fastq   351316-Chemo22_S108_L001_R1_001.fastq
351316-Chemo12_S98_L001_R2_001.fastq   351316-Chemo22_S108_L001_R2_001.fastq
351316-Chemo13_S99_L001_R1_001.fastq   351316-Chemo2_S88_L001_R1_001.fastq
351316-Chemo13_S99_L001_R2_001.fastq   351316-Chemo2_S88_L001_R2_001.fastq
351316-Chemo14_S100_L001_R1_001.fastq  351316-Chemo3_S89_L001_R1_001.fastq
351316-Chemo14_S100_L001_R2_001.fastq  351316-Chemo3_S89_L001_R2_001.fastq
351316-Chemo15_S101_L001_R1_001.fastq  351316-Chemo4_S90_L001_R1_001.fastq
351316-Chemo15_S101_L001_R2_001.fastq  351316-Chemo4_S90_L001_R2_001.fastq
351316-Chemo16_S102_L001_R1_001.fastq  351316-Chemo5_S91_L001_R1_001.fastq
351316-Chemo16_S102_L001_R2_001.fastq  351316-Chemo5_S91_L001_R2_001.fastq
351316-Chemo17_S103_L001_R1_001.fastq  351316-Chemo6_S92_L001_R1_001.fastq
351316-Chemo17_S103_L001_R2_001.fastq  351316-Chemo6_S92_L001_R2_001.fastq
351316-Chemo18_S104_L001_R1_001.fastq  351316-Chemo7_S93_L001_R1_001.fastq
351316-Chemo18_S104_L001_R2_001.fastq  351316-Chemo7_S93_L001_R2_001.fastq
351316-Chemo19_S105_L001_R1_001.fastq  351316-Chemo8_S94_L001_R1_001.fastq
351316-Chemo19_S105_L001_R2_001.fastq  351316-Chemo8_S94_L001_R2_001.fastq
351316-Chemo1_S87_L001_R1_001.fastq    351316-Chemo9_S95_L001_R1_001.fastq
351316-Chemo1_S87_L001_R2_001.fastq    351316-Chemo9_S95_L001_R2_001.fastq
```

4. כתיבת קובץ manifest.tsv: אשר יגדיר לqiime את המיקום של כל אחד מהקבצים שלנו בשרת. כותבים אותו ידנית ומכניסים לתיקייה אחת "לפני" תיקיית הraw_data:

```
manifest - Notepad
File  Edit  Format  View  Help
SampleID        forward-absolute-filepath       reverse-absolute-filepath
351316-CP1      /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo1_S87_L001_R1_001.fastq   /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo1_S87_L001_R2_001.fastq
351316-CP2      /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo2_S88_L001_R1_001.fastq   /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo2_S88_L001_R2_001.fastq
351316-CP3      /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo3_S89_L001_R1_001.fastq   /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo3_S89_L001_R2_001.fastq
351316-CP4      /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo4_S90_L001_R1_001.fastq   /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo4_S90_L001_R2_001.fastq
351316-CP5      /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo5_S91_L001_R1_001.fastq   /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo5_S91_L001_R2_001.fastq
351316-CP6      /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo6_S92_L001_R1_001.fastq   /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo6_S92_L001_R2_001.fastq
351316-CP7      /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo7_S93_L001_R1_001.fastq   /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo7_S93_L001_R2_001.fastq
351316-CP8      /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo8_S94_L001_R1_001.fastq   /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo8_S94_L001_R2_001.fastq
351316-CP9      /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo9_S95_L001_R1_001.fastq   /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo9_S95_L001_R2_001.fastq
351316-CP10     /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo10_S96_L001_R1_001.fastq  /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo10_S96_L001_R2_001.fastq
351316-CP11     /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo11_S97_L001_R1_001.fastq  /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo11_S97_L001_R2_001.fastq
351316-CP12     /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo12_S98_L001_R1_001.fastq  /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo12_S98_L001_R2_001.fastq
351316-CP13     /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo13_S99_L001_R1_001.fastq  /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo13_S99_L001_R2_001.fastq
351316-CP14     /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo14_S100_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo14_S100_L001_R2_001.fastq
351316-CP15     /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo15_S101_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo15_S101_L001_R2_001.fastq
351316-CP16     /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo16_S102_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo16_S102_L001_R2_001.fastq
351316-CP17     /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo17_S103_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo17_S103_L001_R2_001.fastq
351316-CP18     /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo18_S104_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo18_S104_L001_R2_001.fastq
351316-CP19     /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo19_S105_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo19_S105_L001_R2_001.fastq
351316-CP20     /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo20_S106_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo20_S106_L001_R2_001.fastq
351316-CP21     /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo21_S107_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo21_S107_L001_R2_001.fastq
351316-CP22     /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo22_S108_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/raw_data/351316-Chemo22_S108_L001_R2_001.fastq
```

מיקום הקובץ: /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_16S/

5. העברת הקבצים לפורמט העבודה של qiime2 ← qza.

נפתח תיקיית qza ע"י **mkdir qza**, תיקייה זו תהווה תיקיית יעד לקבצי הfastq לאחר שיעברו המרה לקבצי qza.
מה שקורה זה בעצם נתינת הקובץ manifest.tsv כקובץ input, ממנו קורא ה-qiime לאיזה קבצים עליו לעשות את ההמרה ומאיפה לקחת אותם. הoutput שהגדרנו הוא בעצם בתוך תיקיית qza שזה עתה פתחנו, ובתוכה – תיכתב ההמרה בקובץ "demux-paired-end.qza".

הפקודה:

qiime tools import --type 'SampleData[PairedEndSequencesWithQuality]' --input-path manifest.tsv --input-format PairedEndFastqManifestPhred33V2 --output-path qza/demux-paired-end.qza

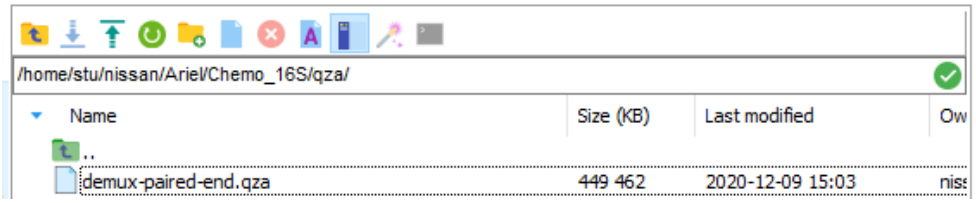
התהליך לוקח כ-15 דקות.

בסופו מקבלים הודעת אישור:

Imported manifest.tsv as PairedEndFastqManifestPhred33V2 to qza/demux-paired-end.qza

```
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix Chemo_16S]$ qiime tools import --type 'SampleData[PairedEndSequencesWithQuality]' --input-path manifest.tsv --input-format PairedEnd
FastqManifestPhred33V2 --output-path qza/demux-paired-end.qza
Imported manifest.tsv as PairedEndFastqManifestPhred33V2 to qza/demux-paired-end.qza
```

וניתן לראות שהקובץ אכן נוצר:



6. המרת קובץ qza לקובץ qzv

פותחים תיקיית vis ← **mkdir vis**

כדי שנוכל לצפות בתוכן הקובץ (qza לא נגיש לצפייה), פותחים תיקיית vis ונותנים את הפקודה:

qiime demux summarize --i-data qza/demux-paired-end.qza --o-visualization vis/demux-paired-end.qzv

מהות הפקודה: i-data-- מסמן את קובץ ה-input, הפעולה היא visualization, המיקום בסיום הפקודה הוא המיקום ושם הקובץ שנרצה לקבל (סיומת qzv).

מיד לאחר מכן, מתקבלת הודעת אישור על שמירת הוויזואליזציה:

Saved Visualization to: vis/demux-paired-end.qzv

