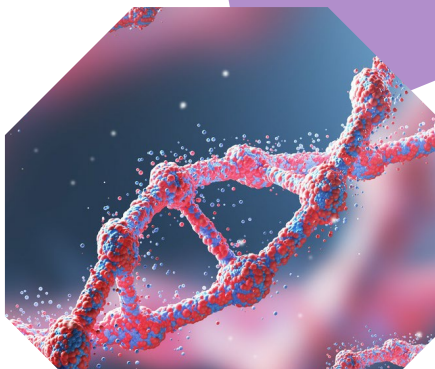
Taller de bioinformática básica y sus aplicaciones en la genómica de especies no modelos

Día 2

Verificación de calidad de genomas

MSc. Eduardo Pizarro G.



1

Uso del clúster

Conexión

2

Conda

Instalación paquetes
Gestión de ambientes

3

Ejecución y transferencia

Scripts
Transferencia datos

4

Verificación de Calidad

FastQC
MultiQC

1. Uso del clúster

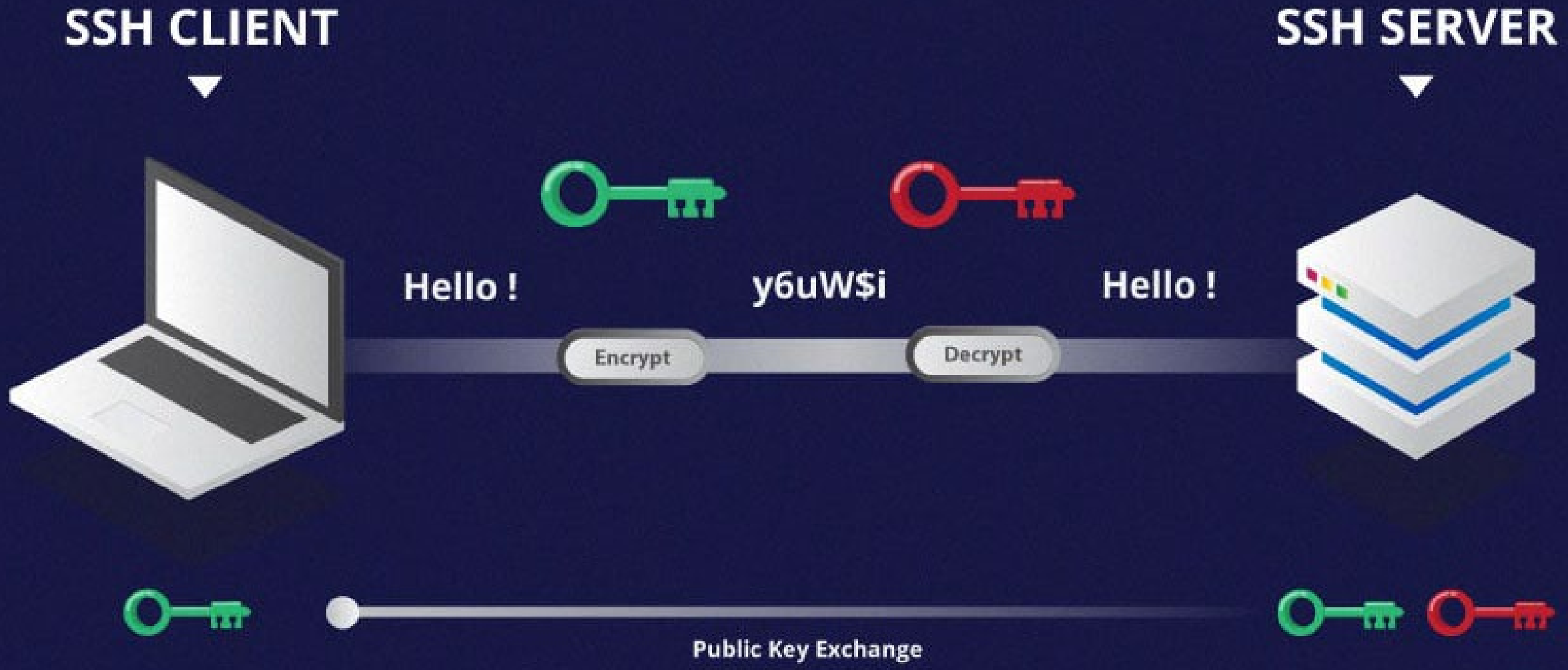
A) Qué es un HPC


High Performance Computing

1. Uso del clúster

A) Qué es un HPC
B) Conexión a un HPC

SSH


SSH CLIENT
SSH SERVER
Hello !
y6uW$i
Hello !
Encrypt
Decrypt
Public Key Exchange

HOSTINGER

Leftraru

- HPC – Computación de alto rendimiento
- Múltiples computadores conectados entre si
- Organización por *Schedulers*

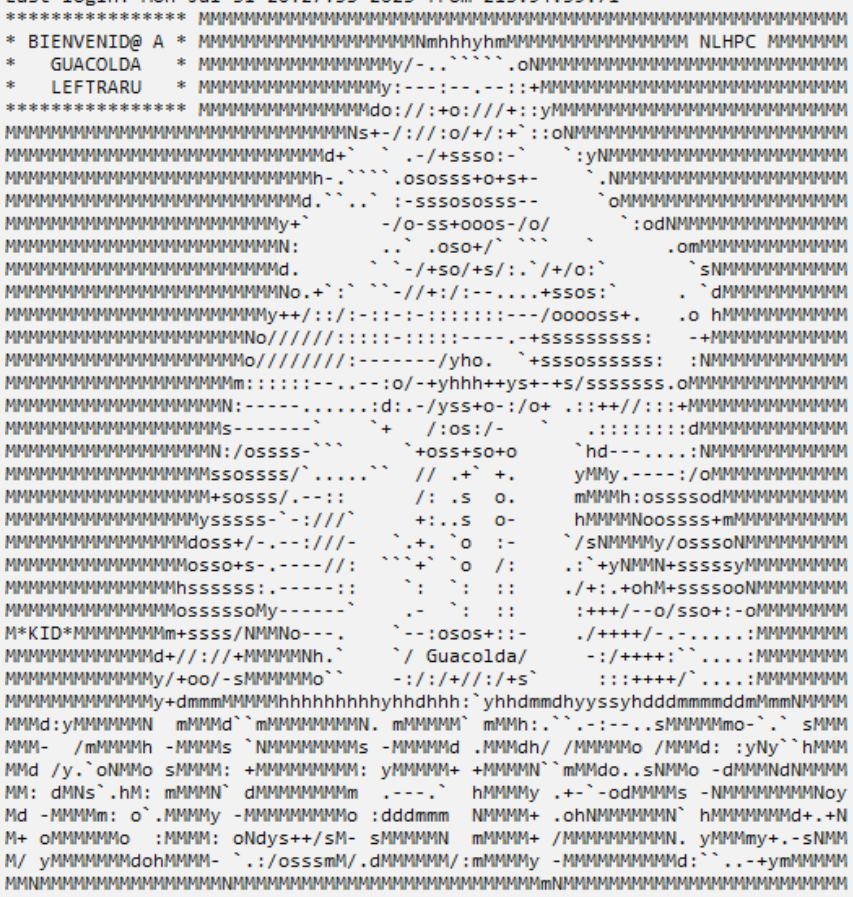
Conexión a clúster Leftraru

- Conexión se realiza al servidor (host) y a un usuario del servidor
- Usuarios disponibles: student88-99
- Comando para conexión:

  $ ssh usuario@host
- Dominio del host: leftraru.nlhpc.cl (podría ser IP)

  $ ssh student88@leftraru.nlhpc.cl
- Contraseña de usuarios: k7sm4wBz

```
(base) eduardo@LAPTOP-IDJV37SH:~$ ssh student88@leftraru.nlhpc.cl
student88@leftraru.nlhpc.cl's password:
Last login: Mon Jul 31 20:27:53 2023 from 213.94.59.71
```



```
Laboratorio Nacional de Computacion de Alto Rendimiento (NLHPC)
Centro de Modelamiento Matematico (CMM)
Universidad de Chile

IMPORTANTE: NO EJECUTAR PROCESOS EN ESTE NODO POR T > 30 min
PARA ESO DEBEN DE USARSE LAS COLAS DE EJECUCION
.................................................................

********************************************************************************
EN CASO DE TENER DUDAS CON SU SCRIPT, LO INVITAMOS A USAR NUESTRO GENERADOR
AUTOMÁTICO EN EL SIGUIENTE LINK: https://wiki.nlhpc.cl/Generador_Scripts
********************************************************************************

********************************************************************************
ESTIMADO USUARIO, A CONTINUACIÓN SE LISTAN LOS NODOS LIBRES PARA SER UTILIZADOS:
********************************************************************************

PARTICION  NODO   ESTADO
debug      3      idle
[student88@leftraru2 ~]$
```

2. Uso de Conda

2. Uso de Conda

- Gestor de paquetes y ambientes.
- Instalación por Miniconda
- Exploremos Conda!

