AP2 Herramientas de alineamiento, calidad y pre-procesamiento de secuencias

Instrucciones: Contesta en el espacio a la pregunta y proporciona una captura de pantalla cuando se solicite. Ajusta el espacio para incluir la captura de pantalla y que sea legible.

AP2.1 Caracterización de una proteína mediante la herramienta blast (5 puntos)

Queremos caracterizar una proteína problema que se encuentra en el archivo problema.fasta y vamos a llevarlo a cabo mediante Blast, usando dos bases de datos diferentes. Para ello vamos a utilizar una base de datos personalizada que podemos obtener mediante el archivo CustomDB.fasta y la base de datos del GenBank del NCBI.

Empezaremos por un análisis en local, realiza un blast en local:

2.1.1 Proporciona los comandos utilizados para realizar el blast en local en texto junto a una captura de pantalla en la que parezca el terminal con: el prompt, el comando utilizado y el resultado obtenido.

Comando:

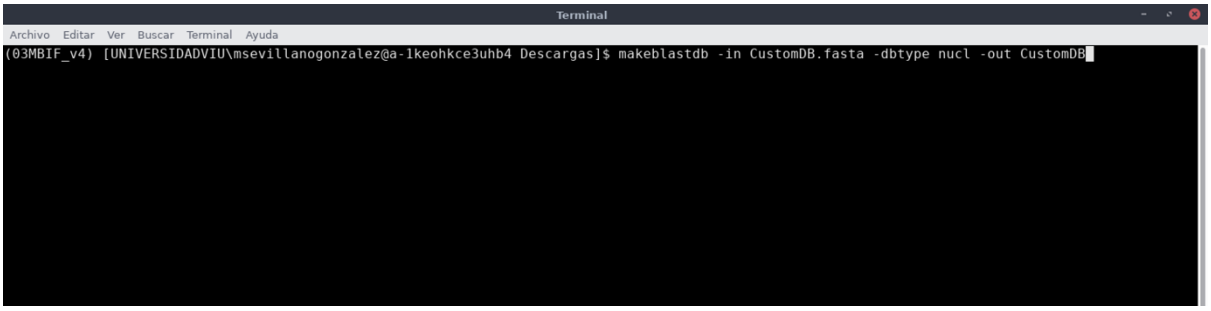
Primero se crea la base de datos en un archivo, con el comando: makeblastdb -in CustomDB.fasta -dbtype nucl -out CustomDB

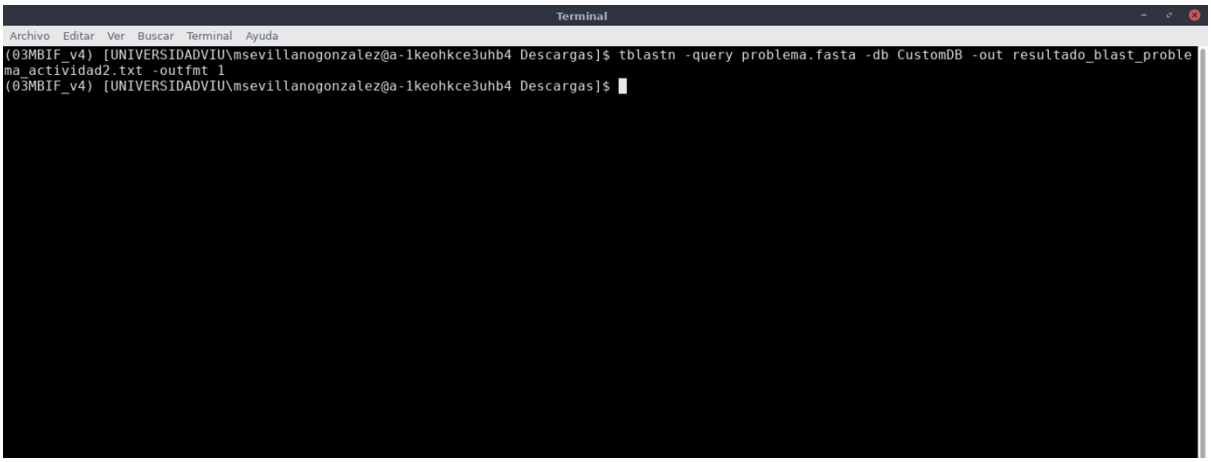
Después se realiza el blast, que en este caso al enfrentar una secuencia problema de aminoácidos de una proteína frente a una base de datos de nucleótidos la herramienta a utilizar es tblastn. Comando completo:

tblastn -query problema.fasta -db CustomDB -out resultado_blast_problema_actividad2.txt -outfm 1

Captura:

En la siguiente captura no aparece el prompt porque me acordé después y ya había hecho clear.