```
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix Chemo_16S]$ qiime demux summarize --i-data qza/demux-paired-end.qza --o-visualization vis/demux-paired-end.qzv
Saved Visualization to: vis/demux-paired-end.qzv
```

7. צפייה בנתונים – נכנסים לתיקייה vis על השרת, שומרים את הקובץ שקיבלנו (סיומת qzv.) במיקום נגיש על המחשב שלנו או על ה-dropbox. מעלים אותו אל הכתובת:

https://view.qiime2.org/ בדפדפן.

שלב 2 – בדיקת איכות הרצפים והכנה לניקוי רעשים

בשלב זה "נפענח" את התוצאות שקיבלנו בדו"ח הוויזואלי של qiime2, אותו פתחנו בסעיף 7, שלב 1.

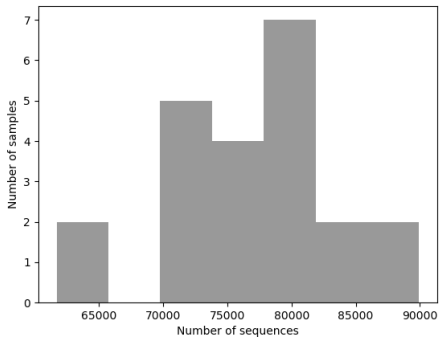
1. נסתכל בלשונית overview ← על הטבלה שהתקבלה תחת Demultiplexed sequence count summary:

Demultiplexed sequence counts summary

	forward reads	reverse reads
Minimum	61684	61684
Median	77697.5	77697.5
Mean	76692.7	76692.7
Maximum	89936	89936
Total	1687240	1687240

במקרה זה, אנחנו רואים כי סך כל הקריאות שלנו (reads) היה 1,687,240. אנו רואים כי המספר המינימלי של קריאות פר דגימה היה 61,684, ואילו המספר המקסימלי של קריאות פר דגימה היה 89,936. ערכי ה- Median, Maximum הינם ערכים אשר מחושבים באופן אוטומטי: ממוצע וחציון.

את אותם ערכים בדיוק ניתן לראות באופן ויזואלי גם בגרף:



משמאל לימין: אנו רואים כי 2 דגימות היו עם בערך 63,000 קריאות, 5 דגימות היו עם כ-72,500 קריאות, 4 דגימות

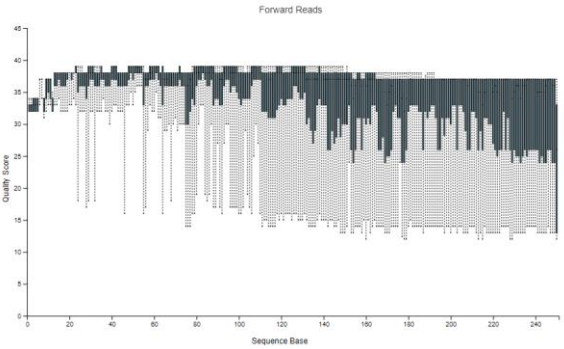
היו עם כ-75,000 קריאות, 7 דגימות היו עם כ-80,000 דגימות, 2 דגימות היו עם כ-85,000 קריאות ו-2 דגימות עם כ-87,000 דגימות.

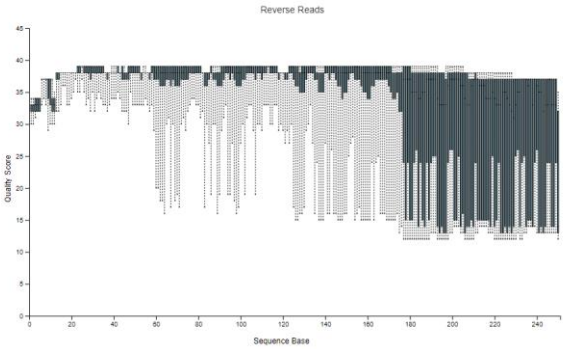
נמשיך לגלול את העמוד כלפי מטה, ונגיע אל ה-Per-sample sequence counts:
מדובר בעצם בפירוט של כל הנתונים שראינו מסוכמים קודם לכן – כמה בדיוק קריאות היו בכל דגימה.

	forward sequence count	reverse sequence count
sample ID		
351316-CP2	89936	89936
351316-CP17	86737	86737
351316-CP10	85205	85205
351316-CP18	84045	84045
351316-CP13	80162	80162
351316-CP14	79330	79330
351316-CP11	78898	78898
351316-CP21	78694	78694
351316-CP16	78412	78412
351316-CP19	78310	78310
351316-CP4	78020	78020
351316-CP1	77375	77375
351316-CP9	75716	75716
351316-CP5	75103	75103
351316-CP7	74461	74461
351316-CP6	73439	73439
351316-CP15	73297	73297
351316-CP3	73200	73200
351316-CP20	71724	71724
351316-CP12	70461	70461
351316-CP8	63031	63031
351316-CP22	61684	61684

בשלב זה, אם נראה דגימה שהיו בה משמעותית פחות קריאות מאשר לכל האחרות (למשל אם היינו מקבלים פה דגימה עם 5,000 קריאות – זה מעט מאוד ביחס לכל השאר), נבין כי יתכן שהיא עברה זיהום או שהעיבוד שלה לא היה תקין, ונסיר אותה.
* **<u>במידה ומסירים דגימה מסוימת</u>**: יש לחזור לשלב 4 בסעיף הקודם, להסיר את הדגימה מקובץ ה-manifest.tsv, ליצור שוב אובייקט qzv המבוסס על ה-manifest.tsv המעודכן וכן הלאה.

2. נעבור ללשונית Interactive Quality Plot:
ראשית כל, נראה איך נראים הריצופים שלנו באופן כללי – כאן למשל ניתן לראות כי ריצוף ה-forward היה יחסית יציב והתחיל "לזייף" בהדרגה (תהליך טבעי שקורה ככל שהריצוף מתקדם), ואילו גדיל הרוורס התחיל "לזייף" באופן חד יותר ומשמעותי יותר, החל ממיקום מסוים.





נרצה לשמור על בסיסים כמה שיותר איכותיים, אולם לא "לקצור" יותר מידי מידע על הדרך.

נתקרב באמצעות הממשק האינטראקטיבי אל הקצוות ונבחן איפה נרצה לחתוך משמאל ומימין, כל אחד מהגדילים.
תזכורת:
הנוסחה היא score = -10log(p). כאשר אנו שואפים לp נמוך ככל הניתן.
לכן, אם ה-score הוא בערך 30, זה אומר ש$p = 0.001$ וזה מצוין. נרצה להישאר תמיד מעל לציון 20, כי שם הטעות היא כבר $p=0.01$, וטעות אחת ל100 נוקליאוטידים זה די הרבה.

בכל מקרה, צריך לכל הפחות חפיפה של 40 נוקליאוטידים בין גדיל הreverse לגדיל הforward כדי להצליח בשלבים הבאים.

במקרה הזה – אני החלטתי להשאיר בגדיל הforward את הריצוף במקומות 23-249,
ואילו בגדיל הReverse – להשאיר את מקומות 23-177.
הסיבה בגללה החלטתי לקצור גם את ההתחלה היא שקיים שם אזור בו הרצף אחיד לחלוטין, כלומר כנראה החלק שם הוא עוד החלק הקבוע, ואותו נוריד. בד"כ נתחיל את הקצירה עד לנוקלאוטיד 23.

איך נעשה את החישוב:

בגדיל הforward נכתוב את הבסיס הראשון ואת הבסיס האחרון שאנחנו רוצים.
בגדיל הרוורס נכתוב את אורך הגדיל (בדרך כלל 250 בסיסים) פחות הבסיס האחרון והבסיס הראשון, וזה ייתן לנו את הטווח שלהם לפי הגדיל הקדמי.
ניצור סקאלה של שני הגדילים ונבדוק מה גודל החפיפה ביניהם, וכן מה אורך הגדיל שנישאר איתו בסוף לאחר החיתוך והאיחוד.

לדוגמה:

גדיל רוורס: מיקום התחלה: 250-177=73, מיקום סוף: 250-23=227, ולכן:
גדיל רוורס: 227 |----------| 73
גדיל forward: 249 |----------| 23

כך נראה שגודל החפיפה בין הגדילים הוא 154bp, וגודל הגדיל לאחר החיתוכים+איחוד הגדילים הוא 226.

שלב 3 – ביצוע החיתוך – Trimming
כלי עבודה: dada2
<u>התהליך לוקח כ-3 שעות</u>
הפקודה:
qiime dada2 denoise-paired --i-demultiplexed-seqs qza/demux-paired-end.qza --p-trim-left-f 23 --p-trim-left-r 23 --p-trunc-len-f 249 --p-trunc-len-r 177 --o-table qza/dada2_table.qza --p-chimera-method consensus --verbose --o-representative-sequences qza/dada2_rep-seqs.qza --o-denoising-stats qza/dada2_denoising-stats.qza > qza/denoise.log

<u>הסבר:</u> dada2 הינו כלי לביצוע trimming במיקומים אותם הגדרנו.
אנו מבקשים חיתוך עבור ריצוף paired שנמצא בקובץ הqza שיצרנו בשלב 1, סעיף 5, כלומר המיקום של קובץ ה-

input הוא qza/demux-paired-end.qza.
מסומנים בירוק – החיתוכים במיקומים המבוקשים. left זה משמאל, trunc-len זה מימין, והסימונים f או r הם forward או reverse בהתאמה.
בנוסף לחיתוך, dada2 גם מסיר לנו רצפי כימרה, וכן הוא מסיר מעט "רעש"- אם יש רצף מסוים שחוזר על עצמו פעמים רבות הוא מוגדר קונצנזוס, ואם קיים רצף יחיד ששונה ממנו בנוקלאוטיד בודד- הוא מוגדר טעות בריצוף ומתווסף לספירה של רצף הקונזצנוס.
מסומנים בכחול – הפלטים שנקבל **(עליהם נעבור בהמשך).**

הסבר לפלטים שקיבלנו:

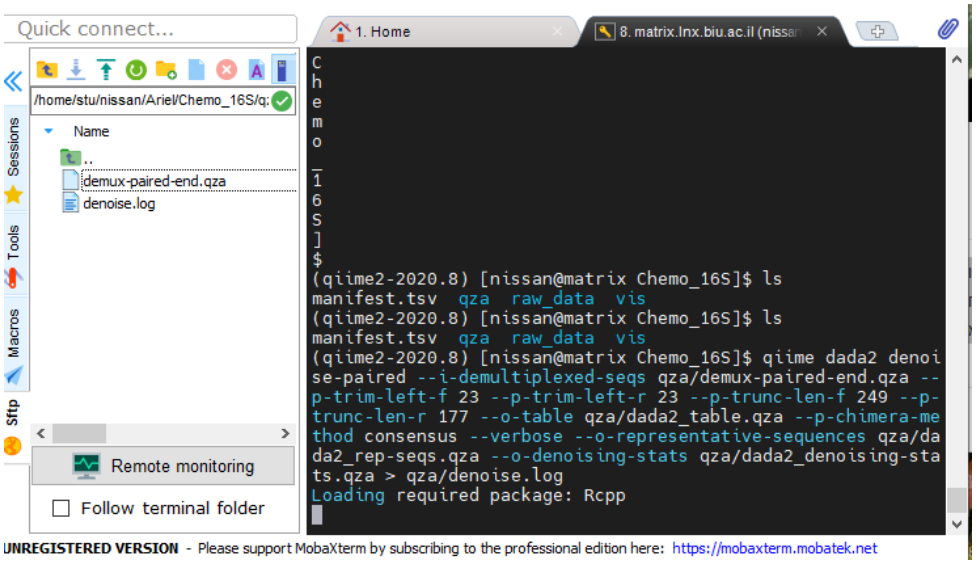
dada2_table.qza: קובץ של FeatureTable[Frequency] שמכיל countx (תדירויות) של כל רצף ייחודי בכל דגימה בdataset.

dada2_rep-seqs.qza: קובץ של FeatureData[Sequence] (רצפים מייצגים) שממפה מזהים לכל פיצ'ר מהקובץ העליון לרצף שהם מייצגים.

- בשורה התחתונה, קובץ של הרצפים המייצגים וקובץ שמכיל את מספר הפעמים שכל רצף כזה מופיע.

ביצוע denoising עם dada2 נותן לנו כפלט בעצם טבלת ASV- amplicon sequence variants.

קובץ ה-log יופיע בתיקייה ובאמצעותו נוכל לעקוב אחר התהליך.



**** --p-chimera-method consensus –verbose ← כימרות הן תוצר של ריצוף דנ"א לא ספציפי, משהו שנוצר בתהליך ה-PCR. נרצה להסיר מקטעים גנטיים אלה.**

* במידה ומרצפים צד אחד ולא paired – הפקודה תהיה qiime dada2 denoise-single ואז את ההמשך.

לאחר כ-3 שעות, נבדוק אם קיבלנו את 3 הפלטים הרצויים, ונבדוק שקובץ הלוג נראה תקין:

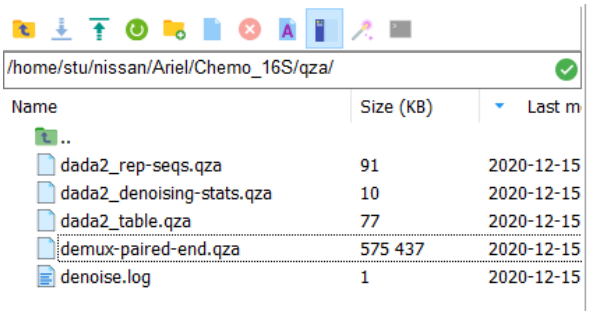
```
R version 3.5.1 (2018-07-02)
Loading required package: Rcpp
DADA2: 1.10.0 / Rcpp: 1.0.4.6 / RcppParallel: 5.0.0
1) Filtering .....................
2) Learning Error Rates
222114061 total bases in 1005041 reads from 18 samples will be used for learning the error rates.
188947708 total bases in 1005041 reads from 18 samples will be used for learning the error rates.
3) Denoise samples .....................
.....................
4) Remove chimeras (method = consensus)
6) Write output
Running external command line application(s). This may print messages to stdout and/or stderr.
The command(s) being run are below. These commands cannot be manually re-run as they will depend on temporary files that no longer exist.