2. Uso de Conda

➢Activar conda: source ~/miniconda3/bin/activate

conda list

conda info --envs

➢Crear un ambiente:

- Crear un ambiente con fastQC: conda create –n secuenciasQC –c bioconda fastqc
- Activar ambiente: conda activate <nombre_ambiente>
- Veamos las opciones que tiene fastqc y comparemos con lo que colocamos en nuestro comando: fastqc --help

2. Uso de Conda

- Gestor de paquetes y ambientes.
- Instalación por Miniconda
- Exploremos Conda!

- ¿Cómo instalo MultiQC en el ambiente de Conda?

3. Ejecución y transferencia

A) Ejecución de programas:
   i. En el prompt

3. Ejecución y transferencia

Ejecución de programas en el Prompt:

A) Revisar donde se encuentran nuestros genomas

$ ls

$ ls ~/genomes

B) Crear directorio para output de FastQC

mkdir ~/genomes/QC_estudianteX

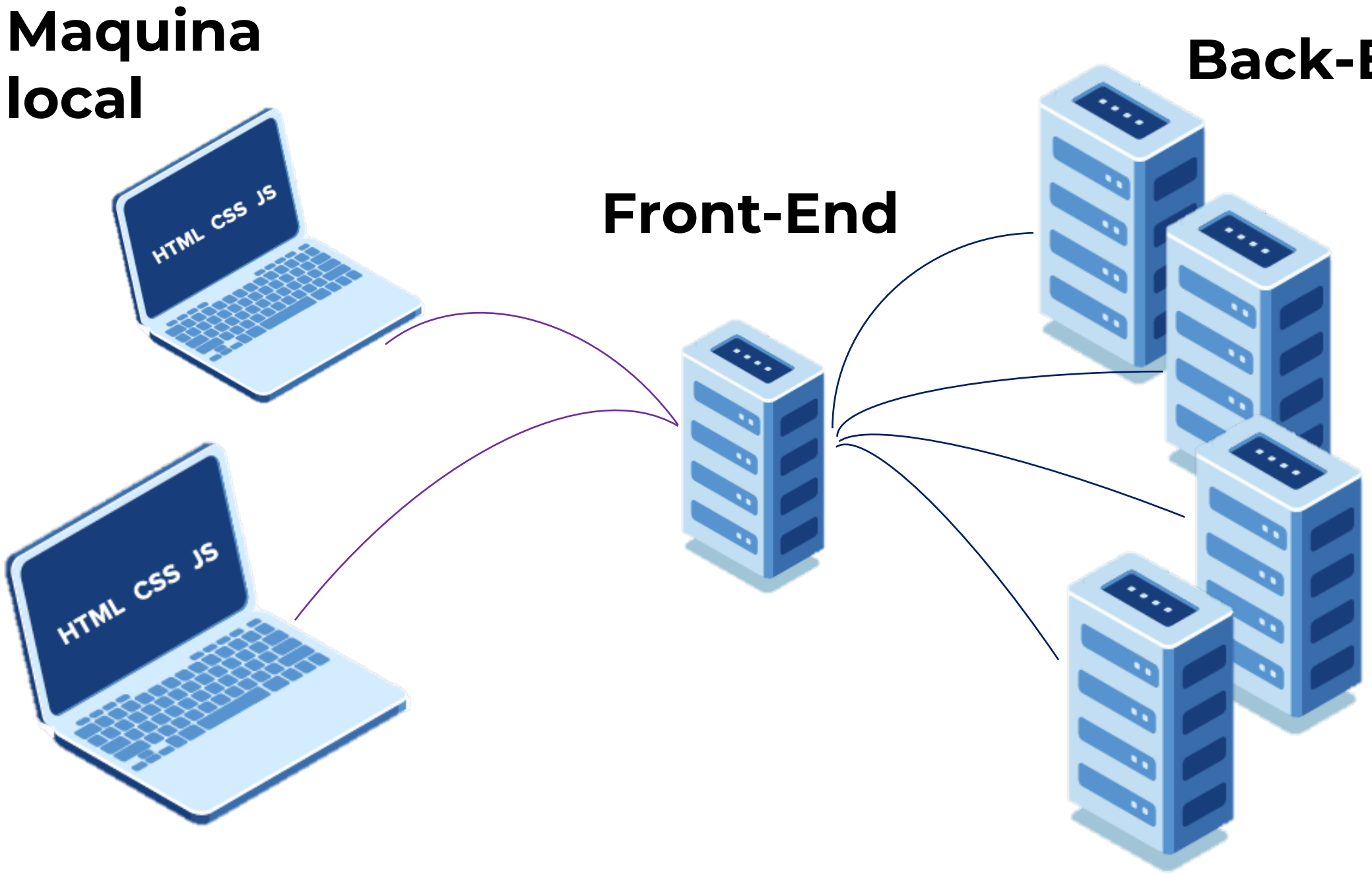
C) Activar ambiente, escribir comando y ejecutar

$ conda activate secuenciasQC

$ fastqc –o ~/genomes/QC_estudianteX –t 1 –f fastq ~/genomes/m2267sub2_R1.fastq.gz

3. Ejecución y transferencia

A) Ejecución de programas:
   i. En el prompt
   ii. Script: ¿qué son? ¿cómo elaborar uno?
      a. Back-End
      b. Front-End


Maquina local
Front-End
Back-End
HTML CSS JS
HTML CSS JS

Scripts para el Back-End

- Scheduler: sistema de gestión de tarea

SLURM

```
#!/bin/bash
#---------------Script SBATCH - NLHPC ----------------
#SBATCH -J FastQC-tunombre
#SBATCH -p slims
#SBATCH --reservation=bioagosto
#SBATCH -n 1
#SBATCH -c 1
#SBATCH --mem-per-cpu=2300
#SBATCH --mail-user=email
#SBATCH --mail-type=ALL
#SBATCH -t 2:2:5
#SBATCH -o FastQC_%j.out
#SBATCH -e FastQC_%j.err

GEN=/home/courses/studentXX/genomes
QC=/home/courses/studentXX/QC

source $HOME/miniconda3/bin/activate
conda activate assembly

fastqc -o $QC/ --noextract -t 1 -f fastq $GEN/*.gz
```

PBS

```
#!/bin/bash
#PBS -V
#PBS -N fastqcp
#PBS -k eo
#PBS -l nodes=1:ppn=40
#PBS -l walltime=40:00:00
################################

source activate preSNPcalling

RAW=/data6/testacc/Eduardo/PUDU/rawdata
QC=/data6/testacc/Eduardo/PUDU/QC
list=/data6/testacc/Eduardo/PUDU/rawdata/list


cd $RAW

while read sample
do
fastqc -o $RAW/fastqc-raw --noextract -t 4 -f fastq $RAW/${sample}.fq &
done < $list

wait
```

Scripts para el Front-End

- Editor de texto (nano):

```
$ nano script1.sh
------- 0 -------
#!/bin/bash
mkdir Prueba
------- 0 -------
$ chmod +x script1.sh

$ bash script1.sh
```

OJO: las personas que estén en un mismo usuario, deben crear un directorio de scripts para cada uno, ingresar al directorio, y crear ahí sus scripts

Ej:
mkdir Elisa
mkdir Fabian
mkdir Eduardo

Scripts para el Front-End

- Ejercicio: Crear un script llamado fqc_m2267_R2.sh para ejecutar en Front-End y que permita ejecutar el comando de FastQC con la muestra m2267sub2_R2.fastq.gz

Pasos:

1. Indicar el intérprete de comando
2. Activar gestor de paquetes y ambientes
3. Activar ambiente
4. Ejecutar programa

Scripts para el Front-End

```
#!/bin/bash

source ~/miniconda3/bin/activate
conda activate secuenciasQC

fastqc –o ~/genomes/QC_estudianteX –t 1 –f fastq ~/genomes/m2267sub2_R2.fastq.gz
```

Guardar el script, convertir en ejecutable, y correr en segundo plano

```
$ chmod +x fqc_m2267_R2.sh
$ ./fqc_m2267_R2.sh &
```

Scripts para el Front-End

- Tercera forma:

Copiaremos el script anterior en uno nuevo para ejecutar FastQC con la muestra m2293:

$ cp fqc_m2267_R2.sh fqc_m2293.sh

Luego modificar con nano para que quede de la siguiente forma:

Scripts para el Front-End

```
#!/bin/bash

source ~/miniconda3/bin/activate
conda activate secuenciasQC

fastqc –o ~/genomes/QC_estudianteX –t 1 –f fastq
~/genomes/m2293sub2_*.fastq.gz
```

Scripts para el Front-End

- Por último, ejecutar con el comando “nohup”

$ nohup ./fqc_m2293.sh > fqc_m2293.out &

- Podemos monitorear con el comando “htop” para ver que se está ejecutando (para salir de esa pantalla, cliquear en “Quit” en la barra de abajo, o bien apretar F10).
- Al finalizar los procesos, cambiar de ruta a ~/genomes/QC_estudianteX y ejecutar MultiQC. Este programa solo requiere indicarle en qué directorio se encuentran los reportes de FastQC generados. En el siguiente comando, indicamos con “./” que los reportes están en el directorio de trabajo:

$ multiqc ./

Si quisiéramos indicar la ruta absoluta del directorio con los reportes, entonces utilizaríamos:

$ multiqc /home/courses/studentXX/genomes/QC_estudianteX

¿Cómo revisamos nuestro output? Revisar directorio ~/genomes/QC_estudianteX

Para ver el reporte, se debe abrir el documento de extensión “html” generado. Este se llama “multiqc_report.html” o bien les puede aparecer como “multiqc_report”. Este lo deben descargar a una máquina local para poder verlo.