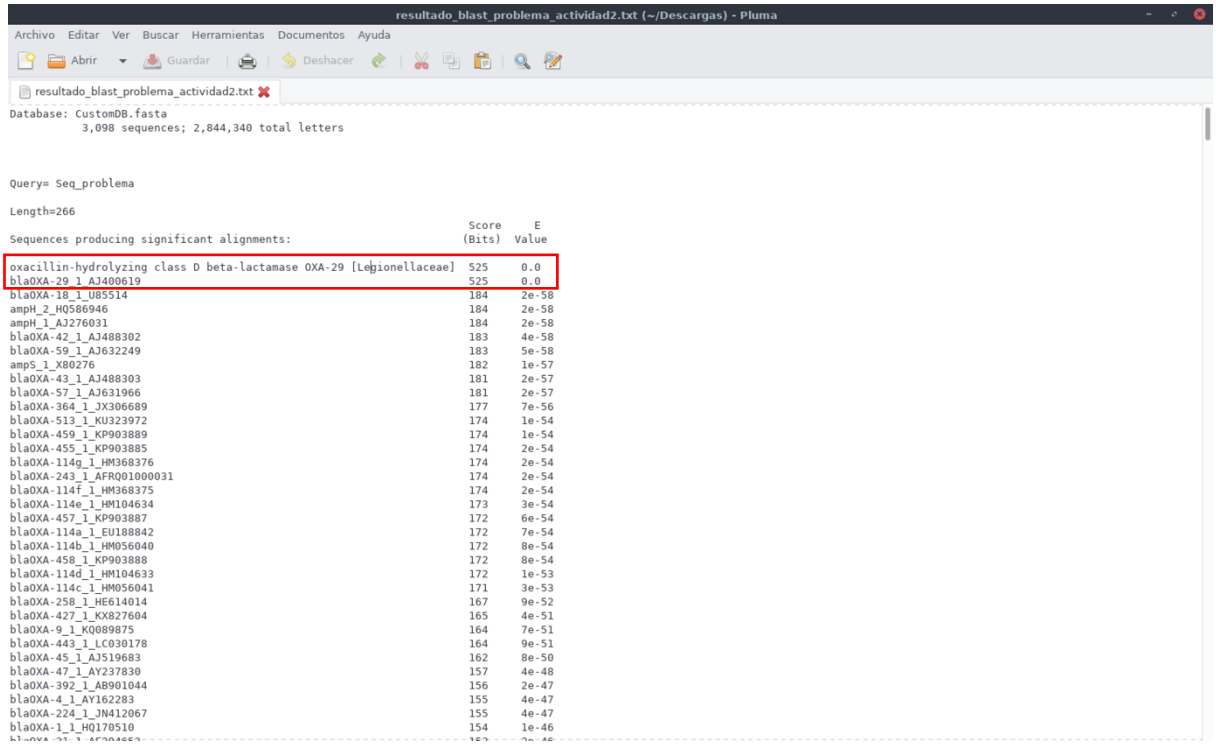


2.1.2 Indica y justifica cual es la proteína más relacionada y una captura de pantalla del resultado.

Respuesta:

La proteína más relacionada es la beta-lactamasa OXA-29 (oxacilina), o blaOXA-29, una betalactamasa de la clase D, ya que es la que aparece con un e-value de 0.0, que calcula la probabilidad de obtener un falso positivo en el alineamiento, siendo en este caso de 0. Por otro lado, también es la que tiene un valor de Bitscore más alto, que valora la identidad y la similitud de las dos secuencias, lo que la hace también la más relacionada de todas las que aparecen. En la siguiente imagen se marca con un cuadrado en rojo.

Captura:



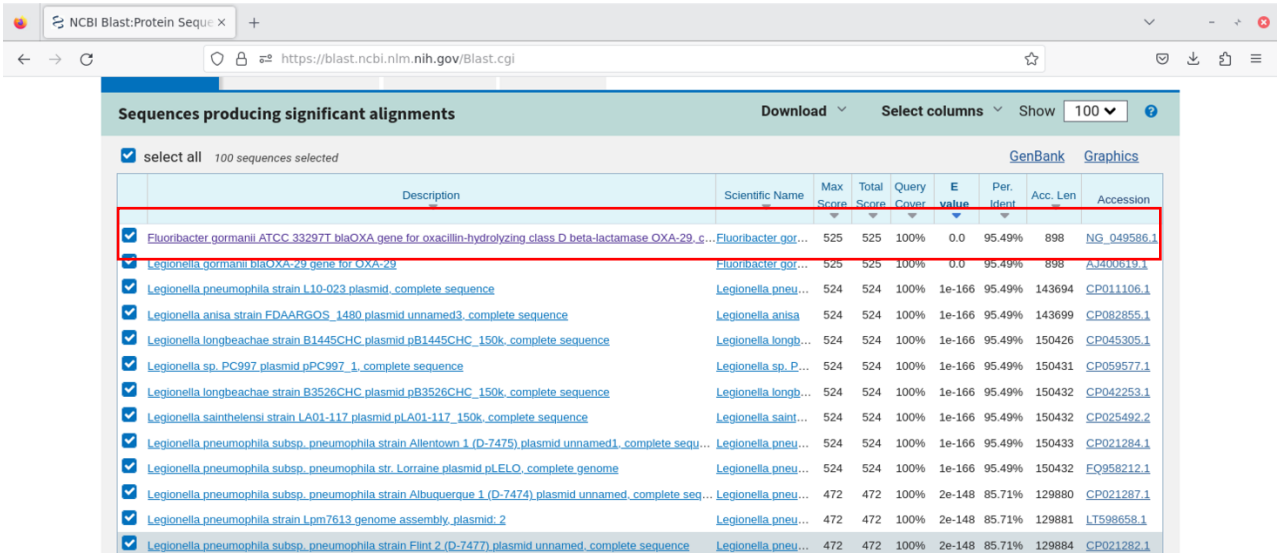
Seguiremos con un análisis en la web, blast en la web mediante la herramienta online del NCBI https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

2.1.3 Indica cual es la proteína más relacionada y una captura de pantalla del resultado.

Respuesta:

La proteína más relacionada es la beta-lactamasa OXA 29, oxalicina, de clase D.

