ENSAMBLE DE TRANSCRIPTOMA DE NOVO

M. En C. Jérôme Jean Verleyen
Y M. En C. Verónica Jiménez Jacinto
veronica.jimenez@ibt.unam.mx
Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática
Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico a las Ciencias Genómicas
UNAM

Enero 2023

UUSMB
UNIDAD UNIVERSITARIA DE SECUENCIACIÓN MASIVA Y BIOINFORMÁ

Instituto Nacional de Salud Pública

Objetivos a lograr

Explicar que es un transcripto de Novo. Conocer y trabajar con una herramienta de reconstrucción de transcriptomas *de novo*, tanto para organismos procariontes y eucariontes. Se utilizarán varios parámetros que nos permitan ensamblar secuencias de datos tipo RNAseq de la manera más pertinente, así como determinar la abundancia de cada uno de los transcritos reconstruidos y en los casos de organismos eucariontes, determinar la existencia de isoformas.

TEMARIO

1. Introducción a las metodologías de transcriptoma.
2. Aplicaciones
3. Flujo de trabajo
4. Linea de comando típica de Trinity y Consideraciones previas
   a. Recortando bases de baja calidad
   b. Ensamblado de grandes conjuntos de datos
   c. Minimizando la Fusión de transcritos

TEMARIO

5. Monitoreo del progreso de trinity
6. Revisando la salida del ensamblado (Output Trinity Assembly)
   a. Evaluación de la calidad del ensamblado
   b. Análisis del transcriptoma completo para organismos modelos y no modelos usando Blast
   c. Las estadísticas Nx and ExN50 de un transcriptoma de novo
6. Cuantificación de los transcritos usando RSEM y Kallisto