3. Ejecución y transferencia

A) Ejecución de programas:
   i. En el prompt
   ii. Script: ¿qué son? ¿cómo elaborar uno?
      a. Back-End
      b. Front-End

B) Transferencia de archivos:
   i. Comando rsync

Transferir datos del servidor

- Abrir una nueva terminal en la computadora local, y ejecutar:

```
rsync -azvrP -e ssh student88@leftraru.nlhpc.cl:/home/courses/student88/genomes/QC_estudianteX .
```

- Abrir el html con navegador

FastQC

FastQC High Throughput Sequence QC Report
Version: 0.12.1
|www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/
© Simon Andrews, Pierre Lindenbaum, Brian Howard, Phil Ewels 2011-22,
HTSJDK BAM/SAM reader v2.24.1 from Samtools 2022
BZip decompression ® Matthew J. Francis, 2011
Base64 encoding ® Robert Harder, 2012
Java HDF5 reader ® ETH, CISD and SIS, 2007-14

- FastQC webpage

Documentation

A copy of the FastQC documentation is availat

Example Reports

- Good Illumina Data
- Bad Illumina Data
- Adapter dimer contaminated run
- Small RNA with read-through adapter
- Reduced Representation BS-Seq
- PacBio
- 454

Babraham Institute

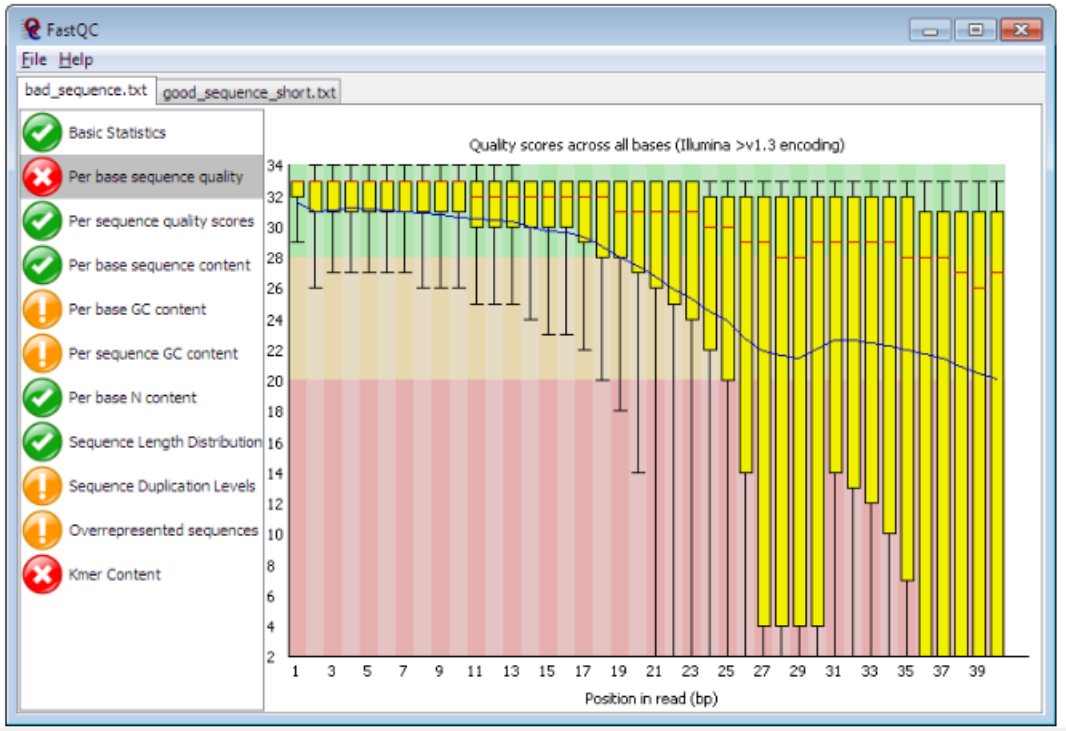
Babraham Bioinformatics

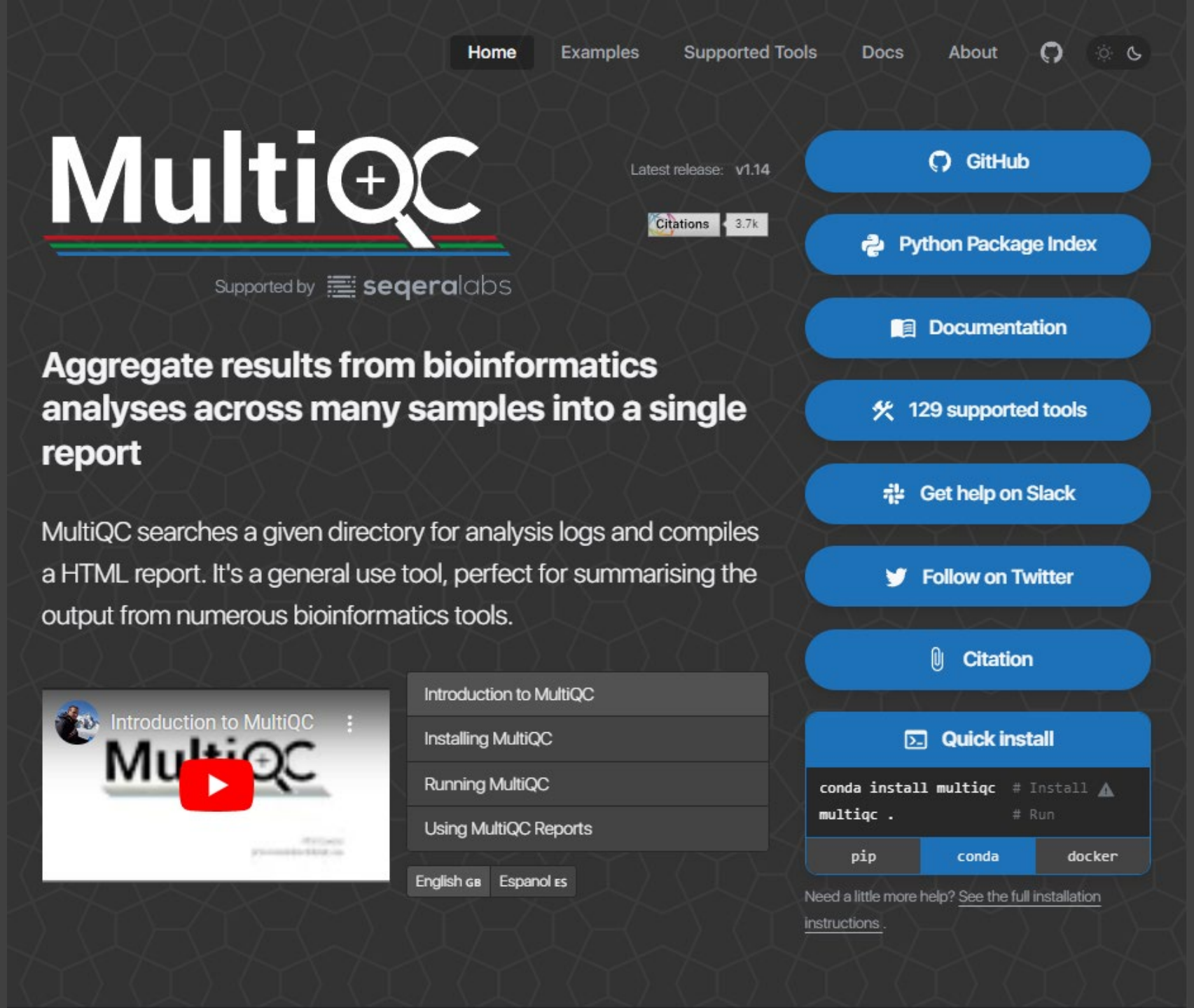
About | People | Services | Projects | Training | Publications

FastQC

Function	A quality control tool for high throughput sequence data.
Language	Java
Requirements	A suitable Java Runtime Environment The Picard BAM/SAM Libraries (included in download)
Code Maturity	Stable. Mature code, but feedback is appreciated.
Code Released	Yes, under GPL v3 or later.
Initial Contact	Simon Andrews

Download Now





MultiQC webpage

Preguntas a resolver con FastQC-MultiQC

- ¿Cuántos millones de reads tenemos?
- ¿Cuántas secuencias duplicadas?
- ¿Cuál es el tamaño promedio de los reads?
- ¿Poseen restos de adaptadores?
- ¿Qué significan los colores verdes, amarillos y rojos en cada análisis?
- ¿Cuál es la profundidad de secuenciación potencial que debiera obtener?