Captura: Realizando un tblastn en web.



Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Fluoribacter gormanii ATCC 33297T blaOXA gene for oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-29, c...	Fluoribacter gor...	525	525	100%	0.0	95.49%	898	NG_049586.1
Legionella gormanii blaOXA-29 gene for OXA-29	Fluoribacter gor...	525	525	100%	0.0	95.49%	898	AJ400619.1
Legionella pneumophila strain L10-023 plasmid, complete sequence	Legionella pneu...	524	524	100%	1e-166	95.49%	143694	CP011106.1
Legionella anisa strain FDAARGOS_1480 plasmid unnamed3, complete sequence	Legionella anisa	524	524	100%	1e-166	95.49%	143699	CP082855.1
Legionella longbeachae strain B1445CHC plasmid pB1445CHC_150k, complete sequence	Legionella longb...	524	524	100%	1e-166	95.49%	150426	CP045305.1
Legionella sp. PC997 plasmid pPC997_1, complete sequence	Legionella sp. P...	524	524	100%	1e-166	95.49%	150431	CP059577.1
Legionella longbeachae strain B3526CHC plasmid pB3526CHC_150k, complete sequence	Legionella longb...	524	524	100%	1e-166	95.49%	150432	CP042253.1
Legionella sainthelensi strain LA01-117 plasmid pLA01-117_150k, complete sequence	Legionella saint...	524	524	100%	1e-166	95.49%	150432	CP025492.2
Legionella pneumophila subsp. pneumophila strain Allentown 1 (D-7475) plasmid unnamed1, complete sequ...	Legionella pneu...	524	524	100%	1e-166	95.49%	150433	CP021284.1
Legionella pneumophila subsp. pneumophila str. Lorraine plasmid pLELO, complete genome	Legionella pneu...	524	524	100%	1e-166	95.49%	150432	FQ958212.1
Legionella pneumophila subsp. pneumophila strain Albuquergue 1 (D-7474) plasmid unnamed, complete seq...	Legionella pneu...	472	472	100%	2e-148	85.71%	129880	CP021287.1
Legionella pneumophila strain Lpm7613 genome assembly, plasmid: 2	Legionella pneu...	472	472	100%	2e-148	85.71%	129881	LT598658.1
Legionella pneumophila subsp. pneumophila strain Flint 2 (D-7477) plasmid unnamed, complete sequence	Legionella pneu...	472	472	100%	2e-148	85.71%	129884	CP021282.1

2.1.4 Indica evalue e identidad en el mejor hit.

Respuesta:

e-value: 0.0

Identidad (Bitscore): 525

2.1.5 ¿Qué método presenta un mejor resultado, web o local? Justifica la respuesta.

Respuesta: Presenta un mejor resultado en web, pues el alineamiento de las secuencias que se obtiene con la web (Imagen 1) es mucho mejor que el alineamiento de las secuencias que se obtiene mediante blast local (Imagen 2), ya que en el alineamiento local los puntos señalan las coincidencias y las letras los cambios o diferencias, por lo que hay bastantes cambios. Mientras que en el alineamiento web se puede observar que el alineamiento coincide en toda la secuencia.

Por otro lado, si realizamos un blastp en web, en lugar de un tblastn, se obtiene un resultado mejor con un Bitscore de 552, un e-value de 0.0 y un porcentaje de identidad del 100% (Imagen 3), frente al porcentaje de identidad obtenido al realizar tblasn que es de un 95. 49%.

