

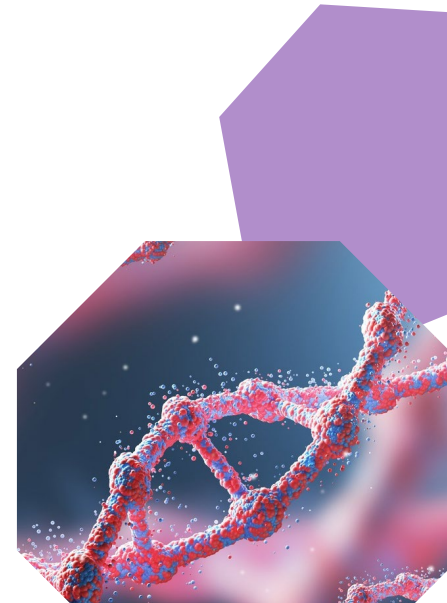


*Taller de bioinformática básica y sus
aplicaciones en la genómica de
especies no modelos*

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) Conexión

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

```

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

```




CONDA

2. Uso de Conda



2. Uso de Conda



- Gestor de paquetes y ambientes.
- Instalación por [Miniconda](#)
- Exploreemos Conda!

2. Uso de Conda



➤ Activar conda: `source ~/miniconda3/bin/activate`
`conda list`
`conda info --envs`

➤ Crear un ambiente:

➤ Paso 1:

`conda config --add channels defaults`
`conda config --add channels bioconda`
`conda config --add channels conda-forge`
`conda config --set channel_priority strict`

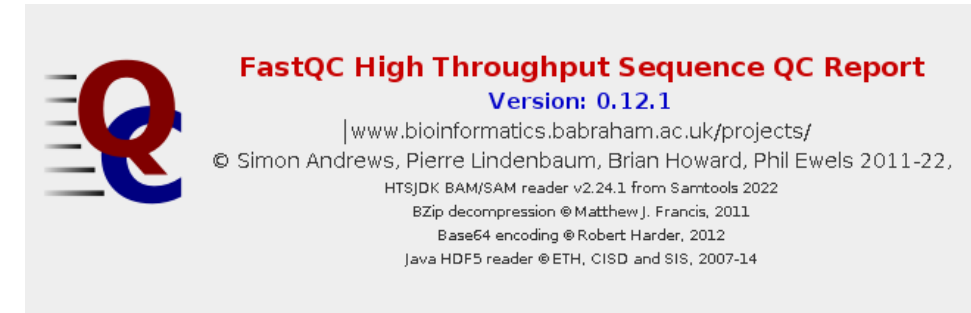
➤ Paso 2:

- 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



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

```
1  #!/bin/bash
2  #PBS -V
3  #PBS -N fastqcp
4  #PBS -k eo
5  #PBS -l nodes=1:ppn=40
6  #PBS -l walltime=40:00:00
7  #####
8
9  source activate preSNPcalling
10
11  RAW=/data6/testacc/Eduardo/PUDU/rawdata
12  QC=/data6/testacc/Eduardo/PUDU/QC
13  list=/data6/testacc/Eduardo/PUDU/rawdata/list
14
15
16  cd $RAW
17
18  while read sample
19  do
20    fastqc -o $RAW/fastqc-raw --noextract -t 4 -f fastq $RAW/${sample}.fq &
21    done < $list
22
23  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

```
1  #!/bin/bash
2
3  source ~/miniconda3/bin/activate
4  conda activate secuenciasQC
5
6  fastqc -o ~/genomes/QC_estudianteX -t 1 -f fastq ~/genomes/m2267sub2_R2.fastq.gz
7
```

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 nohup

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

- Podemos monitorear con htop para ver que se está ejecutando
- Al finalizar los procesos, cambiar de ruta a ~/genomes/QC_estudianteX y ejecutar:

```
$ multiqc .
```

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

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@leftrararu.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](http://www.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)

Documentation

A [copy of the FastQC](#) documentation is available

Example Reports

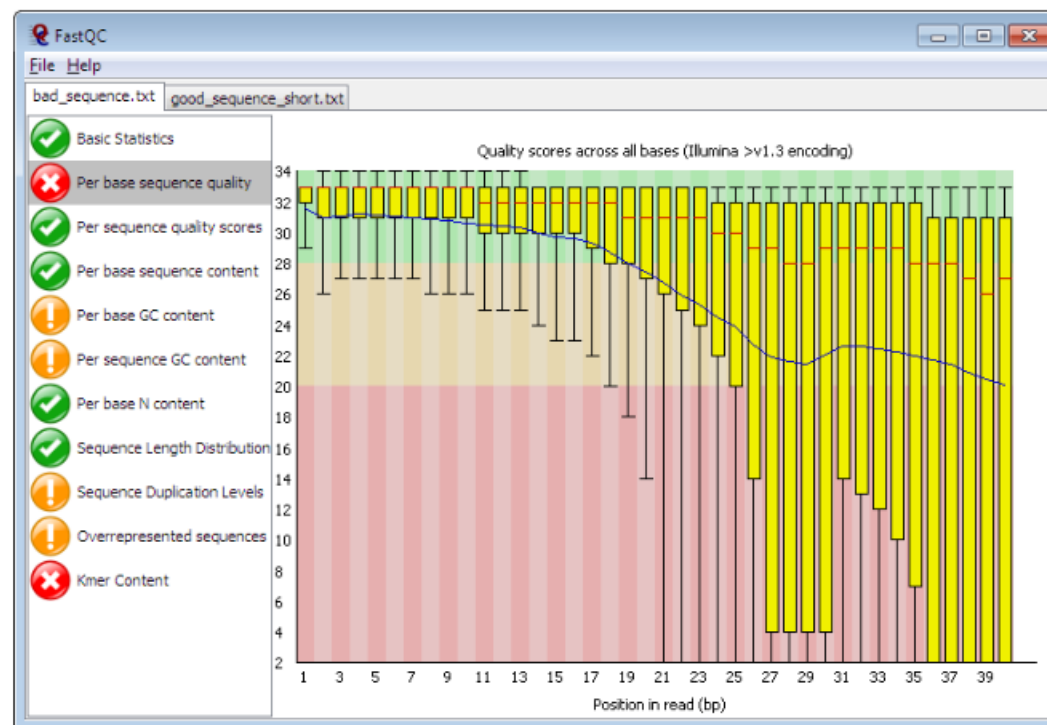
- [Good Illumina Data](#)
- [Bad Illumina Data](#)
- [Adapter dimer contaminated run](#)
- [Small RNA with read-through adapter](#)
- [Reduced Representation BS-Seq](#)
- [PacBio](#)
- [454](#)



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](#)





Supported by **seqeralabs**

Latest release: v1.14

Citations 3.7k

Aggregate results from bioinformatics analyses across many samples into a single report

MultiQC searches a given directory for analysis logs and compiles a HTML report. It's a general use tool, perfect for summarising the output from numerous bioinformatics tools.

[Introduction to MultiQC](#)[Installing MultiQC](#)[Running MultiQC](#)[Using MultiQC Reports](#)[English GB](#)[Español ES](#)[GitHub](#)[Python Package Index](#)[Documentation](#)[129 supported tools](#)[Get help on Slack](#)[Follow on Twitter](#)[Citation](#)[Quick install](#)

```
conda install multiqc # Install ⚠️
multiqc . # Run
```

[pip](#)[conda](#)[docker](#)

Need a little more help? [See the full installation instructions](#).

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?

$$\frac{(\text{Reads totales (R1 + R2)} * \text{largo de reads} / 1.000.000.000 \text{ (tamaño GigaBase)})}{2.4 \text{ (tamaño del genoma)}}$$

MultiQC

- multiqc_report.html [Link](#)

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

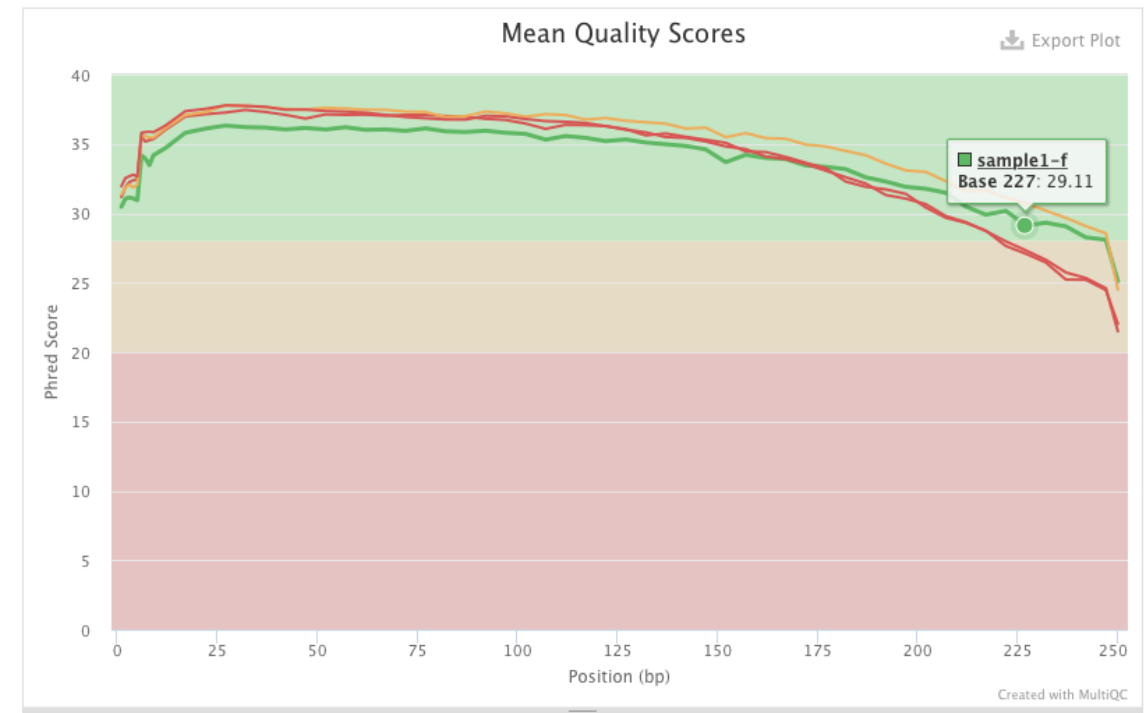
[FastQC](#) is a quality control tool for high throughput sequence data, written by Simon Andrews at the Babraham Institute in Cambridge.

Sequence Quality Histograms

1 1 2

The mean quality value across each base position in the read. See the [FastQC help](#).

Y-Limits: ☒ on



Phred quality score

+SEQ_ID

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

[LINK](#)

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%



*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.