(Reads totales (R1 + R2) * largo de reads /1.000.000.000 (tamaño GigaBase))/2.4 (tamaño del genoma)

MultiQC

multiqc_report.html

General Statistics

Copy table | Configure Columns | Plot | Showing 4/4 rows and 4/5 columns.

Sample Name	% Dups	% GC	Length	M Seqs
sample1-f	53.2%	44%	233 bp	0.0
sample1-r	55.1%	44%	233 bp	0.0
sample2-f	66.3%	44%	251 bp	0.1
sample2-r	65.7%	44%	251 bp	0.1

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

1 1 2

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

Y-Limits: on

General Statistics

Copy table | Configure Columns | Plot | Showing 70/70 rows and 4/5 columns.

Sample Name	% Dups	% GC	Read Length	M Seqs
m2267_R1	5.6%	41%	150 bp	58.6
m2267_R2	5.5%	41%	150 bp	58.6
m2271_R1	5.9%	41%	150 bp	57.5
m2271_R2	5.8%	41%	150 bp	57.5
m2293_R1	6.2%	41%	150 bp	66.3
m2293_R2	6.2%	41%	150 bp	66.3
m2294_R1	5.1%	42%	150 bp	57.1
m2294_R2	5.2%	42%	150 bp	57.1
m2303_R1	5.6%	42%	150 bp	55.1
m2303_R2	5.3%	42%	150 bp	55.1
m2311_R1	5.1%	42%	150 bp	56.1
m2311_R2	5.1%	42%	150 bp	56.1
m2331_R1	5.4%	42%	150 bp	52.3
m2331_R2	5.2%	42%	150 bp	52.3
m2339_R1	6.2%	44%	150 bp	55.1

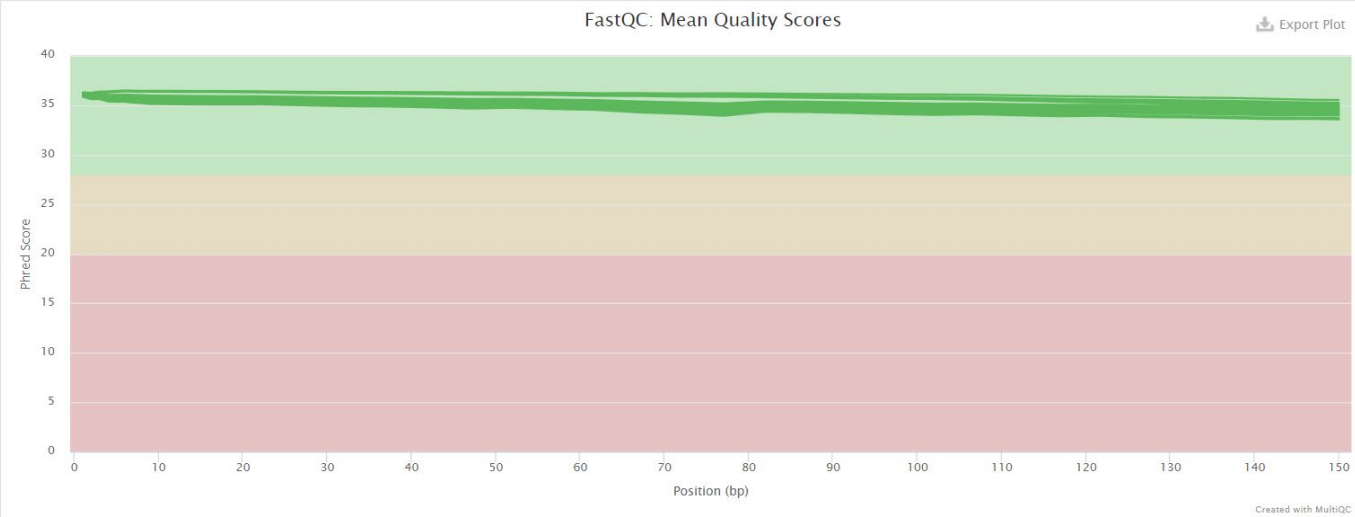
Sequence Quality Histograms

70

Help

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

Y-Limits: on



General Statistics

Copy table | Configure Columns | Plot | Showing 4/4 rows and 4/5 columns.

Sample Name	% Dups	% GC	Length	M Seqs
sample1-f	53.2%	44%	233 bp	0.0
sample1-r	55.1%	44%	233 bp	0.0
sample2-f	66.3%	44%	251 bp	0.1
sample2-r	65.7%	44%	251 bp	0.1

FastQC

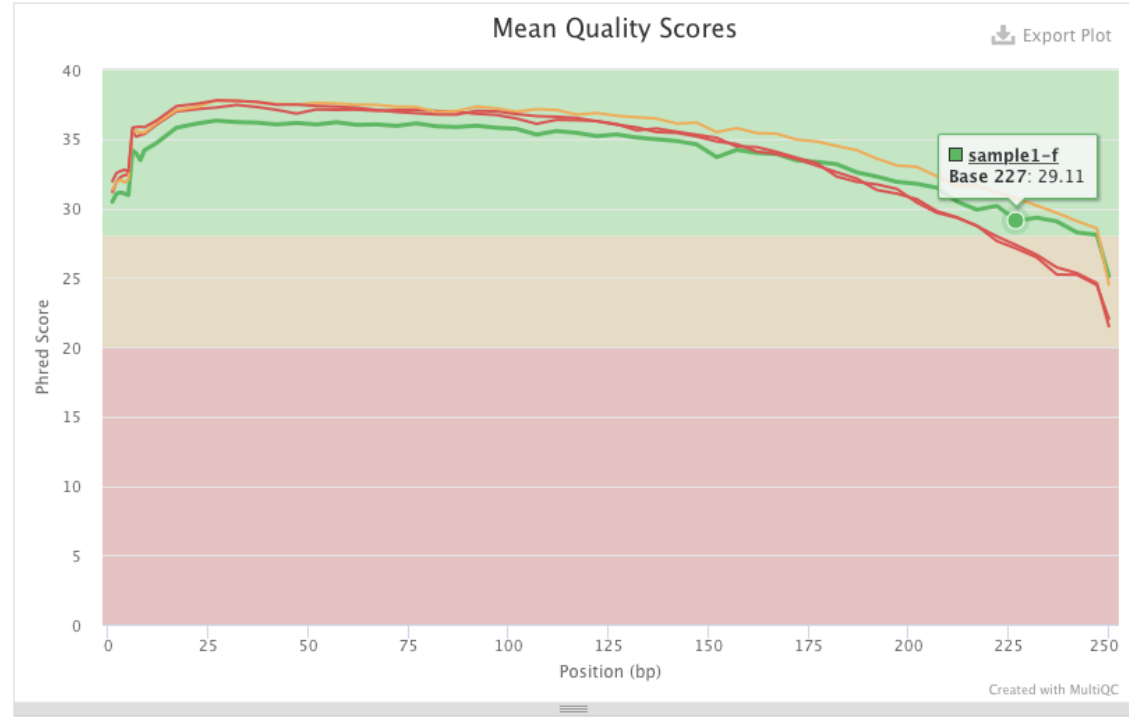
FastQC is a quality control tool for high throughput sequence data, written by Simon Andrews at the Babraham Institute in Cambridge.