Command: run_dada_paired.R /tmp/tmp6hvvkc8u/forward /tmp/tmp6hvvkc8u/reverse /tmp/tmp6hvvkc8u/output.tsv.biom /tmp/tmp6hvvkc8u/track.tsv /tmp/tmp6hvvkc8u/filt_f /tmp/tmp6hvvkc8u/filt_r
 240 210 19 22 2.0 2.0 2 independent consensus 1.0 1 1000000

Saved FeatureTable[Frequency] to: qza/dada2_table.qza
Saved FeatureData[Sequence] to: qza/dada2_rep-seqs.qza
Saved SampleData[DADA2Stats] to: qza/dada2_denoising-stats.qza
```

*אם לא התקבל פלט, כנראה שעשינו trimming אגרסיבי מידי, ולא היו מספיק התאמות של חפיפה בין הקצוות. נצטרך לחזור לשלב הקודם ולחשוב מחדש על ביצוע הtrimming.

מצב התיקייה בסיום שלב זה:



שלב 4 – ניתוח תוצאות החיתוך בקובץ denoising_stats

נצא לתיקייה אחת "מעל" תיקיית qza, ונכתוב את הפקודה:

qiime metadata tabulate --m-input-file qza/dada2_denoising-stats.qza --o-visualization vis/dada2_denoising-stats.qzv

נקבל הודעות אישור כי הוויזואליזציה נשמרה בקובץ נוסף, בסיומת **qzv**.