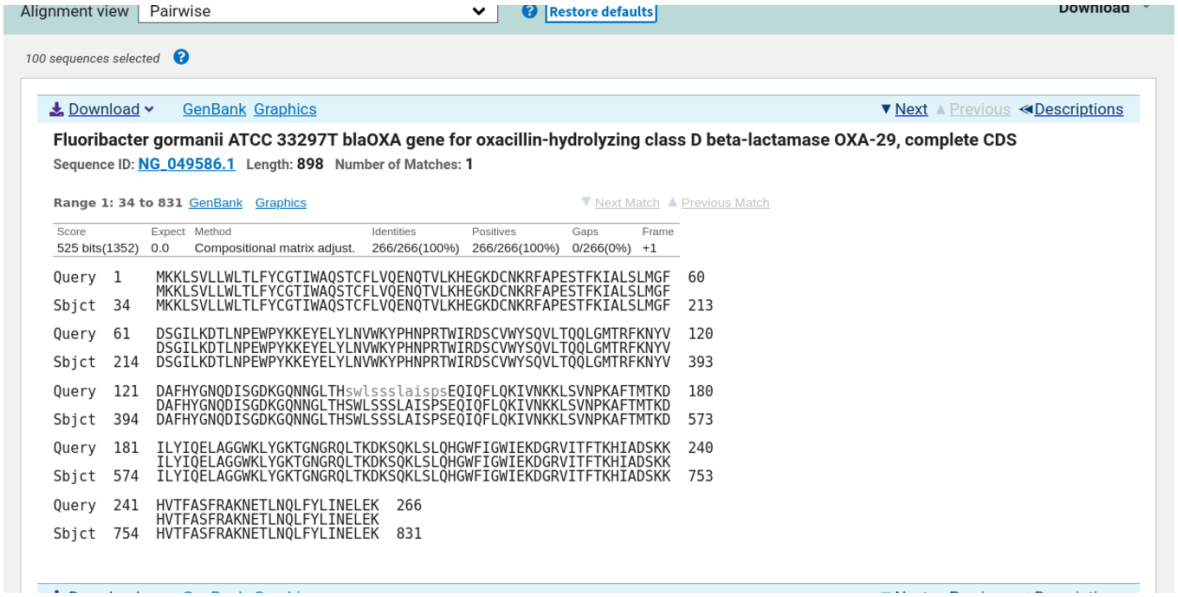


Imagen 1. Alineamiento con la herramienta tblastn obtenido en web.

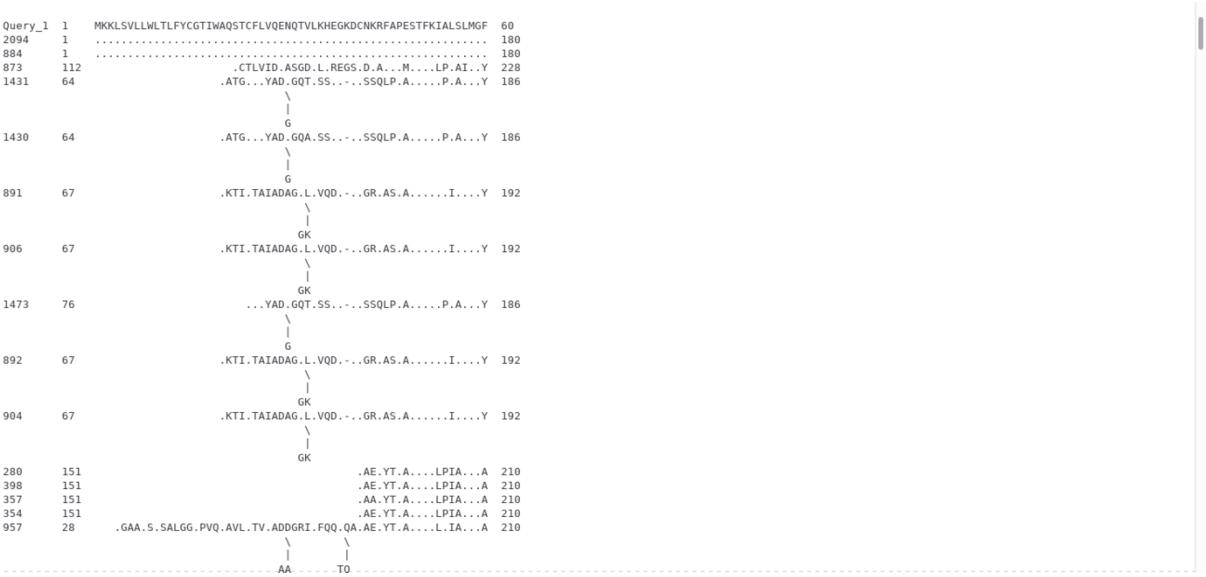


Imagen 2. Alineamiento en local.

AP2.2 Caracterización de regiones conservadas en proteínas (3 puntos)

Vamos a analizar varias proteínas homólogas a la frataxina humana, proteína implicada en la enfermedad ataxia de Friedreich. *Archivo: frataxin_mamiferos.fasta*

Empezaremos por un alineamiento en local, mediante la herramienta muscle:

2.2.1 Proporciona los comandos utilizados para realizar un alineamiento con salida en html en texto junto a una captura de pantalla en la que parezca el terminal con: el prompt, el comando utilizado y el resultado obtenido.

Comando:

muscle -in frataxin_mamiferos.fasta -out muscle_frataxina_results -html

Captura:

Imagen del comando utilizado y el prompt:

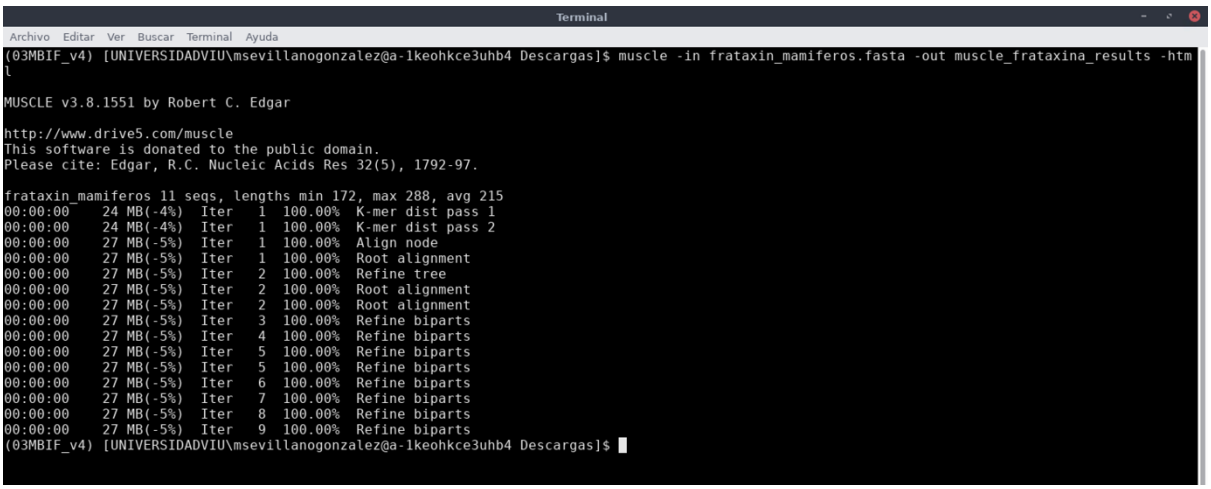
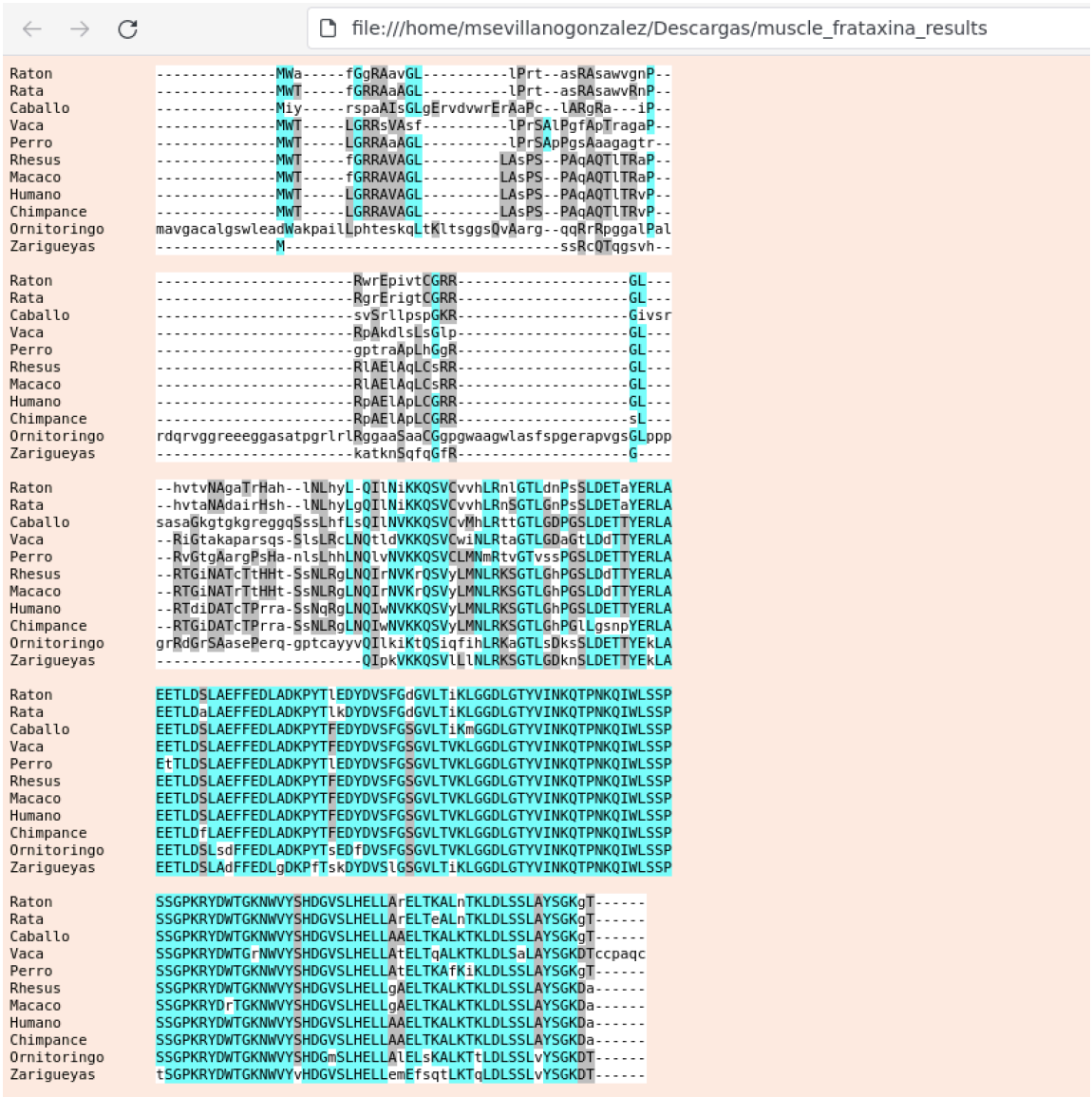