Sequence Quality Histograms

1 1 2

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

Y-Limits: on



Puntos importantes de la comparación anterior

1. % de duplicados: tener en consideración que no es muy preciso. FastQC lo calcula a partir de los primeros 100.000 reads que encuentra. Además, considera los primeros 50 pares de bases de cada read para calcularlo. Por lo tanto, no es muy fiable. En este sentido, se recomienda utilizar otros métodos de cálculo del % de duplicados (e.g., fastp, markduplicates)
2. % GC: el porcentaje de Guanina-Citosina en el DNA de un organismo es característico para cada especie. En vertebrados, la media suele oscilar entre 40 y 50%. Por lo tanto, si se observa un %GC muy distinto entre muestras de una misma especie, esto indica que podría haber contaminación o sobrerrepresentación de algún tipo de secuencia. Por último, se debe considerar que la distribución de la curva debe ser del tipo gaussiana. Lo usual es que esto no se cumpla a la perfección. En gran parte de los estudios se ha encontrado que este parámetro no se cumple con una perfecta distribución normal de los datos (posiblemente por secuencias repetitivas), pero si se asemeja a una distribución normal. Por lo general, este criterio aparece con color amarillo o rojo (una perfecta distribución normal se indica con color verde). Revisar diapositiva 37 para ver la gráfica (per sequence GC content).
3. Read length: esto se debe corresponder con lo solicitado a la empresa de secuenciación. Si se pide read-length de 150pb, deberían llegar todos de ese tamaño.
4. Millones de Secuencias: esto se relaciona con lo solicitado a la empresa. Se debe calcular cuantos Gigabases se obtuvieron de la secuenciación y compararlo con cuanto se solicitó. Para hacer esta comparación, se debe multiplicar los millones de secuencias por el tamaño de reads. En el caso de que se haya pedido pair-end reads (reads pareados), entonces se deben sumar el R1 con el R2.
5. Sequence Quality Score (Phred Score): Esto indica la probabilidad de tener un falso positivo. Es decir, la probabilidad de que la base indicada para una posición no sea la base real que se encuentra en el genoma. La escala de Phred Score (Q) en relación a la probabilidad de acertar en la identificación de la base se encuentra en la siguiente diapositiva. Los valores que se suelen trabajar es sobre Q=30 (que se indica en color verde del MultiQC).

Phred quality score

LINK

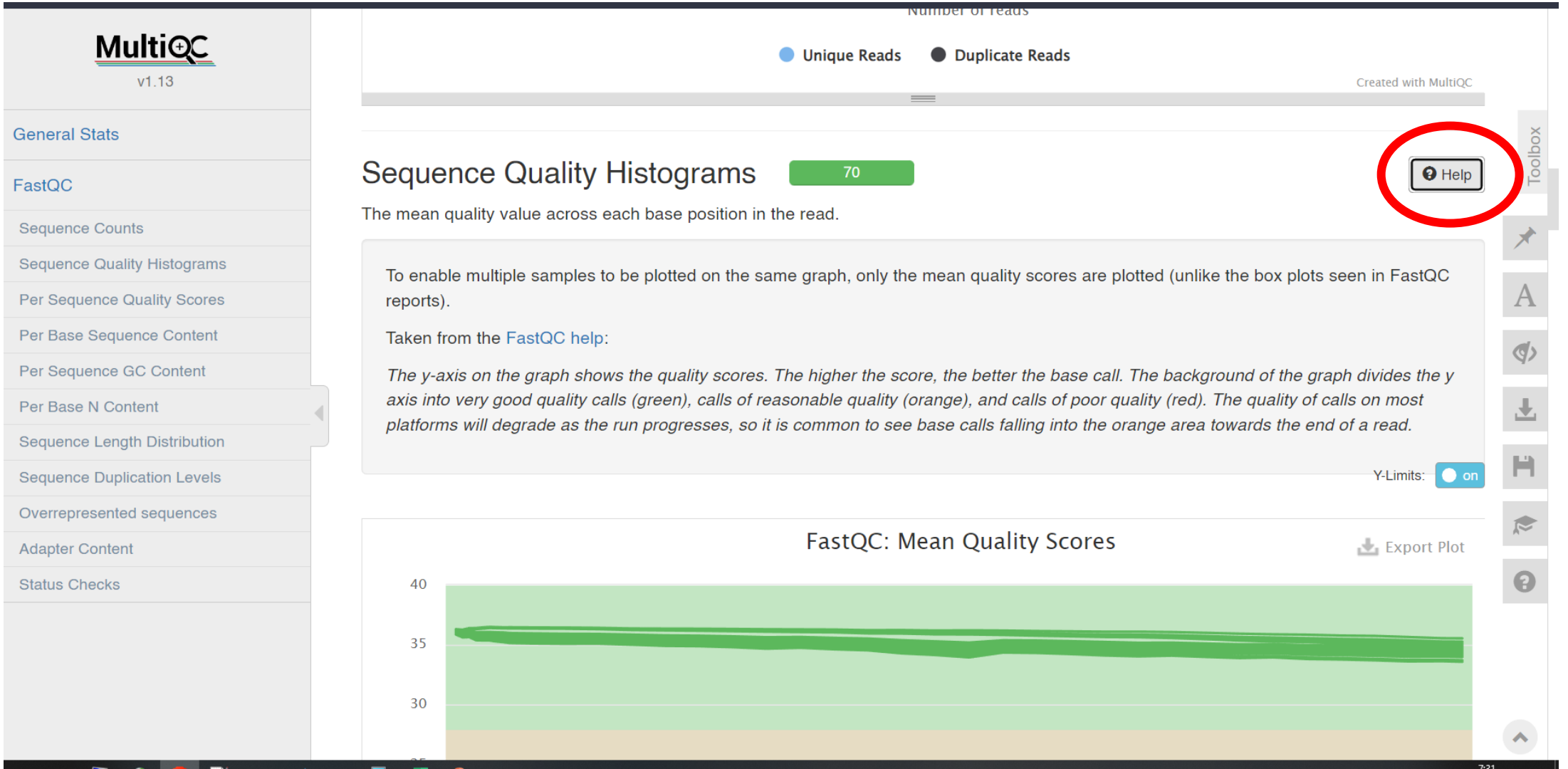
```
+SEQ_ID
!''*(((((***+))%%%++)(%%%%).1***
```

A quality value Q is an integer representation of the probability *p* that the corresponding base call is incorrect.

$$Q = -10 \log_{10} P \quad \Longrightarrow \quad P = 10^{\frac{-Q}{10}}$$

Phred Quality Score	Probability of incorrect base call	Base call accuracy
10	1 in 10	90%
20	1 in 100	99%
30	1 in 1000	99.9%
40	1 in 10000	99.99%
50	1 in 100000	99.999%

- Recordar que FastQC genera el reporte de la calidad de los genomas. MultiQC junta los reportes de cada genoma, y lo grafica de una forma más atractiva a la vista y de más fácil interpretación. Para adentrarse en la información de lo que cada grafico significa, pueden visitar el manual de FastQC: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/Help/ o clickear el botón de ayuda que aparece en las gráficas de MultiQC (indicado en la esquina superior izquierda de la siguiente figura:



Per Sequence GC Content

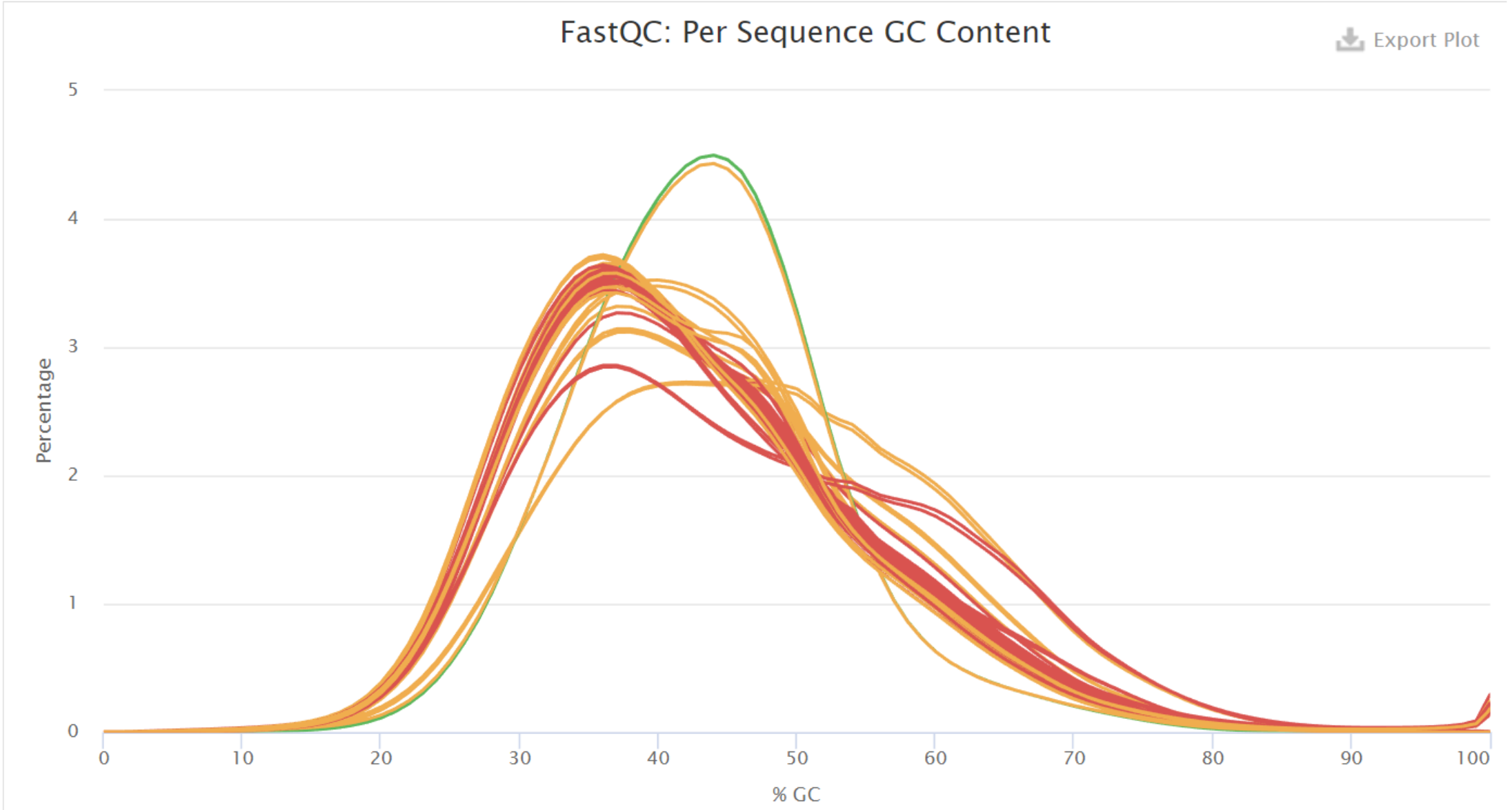
20 49

Help

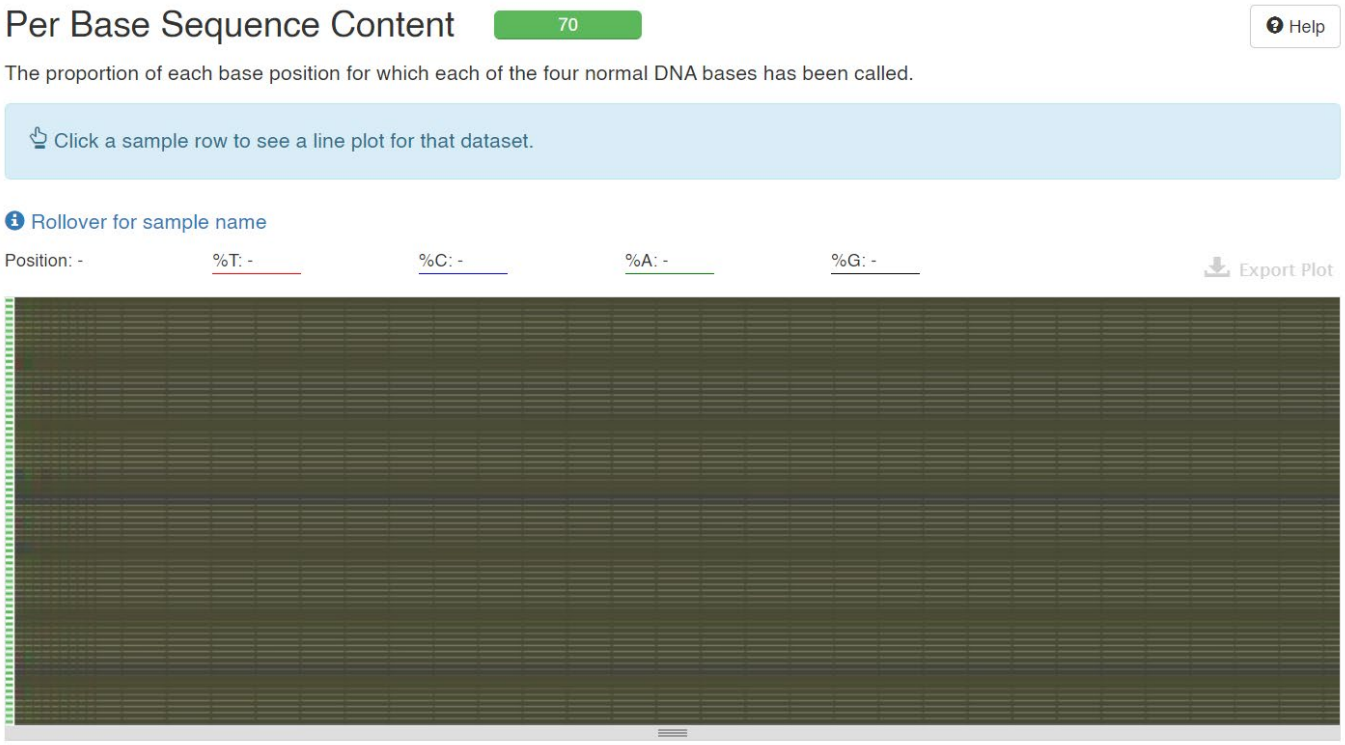
The average GC content of reads. Normal random library typically have a roughly normal distribution of GC content.