1. Introducción al ensamblado de Novo de transcritos

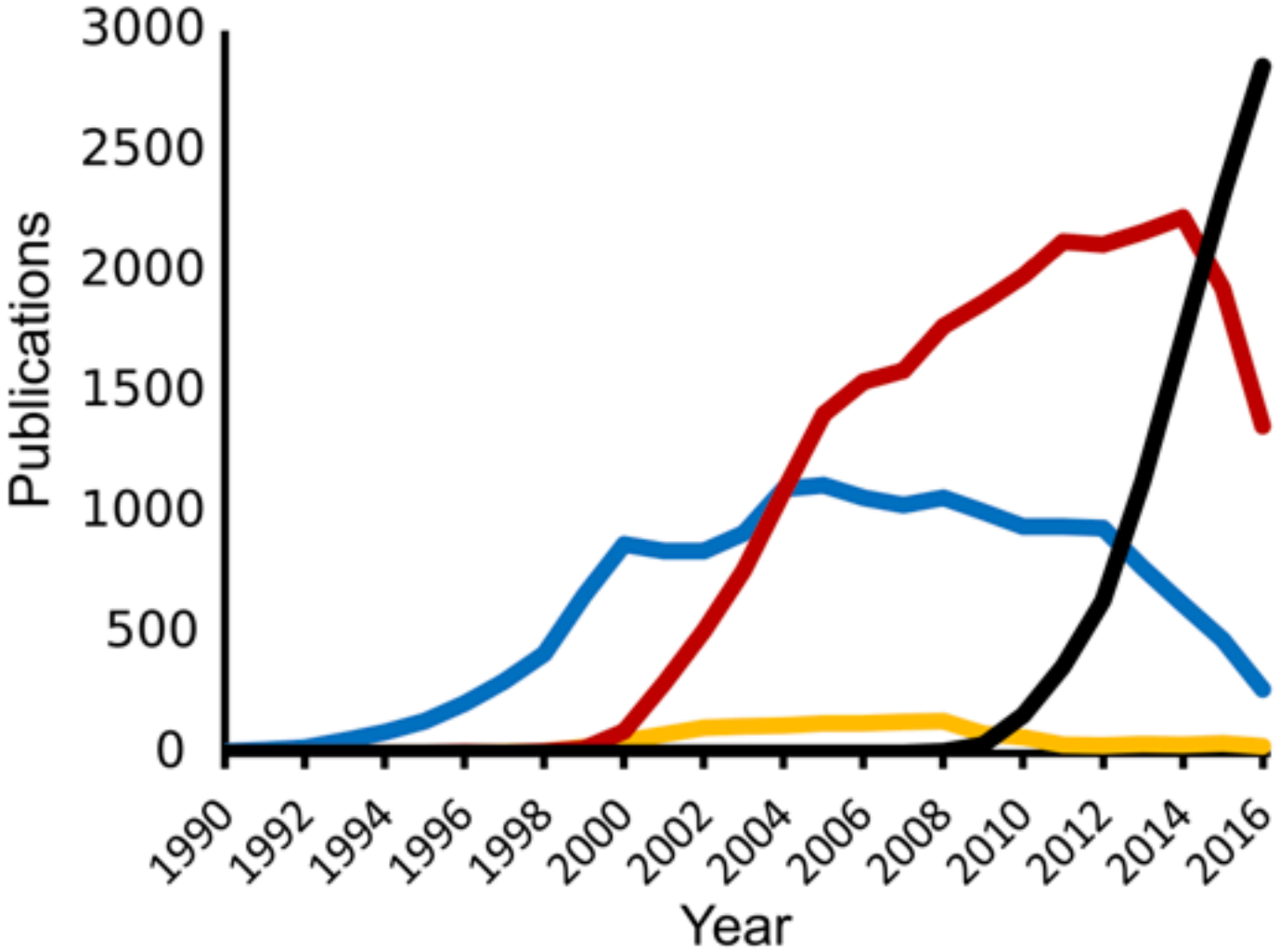
El lenguaje genético

En el lenguaje genético, la organización de los genes (las palabras) y su regulación (el tiempo y la manera en que las frases son leídas o bien no leídas) determina los distintos tipos celulares que forman por ejemplo, el corazón, el riñón y el cerebro.

Al igual que las luces de un árbol de navidad, los genes de las células pueden estar encendidos o apagados alternativamente de acuerdo a un programa patrón. Algunos genes se apagan y encienden de manera intermitente, otros siempre están apagados, otros solo están encendidos por un corto periodo de tiempo.

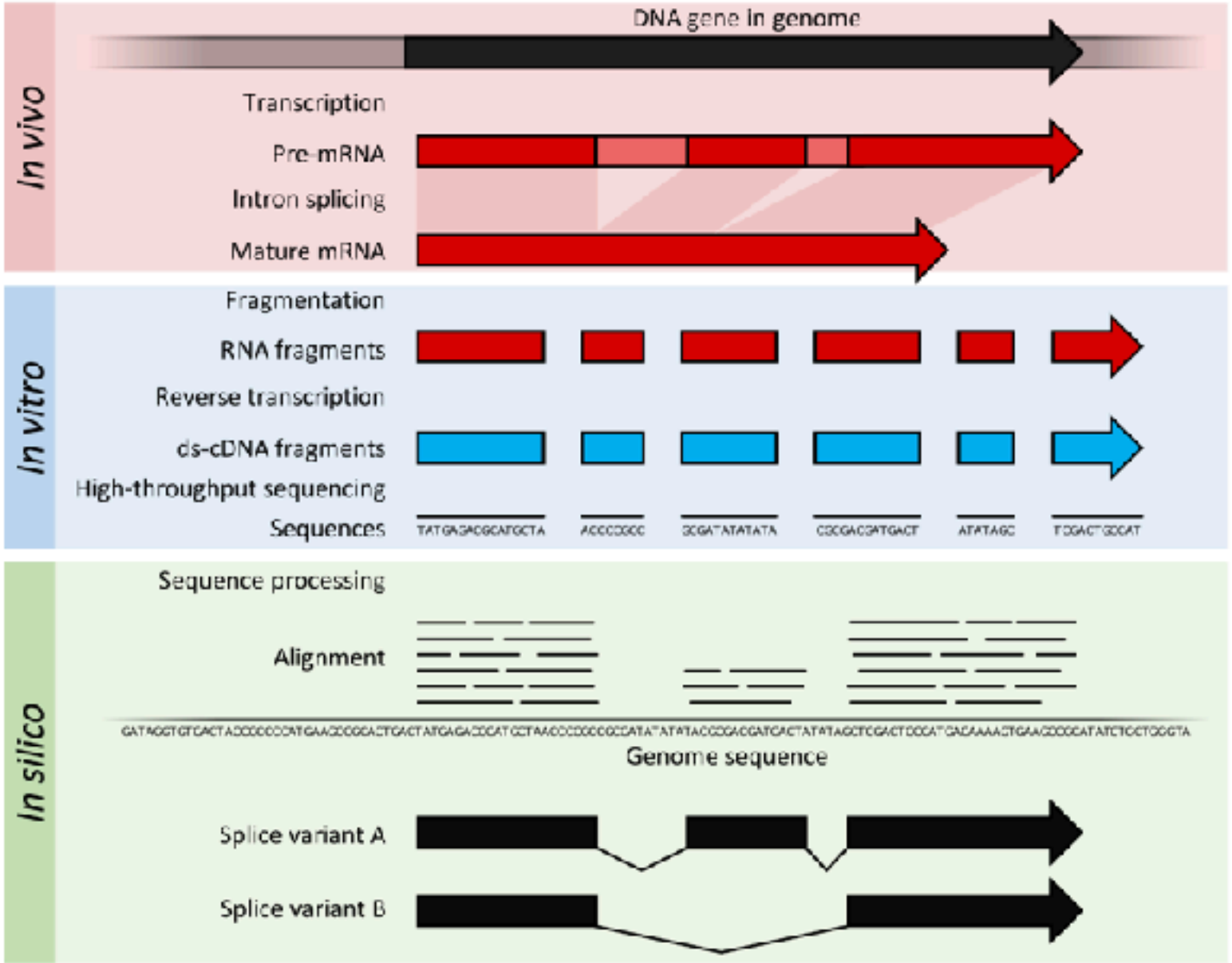
Las tecnologías transcriptómicas son las técnicas que se utilizan para estudiar el transcriptoma, la suma de todas las transcripciones de ARN. El contenido de información de un organismo se registra en el ADN de su genoma y se expresa a través de la transcripción. Aquí, el ARNm sirve como una molécula intermediaria transitoria en la red de información, mientras que los ARN no codificantes realizan diversas funciones adicionales. Un transcriptoma captura una instantánea en el tiempo de las transcripciones totales presentes en una célula.