Imagen del resultado obtenido:

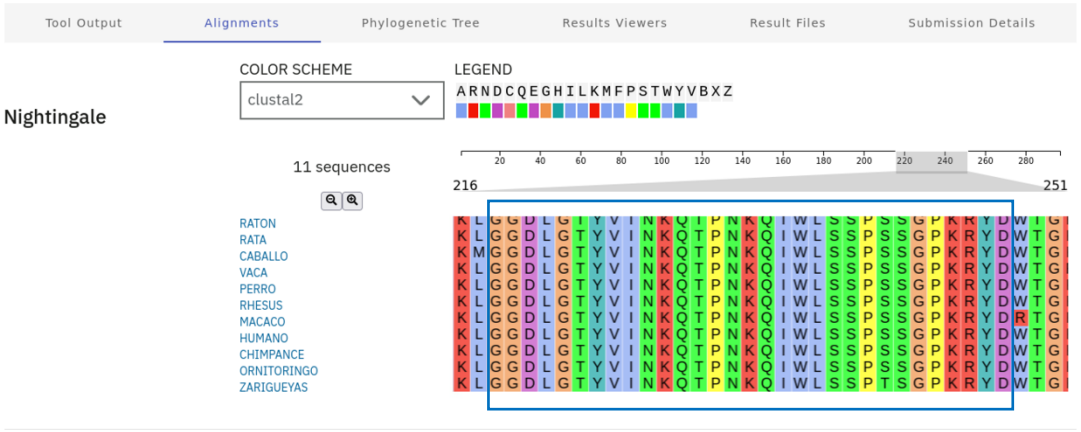


Seguiremos con un análisis en la web, alineamiento en la web mediante la herramienta online del EBI: https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/

2.2.2 Proporciona una captura de pantalla con el resultado e indica y justifica en que mitad o región el alineamiento es más óptimo.

Respuesta: De la región 220 a la 249 aproximadamente es la que se observa más coincidencia entre todas las secuencias de todos los individuos, como se puede apreciar en las siguientes imágenes señalado por un recuadro. Los asteriscos debajo de las secuencias indican las coincidencias y parece haber una serie de aminoácidos que se encuentran conservados entre las especies.

Captura:




```
Raton          EETLDSLAEFFEDLADKPYTLEDYDVSFGDGVLTIKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSP
Rata           EETLDALAEFFEDLADKPYTLKDYDVSFGDGVLTIKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSP
Caballo        EETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSFGSGVLTIKMGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSP
Vaca           EETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSFGSGVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSP
Perro          ETTLDSLAEFFEDLADKPYTLEDYDVSFGSGVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSP
Rhesus         EETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSFGSGVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSP
Macaco         EETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSFGSGVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSP
Humano         EETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSFGSGVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSP
Chimpance      EETLDFLAEFFEDLADKPYTFEDYDVSFGSGVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSP
Ornitoringo    EETLDSLSDFFEDLADKPYTSEDFDVSFGSGVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSP
Zarigueyas     EETLDSLADFFEDLGDKPFTSKDYDVSLGSGVLTIKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSP
               * *** *::*****.***:* :*:***:*.****:*:**********************

Raton          SSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLARELTKALNTKLDLSSLAYSGKGT------
Rata           SSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLARELTEALNTKLDLSSLAYSGKGT------
Caballo        SSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSSLAYSGKGT------
Vaca           SSGPKRYDWTGRNWVYSHDGVSLHELLATELTQALKTKLDLSALAYSGKDTCCPAQC
Perro          SSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLATELTKAFKIKLDLSSLAYSGKGT------
Rhesus         SSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLGAELTKALKTKLDLSSLAYSGKDA------
Macaco         SSGPKRYDRTGKNWVYSHDGVSLHELLGAELTKALKTKLDLSSLAYSGKDA------
Humano         SSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSSLAYSGKDA------
Chimpance      SSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSSLAYSGKDA------
Ornitoringo    SSGPKRYDWTGKNWVYSHDGMSLHELLALELSKALKTTLDLSSLVYSGKDT------
Zarigueyas     TSGPKRYDWTGKNWVYVHDGVSLHELLEMEFSQTLKTQLDLSSLVYSGKDT------
               :*******.**.**** ***:******  *:::::  ****:*.****.:
```

2.2.3 Elimina las dos secuencias más alejadas, ornitorrinco y zarigüeya, repite con ambas técnicas el alineamiento proporcionando los comandos utilizados y capturas de pantalla y contesta justificando la respuesta: ¿ha mejorado o empeorado el alineamiento? ¿Se puede identificar regiones más conservadas y menos conservadas?