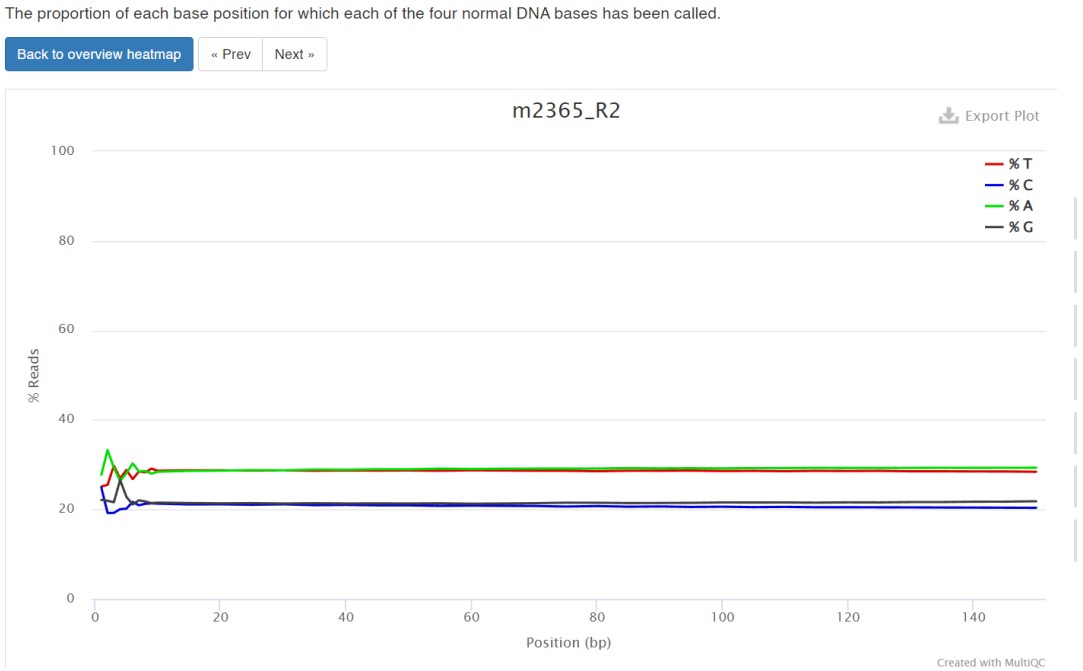
Y-Limits: on

Percentages | Counts

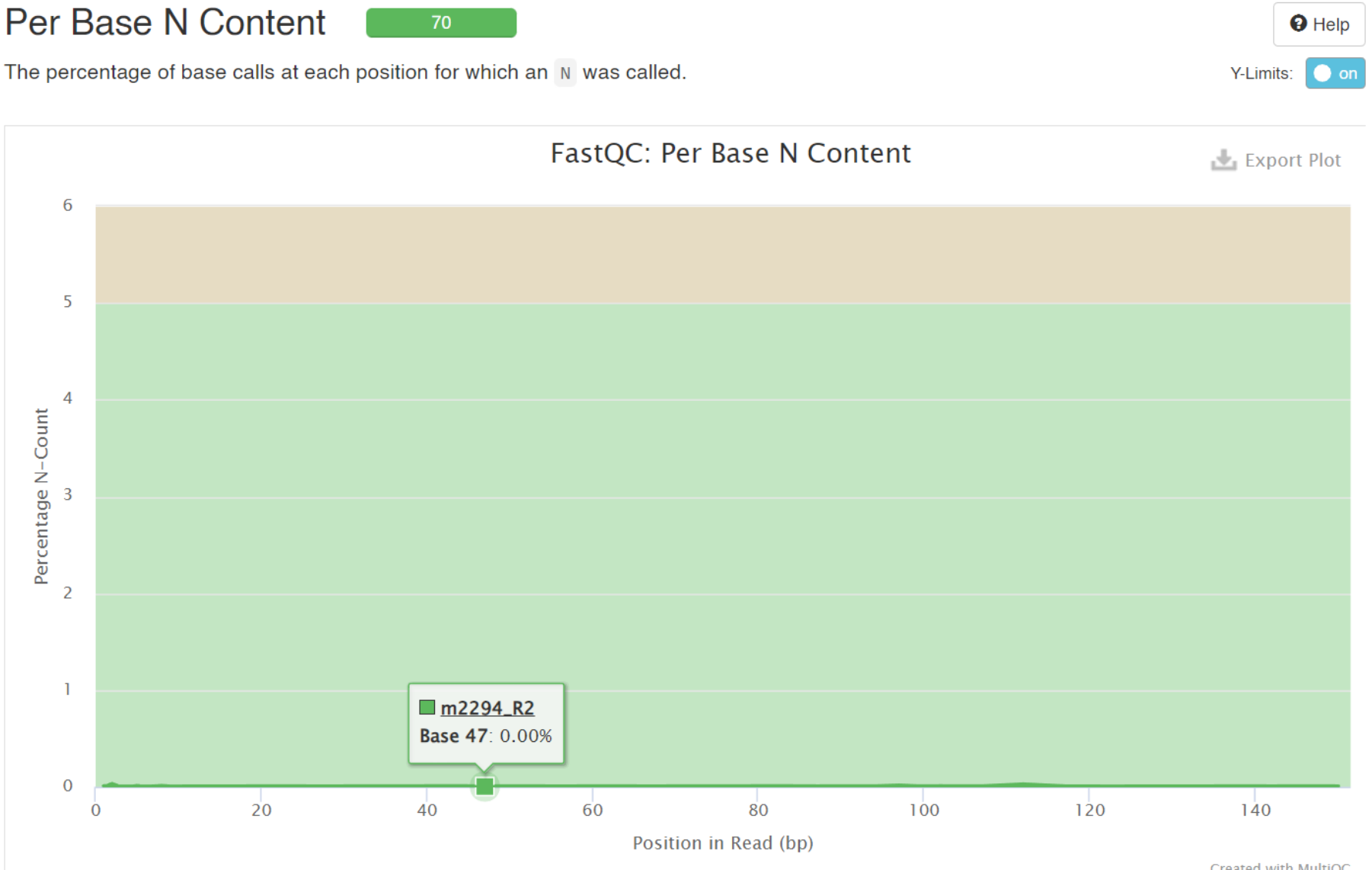


- El gráfico general no dice nada, pero hay qe hacer click en alguna muestra para ver el detalle
- Este gráfico es importante de ver, ya que da la información de como se distribuye los porcentajes de GC a lo largo del largo de reads. Es importante notar que al principio, entre los 10 primero pares de base se escapa un poco del promedio a lo alrgo del read. Esto es algo usual de encontrar, pero la diferencia con la media no debe ser tanta, y la distribución a lo largo del read debe mantenerse constante. Algo distinto de esto indicaría que la secuenciación podría no haber sido de tan buena calidad (posibles falsos positivos)

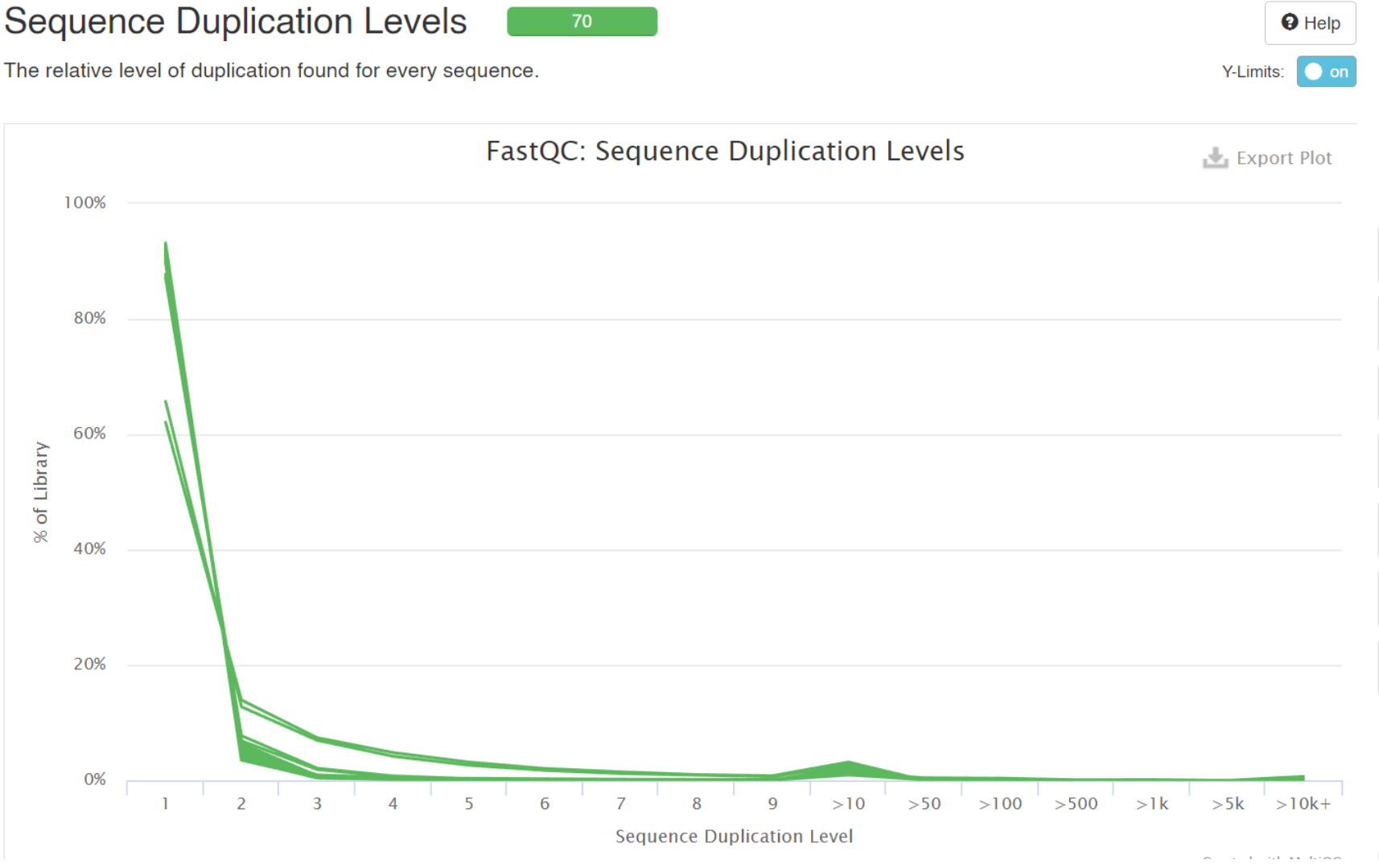




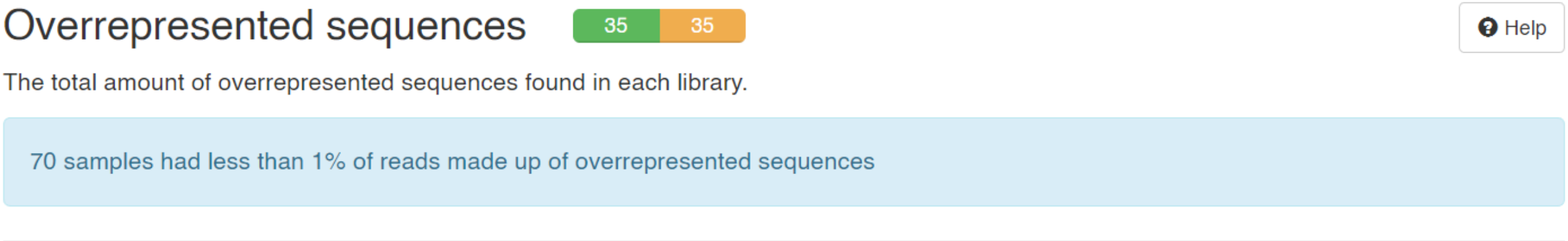
- Esta es importante de ver para notar si hay bases que no fueron identificadas (“N”).