Metodos transcriptomicos usados en el tiempo



Fuente: Trasncriptomics technologies

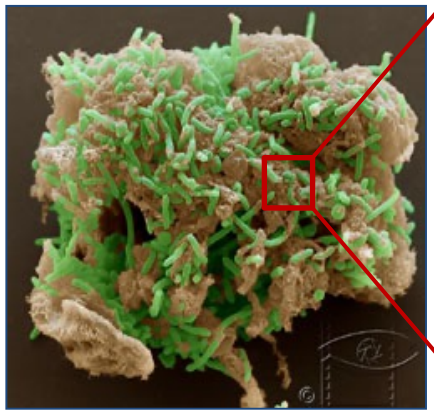
RNA-seq



Fuente: https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457.g004

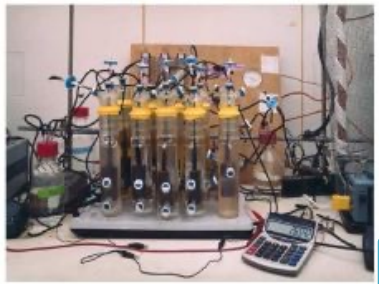
2. Aplicaciones

Análisis de Expresión diferencial de genes en Geobacter sulfurreducens

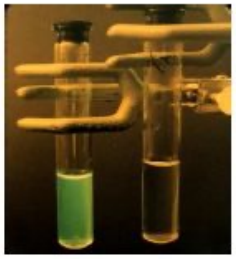


Obtener información de las funciones que realizan un conjunto de genes, con la finalidad de optimizar el desarrollo de la bacteria y utilizarla en la bioremediación de metales pesados