```
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix Chemo_16S]$ qiime metadata tabulate --m-input-f
ile qza/dada2_denoising-stats.qza --o-visualization vis/dada2_denoising-stats.
qzv
Saved Visualization to: vis/dada2_denoising-stats.qzv
```

צפייה בנתונים – נכנסים לתיקייה vis על השרת, שומרים את הקובץ שקיבלנו (סיומת qzv.) במיקום נגיש על המחשב שלנו או על ה-dropbox. מעלים אותו אל הכתובת:
https://view.qiime2.org/ בדפדפן.

נבחן את התוצאות:

sample-id #q2:types	input numeric	filtered numeric	percentage of input passed filter numeric	denoised numeric	merged numeric	percentage of input merged numeric	non-chimeric numeric	percentage of input non-chimeric numeric
351316-CP1	77375	51423	66.46	50089	32043	41.41	30152	38.97
351316-CP10	85205	59040	69.29	57695	41414	48.61	38790	45.53
351316-CP11	78898	55974	70.94	54400	39901	50.57	37942	48.09
351316-CP12	70461	50906	72.25	49224	39315	55.8	35989	51.08
351316-CP13	80162	56642	70.66	55120	39524	49.31	37599	46.9
351316-CP14	79330	57496	72.48	55793	44166	55.67	41793	52.68
351316-CP15	73297	53299	72.72	51543	45985	62.74	44269	60.4
351316-CP16	78412	57466	73.29	55980	46943	59.87	44592	56.87
351316-CP17	86737	62771	72.37	61300	47659	54.95	45233	52.15
351316-CP18	84045	59808	71.16	58111	52012	61.89	50383	59.95
351316-CP19	78310	58123	74.22	56205	45864	58.57	42904	54.79
351316-CP2	89936	66836	74.32	65018	49145	54.64	45436	50.52
351316-CP20	71724	52536	73.25	51137	39911	55.65	37638	52.48
351316-CP21	78694	57939	73.63	56291	42270	53.71	40226	51.12
351316-CP22	61684	43165	69.98	41853	32973	53.45	31843	51.62
351316-CP3	73200	54811	74.88	53154	42302	57.79	40398	55.19
351316-CP4	78020	55621	71.29	53937	39788	51	38036	48.75
351316-CP5	75103	51185	68.15	49906	33451	44.54	31844	42.4
351316-CP6	73439	51655	70.34	50186	35564	48.43	33609	45.76
351316-CP7	74461	54145	72.72	52777	38203	51.31	35903	48.22
351316-CP8	63031	47230	74.93	45836	36613	58.09	34981	55.5
351316-CP9	75716	55190	72.89	53740	41413	54.7	40189	53.08

שדה input – כמה reads נכנסו לפילטור.
שדה filtered – כמה reads עברו את הפילטור בהצלחה.
Percentage of input passed filter – בעצם חלוקה של filtered/input, כלומר כמה אחוזים עברו את הסינון.
denoised – אמור להיות ערך קרוב יחסית לfiltered. במצב אידיאלי – יהיה בהם את אותו המספר, אבל בריצופים גדולים, נכנסים ASV (Amplicon Sequence Variant) בתוך הfiltered, ואח"כ הם יורדים בשלב הdenoised. כל עוד אנחנו באותו סדר גודל והמספרים קרובים זה לזה – הכול טוב, זה פשוט אומר שאחרי הפילטור, ירדו עוד כמה רצפים שלא היו שייכים לדגימות.
merged – כמה מתוך הreads הצליחו להתמזג יחד כ-paired read.
percentage of input merged – חלוקה של merged/input, כלומר כמה מתוך סך כל הInput, עברו את השלב הזה בהצלחה. בד"כ יהיה סביב ה-50%.
non-chimeric – reads שלא שייכים לכימרה ← כאן יש בד"כ "איבוד" מידע די גדול, כי הרבה מהריצוף הוא של כימרות. כלומר, זה לא מידע על חיידקים שנאבד לנו, אלא מידע שחשבנו שהוא של חיידקים – אולם הוא של כימרות.
percentage of input non-chimeric – חלוקה של non-chimeric/input, כלומר כמה מתוך סך כל הInput, עברו את השלב הזה בהצלחה והם לא שייכים לכימרות.

****

תוספת של תמר: לא בטוחה שהחלק הבא נחוץ בגלל שנעשה סינון דה-נובו.

ייתכן שעדיף שנעשה את הסינון הזה ידנית ונעבור ישר לשלב הקלסיפיקציה (ואז מדלגים על החלק של OTU).

סינון דגימות בעל מספר רידים קטן:

אם יש דגימות שמספר הרידים הסופי שלהן קטן במיוחד, נסנן אותן מיתר הדגימות שלנו:

בדוגמה הזאת נסנן דגימות עם מספר רידים שקטן מ-14,000. (יש ליצור קודם את התיקייה לרידים לאחר פילטור-filtered-sequences).

qiime feature-table filter-samples --i-table qza/dada2_table.qza --p-min-frequency 14000 --o-filtered-table filtered-sequences/filtered-table.qza

סינון רצפים בעל מספר חזרות קטן:

נרצה לסנן רצפים שכמעט ולא חוזרים על עצמם, כמו סינגלטונים:

qiime feature-table filter-features --i-table filtered-sequences/filtered-table.qza --p-min-frequency 10 --o-filtered-table filtered-sequences/feature-frequency-filtered-table.qza

בדוגמה לעיל סיננו רצפים שחוזרים על עצמם פחות מ-10 פעמים.

אם נרצה לעבור מפה מיד לקלסיפיקציה:

qiime feature-classifier **classify-sklearn** --i-reads filtered-sequences/feature-frequency-filtered-table.qza --i-classifier **~/Documents/gg-13-8-99-nb-classifier.qza** --o-classification **qza/sk-classified.qza** --verbose

אם לא, נמשיך פשוט ל-OTU.

****

שלב 5 –OTU Clustering

בשלב הזה של האנליזה יש לנו טבלת ASV, שהיא תוצר של פקודת הdenoise שעשינו לפני כן. בטבלה זו משתמשים ברוב אנליזות ה-16S שעושים כיום, במקום בטבלת OTU. בד"כ אפשר לוותר על מעבר ל-OTU כי הוא יכול לאבד לנו מידע בדרך, ונלך ישר לשלב קבלת הזיהוי הטקסונומי. נעשה המרה ל-OTU בכל זאת אם נרצה את היכולת לחבר בין הפיצ'רים לבין מקטעי הריצוף עצמם, למקרה שנרצה להריץ רצף ב-Blast או משהו דומה.

פקודה:

qiime vsearch cluster-features-de-novo --i-table qza/dada2_table.qza --i-sequences qza/dada2_rep-seqs.qza --p-perc-identity 0.99 --o-clustered-table qza/table-dn-99.qza --o-clustered-sequences qza/rep-seqs-dn-99.qza --verbose

כאן בעצם הגדרנו לבצע קליסטור פילוגנטי לפי התאמה של 99% לפחות (הכנה לעץ פילוגנטי).

לקרוא על קליסטור דה-נובו של OTU. בגדול, מצאנו את הרצפים הדומיננטיים (אנחנו מניחים שאלה רצפי המקור, שלא עברו מוטציות בשעתוק) ומהם נמשיך הלאה לביצוע מיפוי לdatabase כדי לזהות באילו חיידקים מדובר.

נקבל את הפלט הבא:

```
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix Chemo_16S]$ qiime vsearch cluster-features-de-novo --i-table q
za/dada2_table.qza --i-sequences qza/dada2_rep-seqs.qza --p-perc-identity 0.99 --o-clustered-
table qza/table-dn-99.qza --o-clustered-sequences qza/rep-seqs-dn-99.qza --verbose
Running external command line application. This may print messages to stdout and/or stderr.
The command being run is below. This command cannot be manually re-run as it will depend on t
emporary files that no longer exist.

Command: vsearch --cluster_size /tmp/tmpx0f900e7 --id 0.99 --centroids /tmp/q2-DNAFASTAFormat
-qe0j6v_6 --uc /tmp/tmpn2vdoaw8 --qmask none --xsize --threads 1 --minseqlength 1 --fasta_wid
th 0

vsearch v2.7.0_linux_x86_64, 251.6GB RAM, 32 cores
https://github.com/torognes/vsearch

Reading file /tmp/tmpx0f900e7 100%
284631 nt in 1102 seqs, min 221, max 397, avg 258
Sorting by abundance 100%
Counting k-mers 100%
Clustering 100%
Sorting clusters 100%
Writing clusters 100%
Clusters: 959 Size min 1, max 8, avg 1.1
Singletons: 859, 77.9% of seqs, 89.6% of clusters
Saved FeatureTable[Frequency] to: qza/table-dn-99.qza
Saved FeatureData[Sequence] to: qza/rep-seqs-dn-99.qza
```

<u>שורה נוספת:</u>

<u>נמיר בעצם את הרצפים שקיבלנו לוויזואליזציה שאפשר לצפות בה:</u>

qiime feature-table tabulate-seqs --i-data qza/rep-seqs-dn-99.qza --o-visualization vis/rep-seqs-dn-99.qzv

