

פרוטוקול עבודה עם סקריפטים:

להריץ:

```
bash
```

לפתוח תיקייה בשם raw_data ולהכניס לתוכה את הקבצים מהדרופבוקס:

```
mkdir -p raw_data
```

לשים בתיקיית העבודה את קבצי הסקריפטים.

להריץ את הפקודה למעבר לquiiime:

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

ליצור קובץ manifest.tsv שמכיל את שמות הדגימה, את הכתובת במובקס של הגדיל forward ושל גדיל הרוורס:



```
manifest - Notepad
File Edit Format View Help
sampleID forward-absolute-filepath reverse-absolute-filepath
351316-CP1 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo1_S87_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo1_S87_L001_R2_001.fastq
351316-CP2 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo2_S88_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo2_S88_L001_R2_001.fastq
351316-CP3 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo3_S89_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo3_S89_L001_R2_001.fastq
351316-CP4 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo4_S90_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo4_S90_L001_R2_001.fastq
351316-CP5 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo5_S91_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo5_S91_L001_R2_001.fastq
351316-CP6 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo6_S92_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo6_S92_L001_R2_001.fastq
351316-CP7 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo7_S93_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo7_S93_L001_R2_001.fastq
351316-CP8 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo8_S94_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo8_S94_L001_R2_001.fastq
351316-CP9 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo9_S95_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo9_S95_L001_R2_001.fastq
351316-CP10 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo10_S96_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo10_S96_L001_R2_001.fastq
351316-CP11 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo11_S97_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo11_S97_L001_R2_001.fastq
351316-CP12 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo12_S98_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo12_S98_L001_R2_001.fastq
351316-CP13 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo13_S99_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo13_S99_L001_R2_001.fastq
351316-CP14 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo14_S100_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo14_S100_L001_R2_001.fastq
351316-CP15 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo15_S101_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo15_S101_L001_R2_001.fastq
351316-CP16 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo16_S102_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo16_S102_L001_R2_001.fastq
351316-CP17 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo17_S103_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo17_S103_L001_R2_001.fastq
351316-CP18 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo18_S104_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo18_S104_L001_R2_001.fastq
351316-CP19 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo19_S105_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo19_S105_L001_R2_001.fastq
351316-CP20 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo20_S106_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo20_S106_L001_R2_001.fastq
351316-CP21 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo21_S107_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo21_S107_L001_R2_001.fastq
351316-CP22 /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo22_S108_L001_R1_001.fastq /home/stu/nissan/Ariel/Chemo_165/raw_data/351316-Chemo22_S108_L001_R2_001.fastq
```

שלב ראשון: סקריפט להמרת הקבצים לפורמט qza. ובדיקת איכות:

קלט: ה-path לתיקייה של האנליזה

דוגמת הרצה:

```
chmod 755 first_script_for_validation_check.sh path/to/the/directory
```

לאחר סיום פעולת הסקריפט יש לבדוק את איכות הקבצים בקובץ שנוצר - מספר רידים, איכות ריצוף ומיקומי חיתוכים.

שלב שני: ביצוע trimming:

קלט: מיקומי החיתוך. צד שמאל של גדיל ה-forward והרוורס (כלומר, המספר הנמוך יותר), ואז צד ימין.

```
chmod 755 second_script_for_trimming.sh LEFT F LEFT R RIGHT F RIGHT R
```

יש לבדוק את פלט החיתוך בקובץ שנוצר.

שלב שלישי:

ביצוע סינון לפי מספר רידים מינימלי לדגימה (דגימות עם פחות מערך הסף "יועפו"), וכן לפי מספר חזרות מינימלי של רצף, וביצוע קלסיפיקציה טקסונומית. (הערה: כרגע הסינון הזה נמחק ולא בשימוש, אם רוצים להשתמש בזה כדאי לבדוק)

```
chmod 755 third_script_for_filtering_and_classifying.sh
min frequency seq
```

לבדוק את קובץ הוויזואליזציה שיצא.

שלב רביעי:

ניקיון המידע מרצפי מיטוכונדריה, כלורופלסטים, ארכיאה ואאוקריוטה.

```
chmod 755 fourth_script_for_filtering.sh
```

בדיקת הוויזואליזציה של התוצרים לאחר הניקוי.

שלב חמישי:

יצירת עץ והכנה לאלפא דייברסיטי:

```
chmod 755 fifth_script_for_tree.sh
```

נוצר קובץ ויזואליזציה, שבו יש לבדוק את מספר הרידים הקטן ביותר. את המספר הזה ניתן כקלט לסקריפט הבא.

שלב שישי:

יצירת גרפים שונים לבדיקת דייברסיטי:

שני סוגים של אלפא ושניים של בטא, וכן גרף PCoA.

קלטים:

מספר הרידים הקטן ביותר שקיבלנו כפלט מהסקריפט הקודם, וכן שם העמודה ב-meta-data שלפיו נרצה לחשב בטא דייברסיטי.

```
chmod 755 sixth_script_for_diversities.sh min frequency column
```

השלב האחרון בסקריפט כבר מתחיל לייצר לנו את הקבצים.

בסופו נפתח את קובץ otu_table.txt ונשנה 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
```