Electricidad



Biorremediación



Aplicaci

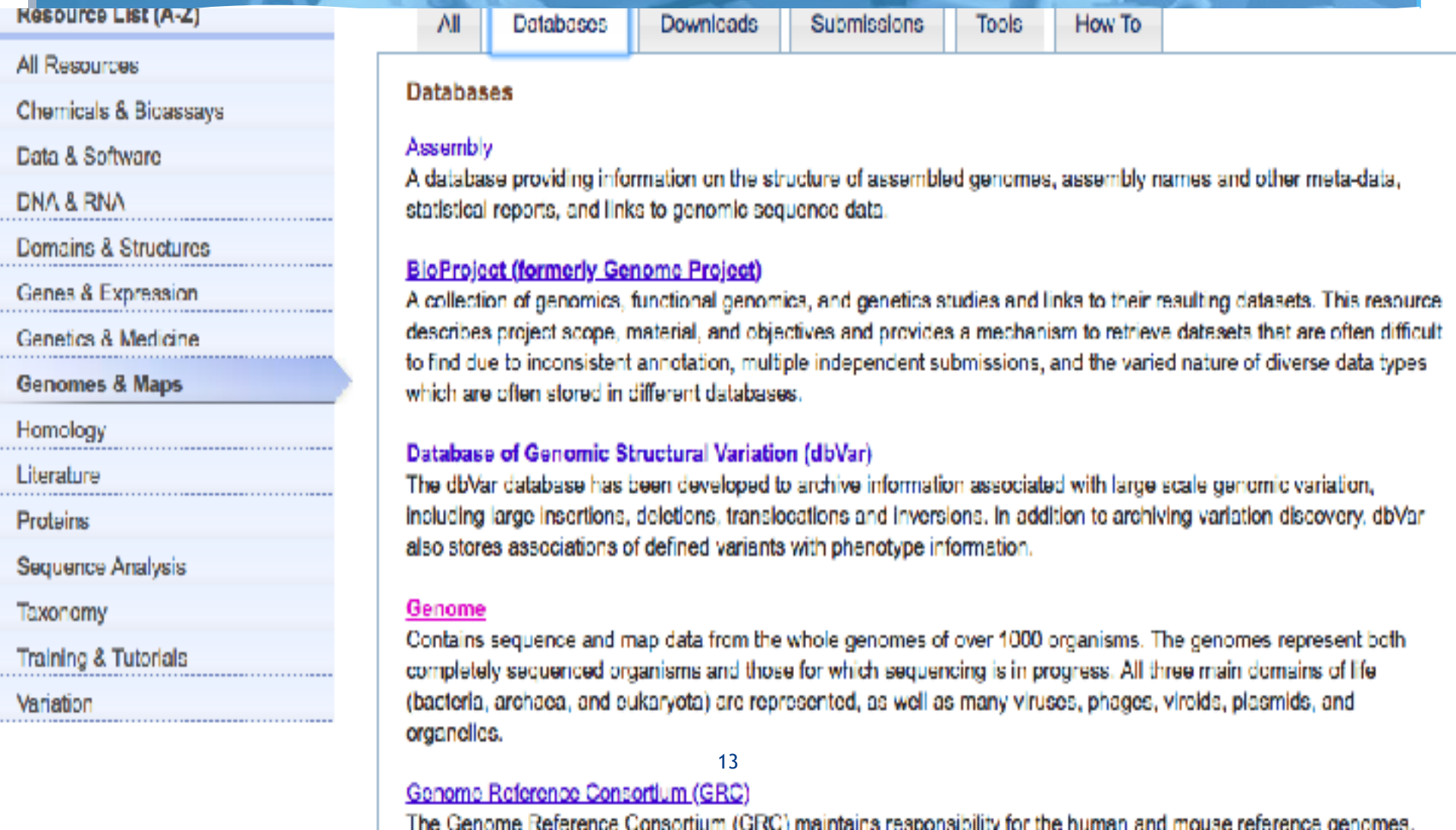
- ★ **Biore (urar**
- ★ **Prod**

El genoma del ajolote puede esconder el secreto para regenerar nuestro cuerpo.

Para comprender completamente la regeneración y descubrir por qué es tan limitada en la mayoría de las especies, los científicos deben tener acceso a los datos del genoma para estudiar la regulación y la evolución de los genes.

Los investigadores encontraron que varios genes que solo existen en ajolote y otras especies de anfibios se expresan en el tejido de las extremidades en regeneración.

¿cómo sabemos que un genoma esta secuenciado?