Respuesta: Sí ha mejorado el alineamiento, quitando por ejemplo las dos primeras partes, que eran en las que menos coincidencias había. Y han aparecido más regiones que parecen conservadas, o las

que ya parecían conservadas ahora son regiones algo más largas. Se señalan en las siguientes imágenes con un recuadro azul:

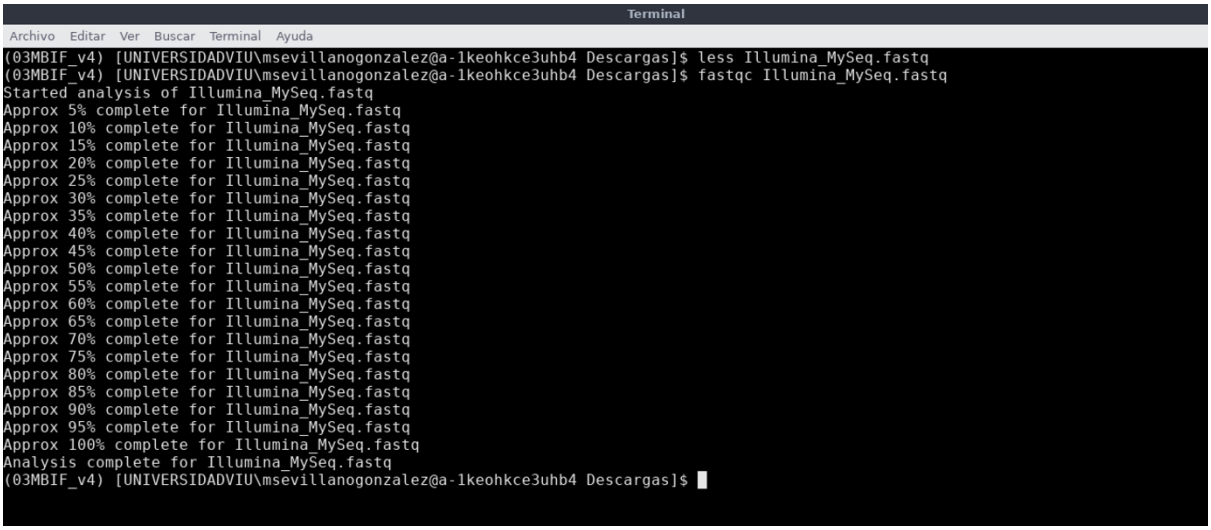
AP2.3 Calidad y pre-procesamiento de secuencias (2 puntos)

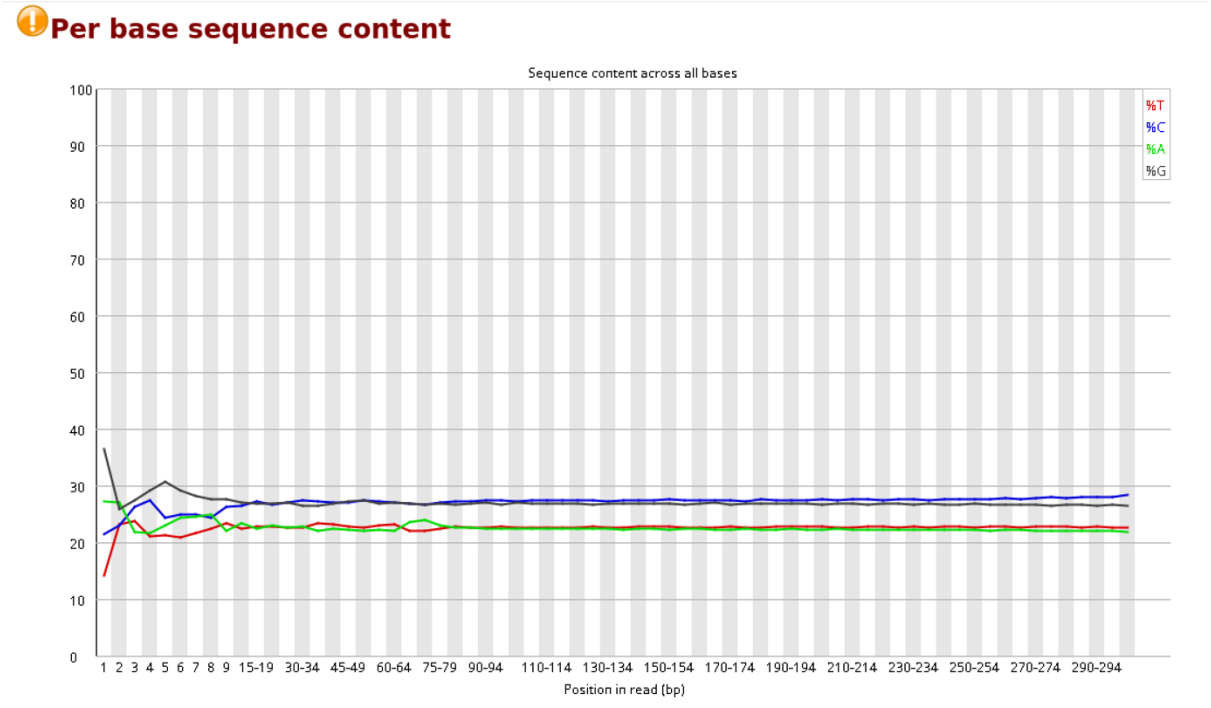
Utilizando el archivo de Illumina_MySeq.fastq:

2.3.1 Realiza un primer análisis de calidad con la herramienta fastqc. Proporciona el comando utilizado y una captura de pantalla de la sección del informe que muestra "*Per base sequence content*".