```
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix Chemo_16S]$ qiime feature-table tabulate-seqs --i-data qza/
rep-seqs-dn-99.qza --o-visualization vis/rep-seqs-dn-99.qzv
Saved Visualization to: vis/rep-seqs-dn-99.qzv
```

אני אוהבת להסתכל באתר של Qiime ולשמור לי בקובץ את כל הרצפים שקיבלנו כדי שאוכל לחזור אליהם מאוחר יותר. זה אמור להיראות ככה:

Sequence Table

To BLAST a sequence against the NCBI nt database, click the sequence and then click the *View report* button on the resulting page.

Download your sequences as a raw FASTA file

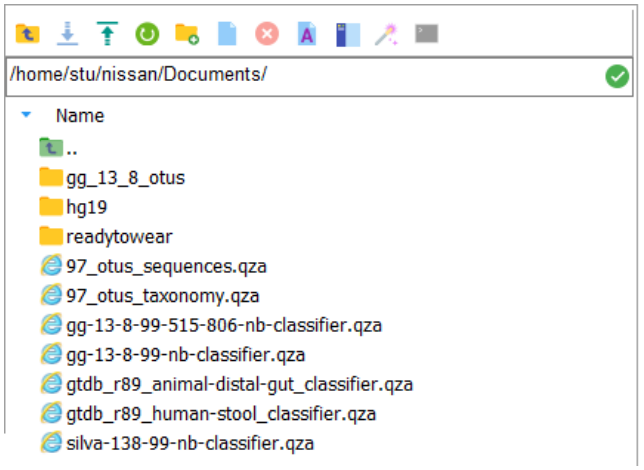
Click on a Column header to sort the table.

Feature ID	Sequence Length	Sequence
6b9d63c2a1093bb766327df9bfc55146	289	TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGTGGCAGAACAAGTCTGGAGTAAAAGGTATGGGCTCAACCCGTACTGGCTCTGGAAACTGTTCAGCTAGAGAACAGAAGA
ddab6fb5c2b416681fb94cc0871063cf	290	TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGCAGGCGGCATGATAAGTCTGATGTGAAAACCCAAGGCTCAACCATGGGACTGCATTGGAAACTGTCGTGCTGGAGTGTCGGAG
8fc87512b8ee610148c8856a06c19bb2	290	TGCCAGCAGCCGCGGTAAAACGTAGGTCACAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGGAGCGCAGGCGGGAAGACAAGTTGGAAGTGAAATCCATGGGCTCAACCCATGAACTGCTTTCAAAACTGTTTTTCTTGAGTAGTGCAG
7b732367f18a1754488d22facdc75c4c	290	TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGCACGGCAAGCCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGGACTGCATTTGGAACTGCTGAGCTAGAGTGTCGGAG
aaf6d4e6f4c5a590f57a583cee247d41	290	TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGCAAGGCAAGTCTGAAGTGAAAGCCCGGTGCTTAACGCCGGGACTGCTTTGGAAACTGTTTAGCTGGAGTGCCGGAG

כעת נבדוק התאמה – כלומר נשווה לDatabases השונים כדי לזהות למי שייכים הרצפים שקיבלנו (כי הFeature ID לא באמת אומר לנו משהו).

שלב 6 – קבלת זיהוי טקסונומי

נרצה להשוות למאגרי המעבדה ששמורים אצלנו במיקום הבא בשרת:
/home/stu/nissan/Documents/ זה נראה ככה:



נבנה את השאילתא באופן הבא (בערך – לא תבנית קבועה):
qiime feature-classifier **CLASIFFICATION_METHOD** qza/rep-seqs-dn-99.qza
--i-reference-reads **OTU_DATABASE_PATH** --i-reference-taxonomy **TAXONOMY_DATABASE_PATH**
--o-classification **RESULTS_FULL_PATH** --verbose

הדגמה – שיטת קלסיפיקציה vsearch עבור דאטאבייס:
qiime feature-classifier **classify-consensus-vsearch** --i-query qza/rep-seqs-dn-99.qza
--i-reference-reads **~/Documents/97_otus_sequences.qza** --i-reference-taxonomy
~/Documents/97_otus_taxonomy.qza
--o-classification **qza/vs-classifier.qza** --verbose

שיטה שנייה sklearn (עבור DB gg. יש אפשרות להשתמש בgg, gtdb או silva).

qiime feature-classifier **classify-sklearn** --i-reads **qza/rep-seqs-dn-99.qza** --i-classifier
~/Documents/gg-13-8-99-nb-classifier.qza --o-classification **qza/sk-classified.qza** --verbose

במעבדה משתמשים בד"כ בשיטה של sklearn, ואכן ניתן לראות שהיא מקבלת ASV בלבד ואין צורך ב-OTU. נשתמש בדרך כלל בבסיס הנתונים gtdb, אלא אם כן אנחנו חושדים שקיים דנ"א אאוקריוטי בדגימה (לדוגמה- עכברים), ואז נשתמש ב-GG או silva.

path לסילבה:

"home/stu/nissan/Documents/silva-138-99-nb-classifier.qza/"

Path ל-gtdb:

"home/stu/nissan/Documents/gtdb_r89_animal-distal-gut_classifier.qza/"

"home/stu/nissan/Documents/gtdb_r89_human-stool_classifier.qza/"

לא משנה באיזה מהשיטות בחרנו (כמו שניסן אומר – למה צריך לבחור אם אפשר גם וגם), עלינו לנקות את המידע שם.

מעבר לקובץ לצפייה ויזואלית:

qiime metadata tabulate --m-input-file qza/sk-classified.qza --o-visualization vis/taxonomy.qzv

שלב 7 – ניקוי המידע:

ניקוי ראשון – הסרת רצפי DNA מיטוכונדריאליים או כלורופלסטים:
qiime taxa filter-table --i-table qza/table-dn-99.qza --i-taxonomy qza/sk-classified.qza --p-exclude mitochondria,chloroplast --o-filtered-table qza/table-clean.qza

בירוק – הטבלה שיצרנו בשלב 5
בצהוב – הקובץ שיצרנו בשלב 6
בכחול – הרצפים שנרצה להסיר
בוורוד – שם הטבלה החדשה לאחר ההסרה וה-Path שלה

*****

תוספת תמר:

הסרת רצפים של ארכיאה ושל אאוקריוטים:

ארכיאה:

qiime taxa filter-table --i-table qza/table-clean.qza --i-taxonomy qza/sk-classified.qza --p-exclude "k__Archaea" --o-filtered-table qza/table-archaea-clean.qza

אאוקריוטים:

qiime taxa filter-table --i-table qza/table-archaea-clean.qza --i-taxonomy qza/sk-classified.qza --p-exclude "k__Eukaryota" --o-filtered-table qza/table-archaea-eukaryota-clean.qza

עכשיו נעשה את אותם סינונים מהרצפים: (לדברי אריאל אין צורך בשלב הזה, לבדוק עם/בלי)

מיטוכונדריה + כלורופלסט:

qiime taxa filter-seqs --i-sequences qza/rep-seqs-dn-99.qza --i-taxonomy qza/sk-classified.qza --p-exclude mitochondria,chloroplast --o-filtered-sequences qza/rep-seq-clean.qza

ארכיאה:

qiime taxa filter-seqs --i-sequences qza/rep-seq-clean.qza --i-taxonomy qza/sk-classified.qza --p-exclude "k__Archaea" --o-filtered-sequences qza/rep-seq-archaea-clean.qza

אאוקריוטים:

qiime taxa filter-seqs --i-sequences qza/rep-seq-archaea-clean.qza --i-taxonomy qza/sk-classified.qza --p-exclude "k__Eukaryota" --o-filtered-sequences qza/rep-seq-archaea-eukaryota-clean.qza

צפייה בתוצאות:

qiime taxa barplot --i-table qza/table-archaea-eukaryota-clean.qza --i-taxonomy qza/sk-classified.qza --m-metadata-file meta-data.tsv --o-visualization vis/taxa-bar-plots.qzv

נראה שהניקויים 2+3 לא משפיעים הרבה, אבל אם נראה שלא קיבלנו מספיק תוצאות לאחר שלושתם אפשר לחזור לראשון בלבד.

בכל מקרה נוודא שבסוף יש לקובץ הסופי שם אחיד:

mv qza/table-archaea-eukaryota-clean.qza qza/filtered-table.qza

mv qza/rep-seq-archaea-eukaryota-clean.qza qza/filtered-rep-seq.qza

שם הקובץ שאיתו בחרנו להמשיך הלאה השם החדש של הקובץ

****

ניקוי שני ושלישי:
אני אישית מדלגת על השלב הזה כדי לא לאבד data שגם ככה עבר "קיצוץ רציני" בשלבים של הtrimming והכימרות. אבל זה מה שעושים אם רוצים לסנן את המידע עוד קצת:
ניקוי שני – סינון החיידקים (הטקסונומיות) שלא נמצאו לפחות ב-X דגימות. דוגמה עבור x=3:

qiime feature-table filter-features –i-table qza/vs-classifier-clean.qza –p-min-samples 3 –o-filtered-table qza/vs-mincount-table.qza

ניקוי שלישי – להוריד חיידקים שהכמות שלהם הייתה פחות מy. דוגמה עבור y = 38:

qiime feature-table filter-features –i-table qza/vs-mincount-table.qza –p-min-frequency 38 –o-filtered-table qza/vs-frequency-clean.qza

שלב 8 – הכנת עץ לחישוב a-diversity

a-diversity- רמת השונות של החיידקים בתוך אותה דוגמה

β-diversity- רמת השונות של החיידקים בין קבוצות שונות (מאפשר להשוות בין לפני ואחרי טיפול).

ביצוע alignment de novo באמצעות mafft ליצירת עץ:

qiime alignment mafft --i-sequences qza/rep-seqs-dn-99.qza --o-alignment qza/aligned-rep-seqs.qza

:mask/ filter the alignments (remove highly variable positions)
qiime alignment mask --i-alignment qza/aligned-rep-seqs.qza --o-masked-alignment qza/masked-aligned-rep-seqs.qza

בניית העץ:
qiime phylogeny fasttree --i-alignment qza/masked-aligned-rep-seqs.qza --o-tree qza/fasttree-tree.qza --verbose

מציאת שורש העץ:
qiime phylogeny midpoint-root --i-tree qza/fasttree-tree.qza --o-rooted-tree qza/fastree-rooted.qza

ייצוא העץ:

qiime tools export --input-path qza/fastree-rooted.qza --output-path exports

הפקודה פותחת תיקייה חדשה exports ושמה שם את העץ המוכן.

****

תוספת תמר:

שיטה מהירה וישירה יותר:

qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree --i-sequences qza/filtered-rep-seq.qza --o-alignment qza/aligned-rep-seqs.qza --o-masked-alignment qza/masked-aligned-rep-seqs.qza --o-tree qza/unrooted-tree.qza --o-rooted-tree qza/rooted-tree.qza

אבל: העץ שיוצא מושרש לא לפי mid-point, אז אולי עדיף את השיטה של אריאל.

קבצי הפלט:

```
Saved FeatureData[AlignedSequence] to: aligned-rep-seqs.qza
Saved FeatureData[AlignedSequence] to: masked-aligned-rep-seqs.qza
Saved Phylogeny[Unrooted] to: unrooted-tree.qza
Saved Phylogeny[Rooted] to: rooted-tree.qza
```

קובץ מיפוי, קובץ מיפוי לאחר סינון, עץ לא מושרש ועץ מושרש.

ייצוא העץ:

qiime tools export --input-path qza/rooted-tree.qza --output-path exports

הפקודה פותחת תיקייה חדשה exports ושמה שם את העץ המוכן.

****

שלב 9 – ייצוא התוצאות 😊:
בעצם מכניסים את הטבלה הנקייה שלנו מהשלב הקודם:

qiime tools export --input-path qza/table-clean.qza --output-path exports

הפקודה מייצאת לתוך תיקיית exports אובייקט בשם feature-table.biom.

כעת, נכתוב את הפקודה הבאה כדי לייצר אובייקט בשם otu_table.txt:
biom convert -i exports/feature-table.biom -o exports/otu_table.txt --to-tsv

כעת נשנה ידנית את הכותרת בתוך קובץ הטקסט: נמחק את הכותרת ואת ה-#:

```
1 # Constructed from biom file
2 #OTU ID 394751-ON1_S136 394751-ON10_S145  394751-ON11_S146  394751-ON12_S147  394751-ON13_S148  394751-ON14_S149  394751
```

כך זה ייראה:

```
1 OTU ID  394751-ON1_S136 394751-ON10_S145  394751-ON11_S146  394751-ON12_S147  394751-ON13_S148  394751-ON14_S149  394751
```

נריץ את הפקודה:

biom convert -i exports/feature-table.biom -o exports/json-table.biom --table-type="OTU table" --to-json

נקבל אובייקט json-table.biom.

נרצה ליצור קובץ Taxonomy.tsv ולכן נעשה (על הטבלה לפני הניקוי):

qiime tools export --input-path qza/sk-classified.qza --output-path exports

בסוף השלב הזה, אמורים להיות לנו 5 תוצרים בתיקיית exports:

Name	Size (KB)	Last modified	Owner	Group	Access
..					
feature-table.biom	79	2021-11-21 ...	nissan	stu	-rw-r--r-
json-table.biom	70	2021-11-21 ...	nissan	stu	-rw-r--r-
otu_table.txt	68	2021-11-21 ...	nissan	stu	-rw-r--r-
taxonomy.tsv	99	2021-11-21 ...	nissan	stu	-rw-r--r-
tree.nwk	43	2021-11-21 ...	nissan	stu	-rw-r--r-

אותם נייצא ונעבור ל R😊

****

השלב הזה לא אמור להיות נחוץ, ועם זאת הוא היה בניסיון הראשון שלי לאנליזה.

לבדוק גם באנליזות המשך- לנסות לסיים פה ואם לא עובד להמשיך גם לשלב הזה.

שלב נוסף, רק אם צריכים את המידע הזה:

##קודם כל: לשנות את ההתחלה של הקובץ טקסונומיה מ-Feature ID ל- OTU ID#

```
biom add-metadata -i exports/feature-table.biom -o exports/feature-table-taxa.biom --observation-metadata-fp exports/taxonomy.tsv --sc-separated taxonomy

biom summarize-table -i exports/feature-table-taxa.biom

biom convert -i exports/feature-table-taxa.biom -o exports/feature-table-taxa-json.biom --table-type="OTU table" --to-json
```

לשנות את ההתחלה של הקובץ טקסונומיה ל- OTU ID (להוריד את ה-#)

```
qiime tools export --input-path qza/unrooted-tree.qza --output-path exports
```

****

תוספת תמר:

ניצור ויזואליזציה:

```
qiime feature-table summarize --i-table qza/filtered-table.qza --o-visualization qza/filtered-table.qzv --m-sample-metadata-file meta-data.tsv
```

נבדוק מהי התדירות המינימלית שיש לנו בקובץ, ולפיה נבצע את הפקודה הבאה: (בדוגמה שלנו- 37199)

```
qiime diversity core-metrics-phylogenetic --i-phylogeny qza/rooted-tree.qza --i-table qza/filtered-table.qza --p-sampling-depth 37199 --m-metadata-file meta-data.tsv --output-dir diversity-metrics-results
```

נמצא אלפא דייברסיטי לפי faith (a measure of community richness):

```
qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity diversity-metrics-results/faith_pd_vector.qza --m-metadata-file meta-data.tsv --o-visualization diversity-metrics-results/faith-pd-group-significance.qzv
```

ולפי שאנון:

qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity diversity-metrics-results/shannon_vector.qza --m-metadata-file meta-data.tsv --o-visualization diversity-metrics-results/shannon-group-significance.qzv

בטא דייברסיטי בשיטות שונות:

qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix diversity-metrics-results/weighted_unifrac_distance_matrix.qza --m-metadata-file meta-data.tsv --m-metadata-column day --o-visualization diversity-metrics-results/weighted-unifrac-day-significance.qzv --p-pairwise

qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix diversity-metrics-results/unweighted_unifrac_distance_matrix.qza --m-metadata-file meta-data.tsv --m-metadata-column day --o-visualization diversity-metrics-results/unweighted-unifrac-subject-group-significance.qzv --p-pairwise

PCoA:

qiime emperor plot --i-pcoa diversity-metrics-results/unweighted_unifrac_pcoa_results.qza --m-metadata-file meta-data.tsv --p-custom-axes mouseID --o-visualization diversity-metrics-results/unweighted-unifrac-emperor-day.qzv

****

עוד דברים שעשיתי (מהסרטון):

qiime alignment mafft --i-sequences qza/rep-seqs-dn-90.qza --o-alignment aligned_rep_seqs

```
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix Chemo_16S]$ qiime alignment mafft --i-sequences qza/re
-seqs-dn-90.qza --o-alignment aligned_rep_seqs
Saved FeatureData[AlignedSequence] to: aligned_rep_seqs.qza
```

qiime alignment mask --i-alignment aligned_rep_seqs.qza --o-masked-alignment masked_aligned_rep_seqs.qza

```
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix Chemo_16S]$ qiime alignment mask --i-alignment aligned
rep_seqs.qza --o-masked-alignment masked_aligned_rep_seqs.qza
Saved FeatureData[AlignedSequence] to: masked_aligned_rep_seqs.qza
```

qiime phylogeny fasttree --i-alignment masked_aligned_rep_seqs.qza --o-tree unrooted_tree

```
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix Chemo_16S]$ qiime phylogeny fasttree --i-alignment mas
ed_aligned_rep_seqs.qza --o-tree unrooted_tree
Saved Phylogeny[Unrooted] to: unrooted_tree.qza
```

qiime phylogeny midpoint-root --i-tree unrooted_tree.qza --o-rooted-tree rooted_tree

```
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix Chemo_16S]$ qiime phylogeny midpoint-root --i-tree unr
oted_tree.qza --o-rooted-tree rooted_tree
Saved Phylogeny[Rooted] to: rooted_tree.qza
```

qiime diversity core-metrics-phylogenetic --i-phylogeny rooted_tree.qza --i-table qza/table-dn-90.qza --p-sampling-depth 30152 --m-metadata-file meta-data.tsv --output-dir core_metrics_results