Search results for: **Salmonella**

Results by database

Results found in 34 databases

Literature

Bookshelf	4,099
MeSH	277
NLM Catalog	516
PubMed	91,318
PubMed Central	126,647

Genes

Gene	50,696
GEO DataSets	10,825
GEO Profiles	165,553
HomoloGene	20
PopSet	524

Proteins

Conserved Domains	444
Identical Protein Groups	5,868,827
Protein	59,785,328
Protein Clusters	9,102
Sparcle	1,357
Structure	1,850

Genomes

Assembly	10,954
BioCollections	3
BioProject	4,129
BioSample	301,200
Genome	9
Nucleotide	3,020,537
Probe	1,719
SRA	300,427

Genetics

ClinVar	7
dbGaP	13
dbSNP	0
dbVar	0
GTR	1
MedGen	61
OMIM	111

Chemicals

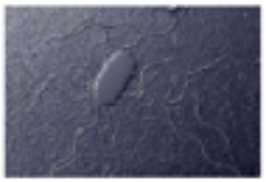
BioSystems	23,913
PubChem BioAssay	6,605
PubChem Compound	12
PubChem Substance	1,387

Cuando existe un genoma de referencia

Salmonella enterica
Reference genome: Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2
Download sequences in FASTA format for **genome**, **protein**
Download genome annotation in **GFF**, **GenBank** or **tabular** format
BLAST against Salmonella enterica **genome**, **protein**
All 5188 genomes for species:
Browse the **list**
Download sequence and annotation from **RefSeq** or **GenBank**

isplay Settings: ▾ Overview Send to:

Organism Overview ; Genome Assembly and Annotation report [5188] ; Genome Tree report [5188] ; Genome Groups report [33] ; ID:
Plasmid Annotation Report [309]



Salmonella enterica

Causes enteric infections

Lineage: Bacteria[11938]; Proteobacteria[3723]; Gammaproteobacteria[1481]; Enterobacterales[277]; Enterobacteriaceae[129]; Salmonella[3]; Salmonella enterica[1]

Salmonella. This group of *Enterobactericiae* have pathogenic characteristics and are one of the most common causes of enteric infections (foo
poisoning) worldwide. They were named after the scientist Dr. Daniel Salmon who isolated the first organism, *Salmonella choleraesuis*, from the
intestine of a pig. There are now two More...

Cuando no existe un genoma de referencia: nopal..

Opuntia ✖ Search

NCBI Databases

Results found in 18 databases for: **Opuntia**

Literature

Bookshelf	25
MeSH	1
NLM Catalog	5
PubMed	870
PubMed Central	1,849

Genes

Gene	7
GEO DataSets	1,061
GEO Profiles	0
HomoloGene	0
PopSet	395
UniGene	0

Genetics

ClinVar	0
dbGaP	0
dbSNP	0
dbVar	0
GTR	0
MedGen	1
OMIM	0

Proteins

Conserved Domains	0
Identical Protein Groups	493
Protein	5,421
Protein Clusters	0
Sparcle	0
Structure	0

Genomes

Assembly	0
BioCollections	0
BioProject	12
BioSample	127
Genome	0
Nucleotide	3,580
Probe	0
SRA	131

Chemicals

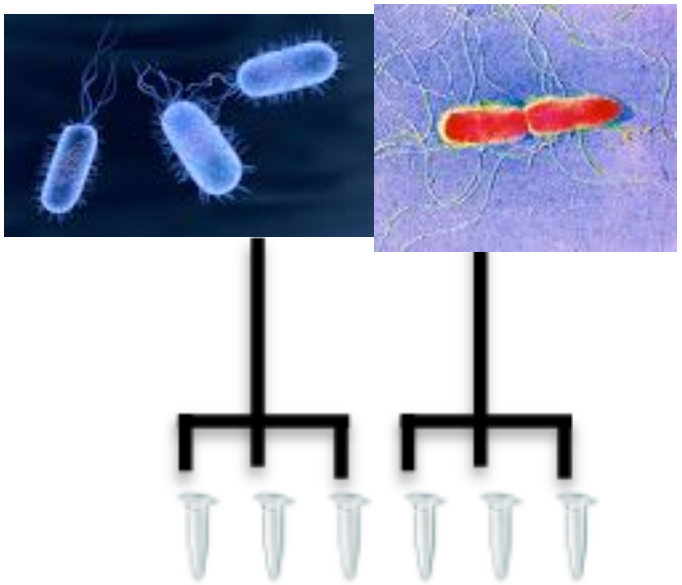
BioSystems	0
PubChem BioAssay	24
PubChem Compound	0
PubChem Substance	6