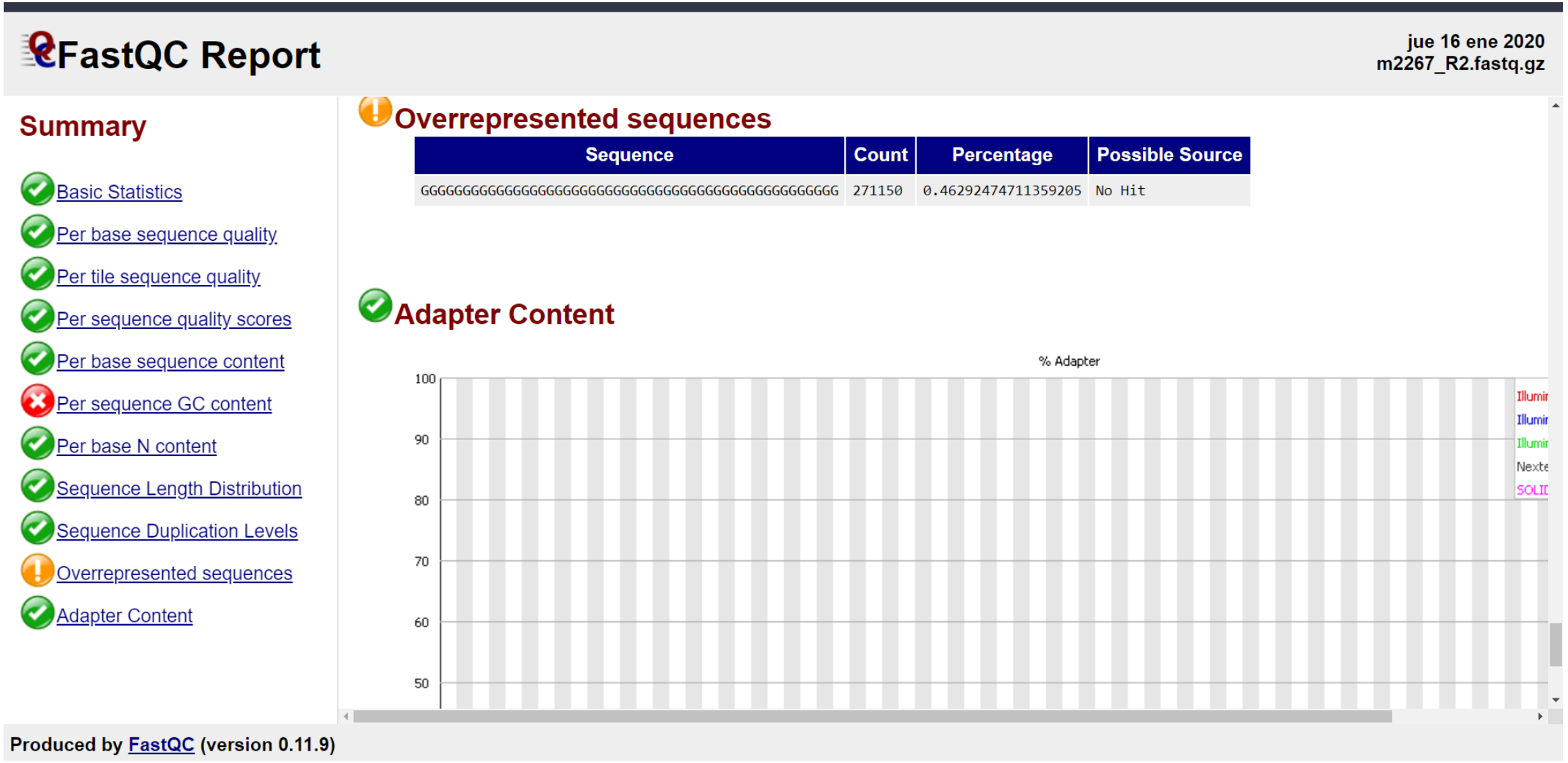
- Aquí es importante de revisar que los duplicados deben estar entre 1 y 2 la mayoría. Si hay demasiados con mayores valores, puede indicar de que hubo secuenciación de demasiadas duplicaciones de PCR (recordar que en el proceso de secuenciación Illumina, hay algunos métoidos que utilizan amplificación por PCR, lo que podría generar duplicados)



- También es importante ver cuales son las secuencias sobrerrepresentadas. El report del MultiQC no indica cuales son estas secuencias.



- Por lo tanto, deben abrir el report del FastQC, ya que este indica qué secuencia es, y eso lo pueden utilizar posteriormente para filtrar esa secuencia específica. Recordar que el report de Fastq es un archivo en “html” con el nombre de la muestra:



FastQC Report

jue 16 ene 2020
m2267_R2.fastq.gz

Summary

- Basic Statistics
- Per base sequence quality
- Per tile sequence quality
- Per sequence quality scores
- Per base sequence content
- Per sequence GC content
- Per base N content
- Sequence Length Distribution
- Sequence Duplication Levels
- Overrepresented sequences
- Adapter Content

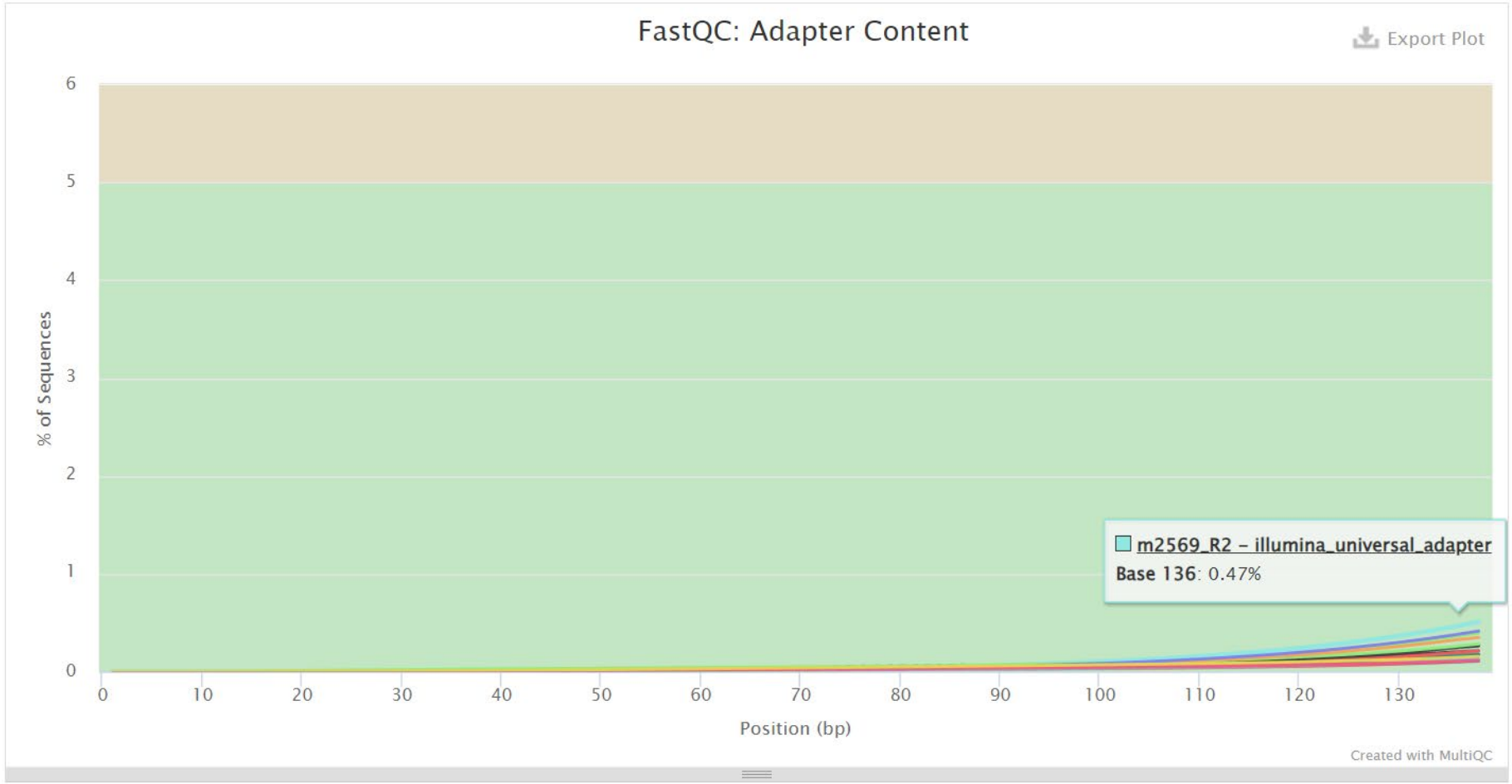
Overrepresented sequences

Sequence	Count	Percentage	Possible Source
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	271150	0.46292474711359205	No Hit

Adapter Content

Produced by FastQC (version 0.11.9)

- Por último, es importante ver cuanto y qué tipo de adaptadores hay en las secuencias, ya que se deberán utilizar esos adaptadores con mayor énfasis al momento hacer el filtrado. Al posar el mouse sobre la secuencia se indica el tipo de adaptador.



Cualquier consulta, no duden en escribirnos!

Taller de bioinformática básica y sus aplicaciones en la genómica de especies no modelos

Día 2

Verificación de calidad de genomas

MSc. Eduardo Pizarro G.