```
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix Chemo_16S]$ qiime diversity core-metrics-phylogenetic
-i-phylogeny rooted_tree.qza --i-table qza/table-dn-90.qza --p-sampling-depth 30152 -
m-metadata-file meta-data.tsv --output-dir core_metrics_results
Saved FeatureTable[Frequency] to: core_metrics_results/rarefied_table.qza
Saved SampleData[AlphaDiversity] to: core_metrics_results/faith_pd_vector.qza
Saved SampleData[AlphaDiversity] to: core_metrics_results/observed_features_vector.qz
Saved SampleData[AlphaDiversity] to: core_metrics_results/shannon_vector.qza
Saved SampleData[AlphaDiversity] to: core_metrics_results/evenness_vector.qza
Saved DistanceMatrix to: core_metrics_results/unweighted_unifrac_distance_matrix.qza
Saved DistanceMatrix to: core_metrics_results/weighted_unifrac_distance_matrix.qza
Saved DistanceMatrix to: core_metrics_results/jaccard_distance_matrix.qza
Saved DistanceMatrix to: core_metrics_results/bray_curtis_distance_matrix.qza
Saved PCoAResults to: core_metrics_results/unweighted_unifrac_pcoa_results.qza
Saved PCoAResults to: core_metrics_results/weighted_unifrac_pcoa_results.qza
Saved PCoAResults to: core_metrics_results/jaccard_pcoa_results.qza
Saved PCoAResults to: core_metrics_results/bray_curtis_pcoa_results.qza
Saved Visualization to: core_metrics_results/unweighted_unifrac_emperor.qzv
Saved Visualization to: core_metrics_results/weighted_unifrac_emperor.qzv
Saved Visualization to: core_metrics_results/jaccard_emperor.qzv
Saved Visualization to: core_metrics_results/bray_curtis_emperor.qzv
```

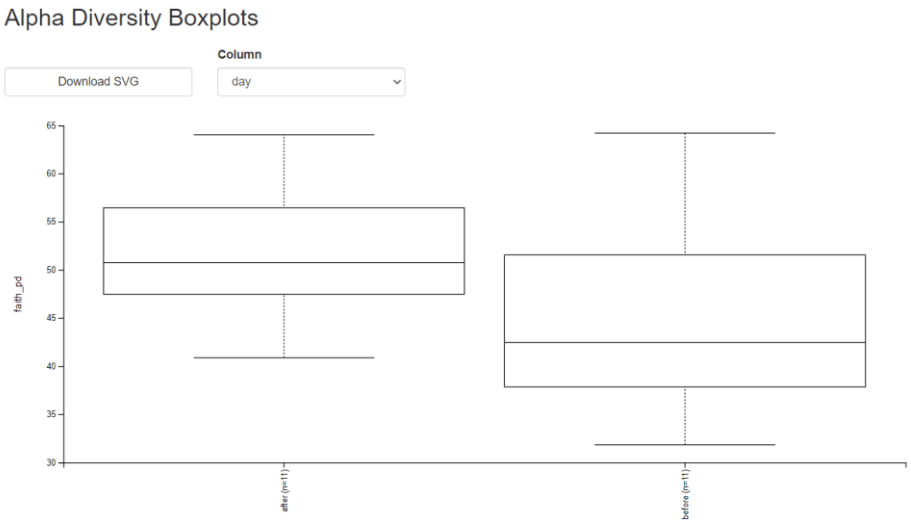
https://forum.qiime2.org/t/alpha-and-beta-diversity-explanations-and-commands/2282

qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity core_metrics_results/faith_pd_vector.qza --m-metadata-file meta-data.tsv --o-visualization core_metrics_results/faith_pd_group_significance

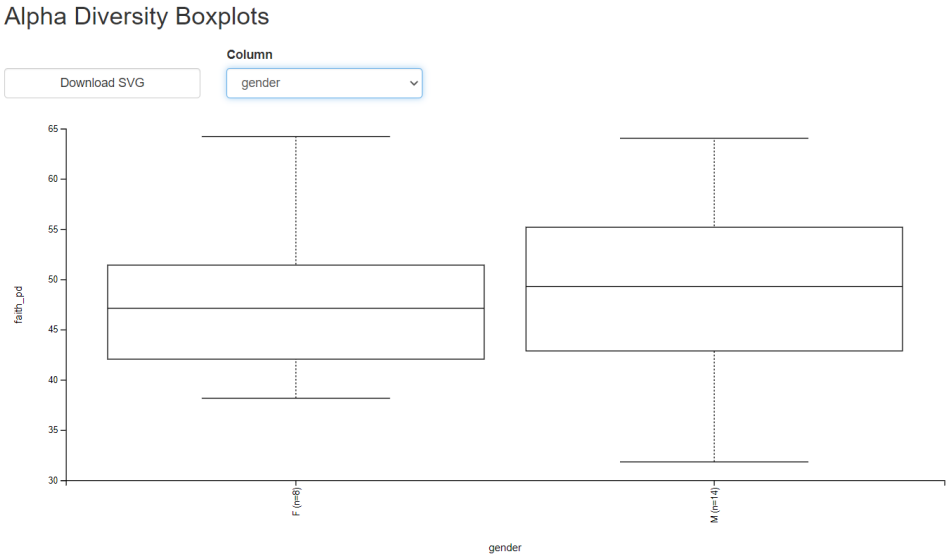
```
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix Chemo_16S]$ qiime diversity alpha-group-significance -
i-alpha-diversity core_metrics_results/faith_pd_vector.qza --m-metadata-file meta-dat
.tsv --o-visualization core_metrics_results/faith_pd_group_significance
Saved Visualization to: core_metrics_results/faith_pd_group_significance.qzv
```

מבדיקה באתר של qiime:

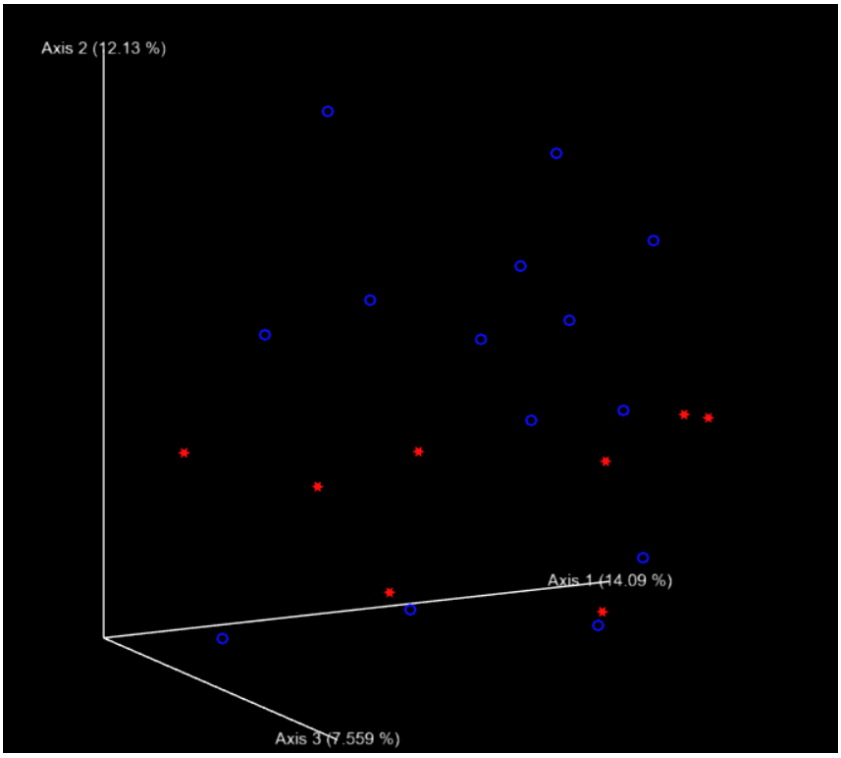
לפי day:



לפי gender:



בטא דייברסיטי:



```
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix Chemo_16S]$ qiime diversity alpha-group-
> --i-alpha-diversity core_metrics_results/evenness_vector.qza \
> --m-metadata-file meta-data.tsv \
> --o-visualization core_metrics_results/evenness_group_significance
Saved Visualization to: core_metrics_results/evenness_group_significanc
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix Chemo_16S]$ qiime diversity alpha-group-
> --i-alpha-diversity core_metrics_results/shannon_vector.qza \
> --m-metadata-file meta-data.tsv \
> --o-visualization core_metrics_results/shannon_group_significance
Saved Visualization to: core_metrics_results/shannon_group_significance
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix Chemo_16S]$ qiime diversity alpha-rarefa
ction \
> --i-table core_metrics_results/rarefied_table.qza \
> --p-max-depth 30152 \
> --m-metadata-file meta-data.tsv \
> --p-steps 25 \
> --o-visualization alpha_rarefaction.qzv
Saved Visualization to: alpha_rarefaction.qzv
(qiime2-2020.8) [nissan@matrix Chemo_16S]$
```