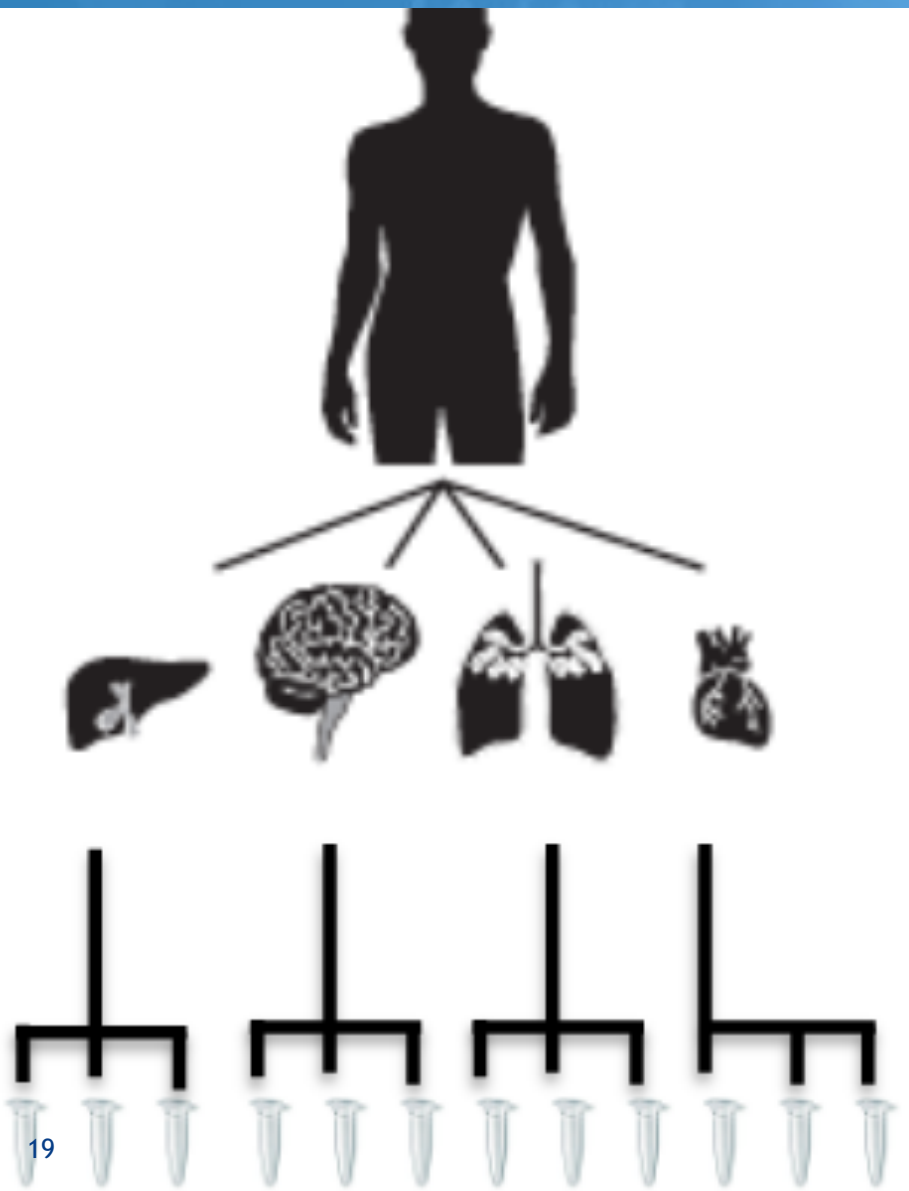
3. Flujo de trabajo

Flujo de Trabajo de RNA-seq

1. Extración y secuenciación de RNAseq
2. Quality Control
3. Ensamblado de Novo (cuando no ha sido reportado el transcrito)
4. Alineamiento
5. Cuantificación
6. Análisis de expresión diferencial

Paso 1. Preparación de Muestras





UNIDAD UNIVERSITARIA DE SECUENCIACIÓN MASIVA Y BIOINFORMÁTICA

Fuente: (Modificada) Nat Protoc. 2013 Aug; 8(8): 10.1038/nprot.2013.084.