Comando: fastqc Illumina_MySeq.fastq

Captura:





2.3.2 Mediante la herramienta prinseq-lite.pl realiza un filtrado por calidad mínima media Q25 y recorta los primeros 20 nucleótidos de las secuencias en 5'. Proporciona el comando utilizado y una captura de pantalla de la sección del informe que muestra "*Per base sequence content*".

Comando: Los comandos a seguir serían:

Primero un fastqc Illumina_MySeq.fastq

Después se haría el filtrado por calidad: prinseq-lite.pl -fastq Illumina_MySeq.fastq -min_qual_mean 25

fastq Illumina_MySeq_prinseq_good_DHXy.fastq

Y, por último, para recortar los 20 nucleótidos de las secuencias en 5': prinseq-lite.pl -fastq Illumina_MySeq_prinseq_good_DHXy.fastq -trim_left 20

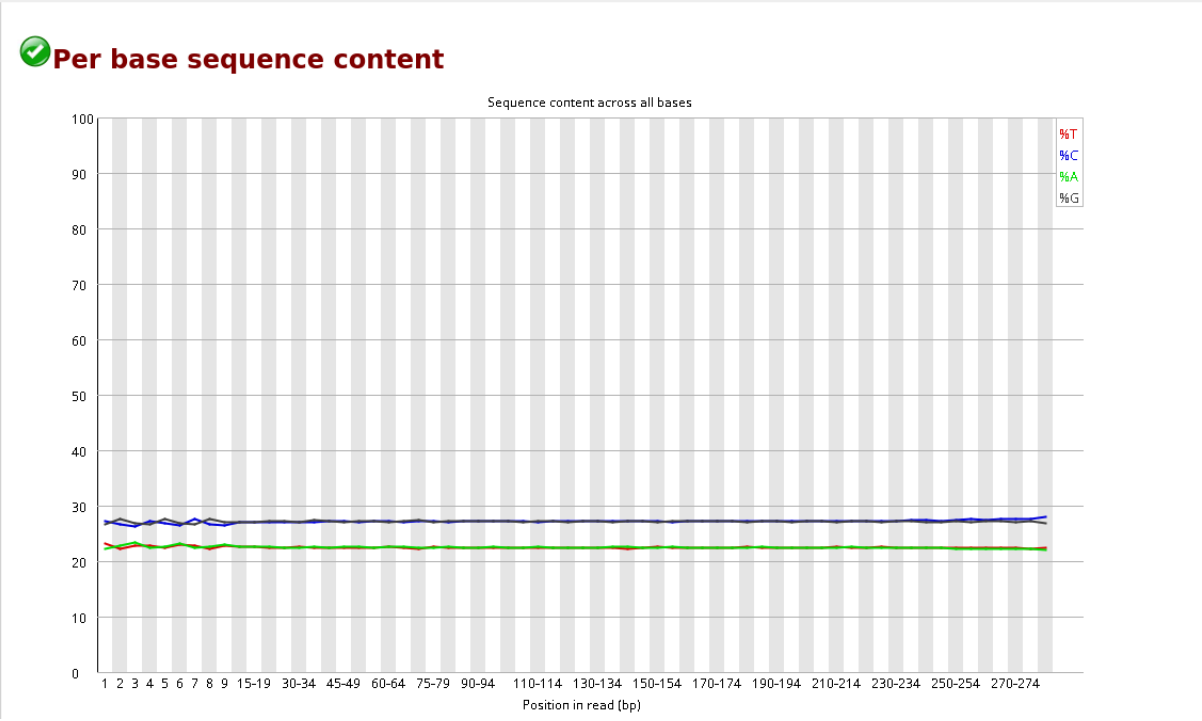
Y fastqc del nuevo archivo: fastqc Illumina_MySeq_prinseq_good_DHXy_prinseq_good_Kw5Q.fastq

Otra forma de hacerlo podría ser combinando ambos comandos a la vez, para filtrar por calidad y recortando los 20 primeros nucleótidos con el comando:

prinseq-lite.pl -fastq Illumina_MySeq.fastq -min_qual_mean 25 -trim_left 20

Captura:

Captura de pantalla del resultado de *"Per base sequence content"* de la primera forma de hacerlo.



Capturas de pantalla de la segunda forma de hacerlo, combinando el filtrado por calidad y el recorte de los 20 primeros nucleótidos en un mismo comando:

```
(03MBIF_v4) [UNIVERSIDADVIU\msevillanogonzalez@a-1keohkce3uhb4 Descargas]$ prinseq-lite.pl -fastq Illumina_MySeq.fastq -min_qual_mean 25 -trim_le
ft 20
Input and filter stats:
        Input sequences: 250,000
        Input bases: 75,000,000
        Input mean length: 300.00
        Good sequences: 213,546 (85.42%)
        Good bases: 59,792,880
        Good mean length: 280.00
        Bad sequences: 36,454 (14.58%)
        Bad bases: 10,936,200
        Bad mean length: 300.00
        Sequences filtered by specified parameters:
        min_qual_mean: 36454
(03MBIF_v4) [UNIVERSIDADVIU\msevillanogonzalez@a-1keohkce3uhb4 Descargas]$
```