Paso 1. Secuenciación

Sample1_rep1_R1.fastq Sample1_rep1_R2.fastq
Sample1_rep2_R1.fastq Sample1_rep2_R2.fastq
Sample1_rep3_R1.fastq Sample1_rep3_R2.fastq
Sample2_rep1_R1.fastq Sample2_rep1_R2.fastq
Sample2_rep2_R1.fastq Sample2_rep2_R2.fastq
Sample2_rep3_R1.fastq Sample2_rep3_R2.fastq
Sample3_rep1_R1.fastq Sample3_rep1_R2.fastq
Sample3_rep2_R1.fastq Sample3_rep2_R2.fastq
Sample3_rep3_R1.fastq Sample3_rep3_R2.fastq

more x.fastq

```
@HISEQ-MFG:495:C5WW4ACXX:2:1101:10005:5422
CGCCCTCCTACTGGTTGGACGTTTCTGTTGTGCCTCAGCTAAGGCCGCGACTTCGGCTGCAGCC
+
BBDDDDDCAABBDDDDDDBADDDDDBDDDDDDBDDDDDDDDDDDDDFHJJIFIIJJJJIJJJJIDIG
@HISEQ-MFG:495:C5WW4ACXX:2:1101:10011:54197
GAAAAGTCTATTTCGGTAAAATAGACAAAGATGTTTGGGGATACCCAGAATTCATAGATCAGGA
+
@C@FFFABFFHBBHCGFHHIIJJIBHHIJJ9EF9EGHIDGGGJIJJEIJGFGHEEGCGHGEIJG
@HISEQ-MFG:495:C5WW4ACXX:2:1101:10021:45670
TTCTCGGACAAGAGCTCCTTAAGCTTGCCGAAGTACTCGGTTTTCTTCTCGCTGATCTTGCCTC
+
DDB<BCCDDDDDDDDCCDDDDDDDDDCEFFFDBFGFIJIIGJJJJJHHFJJJJJJJJIIIHJJ
...
```

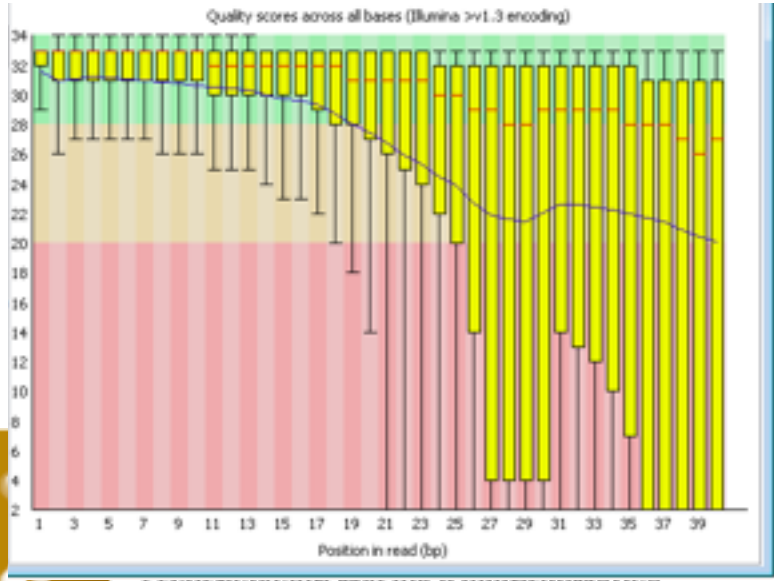
2. Quality control

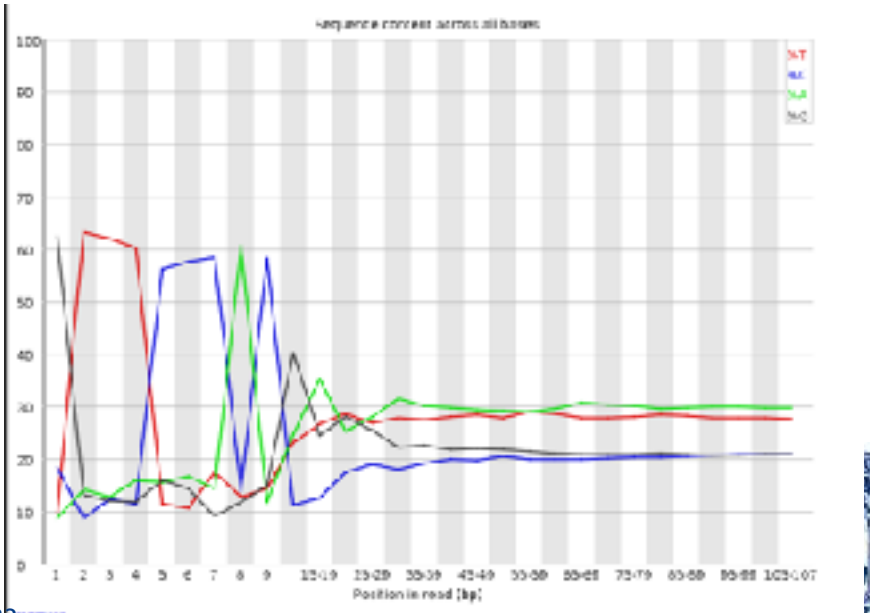
1. Extración y secuenciación de RNAseq
2. Quality Control
   - Fastqc
   - FaQCs
3. Ensamblado de Novo (cuando no ha sido reportado el transcrito)
4. Alineamiento
5. Cuantificación
6. Análisis de expresión diferencial

UUSMB
UNIDAD UNIVERSITARIA DE SECUENCIACIÓN MASIVA Y BIOINFORMÁTICA

Paso 2. Quality control

Antes de hacer un proceso de ensamblado, es recomendable realizar un análisis de calidad, para identificar secuencias sobrerepresentadas, presencia de adaptadores o algún tipo de contaminación que pueda alterar los resultados.





Realiza el reporte de calidad de algún par de secuencias o todas

```
$ mkdir QualityReport
$fastqc -o QualityReport \
/tmp/Data/Fructanos_1_R1.fastq
```

```
# Para todos:
$ fastqc -o QualityReport /tmp/Data/*.fastq
```

Podemos llevarlas a otra máquina para verlas en un navegador...

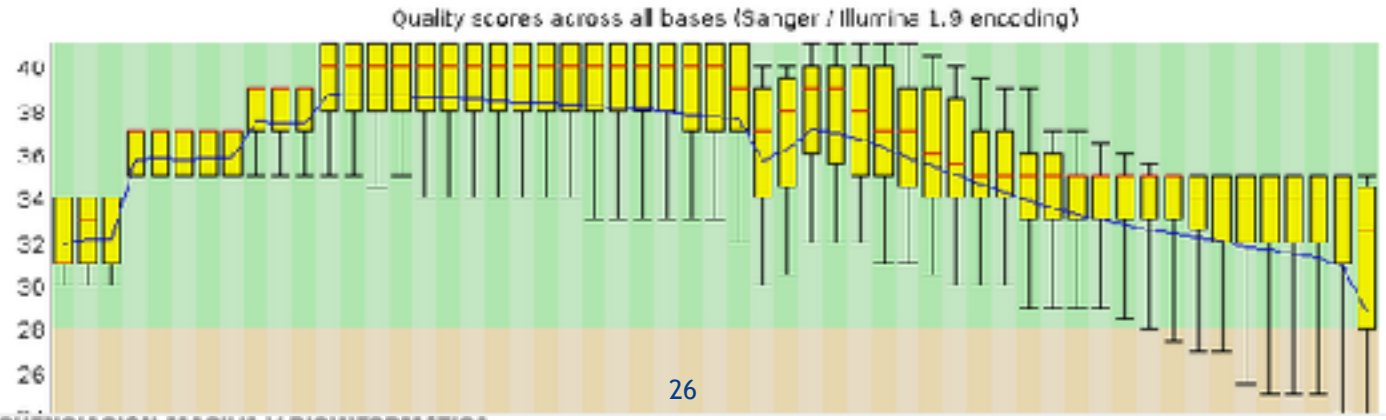
```
$ scp -r  -P 265
alumnoXX@bioinformatica.insp.mx:/home/tucuenta/
PracticaTrinity/QualityReport .
```

En un navegador abre cualquiera de los html

Basic Statistics

Measure	Value
Filename	Glicerol_3_R2.fastq
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	102020
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	101
%GC	49

Per base sequence quality



RNA-seq análisis

1. Extración y secuenciación de RNAseq
2. Quality Control
3. Ensamblado de Novo (cuando no ha sido reportado el transcrito)
4. Alineamiento
5. Cuantificación
6. Análisis de expresión diferencial

Ensambladores

Table 3. RNA-Seq de novo assembly software.

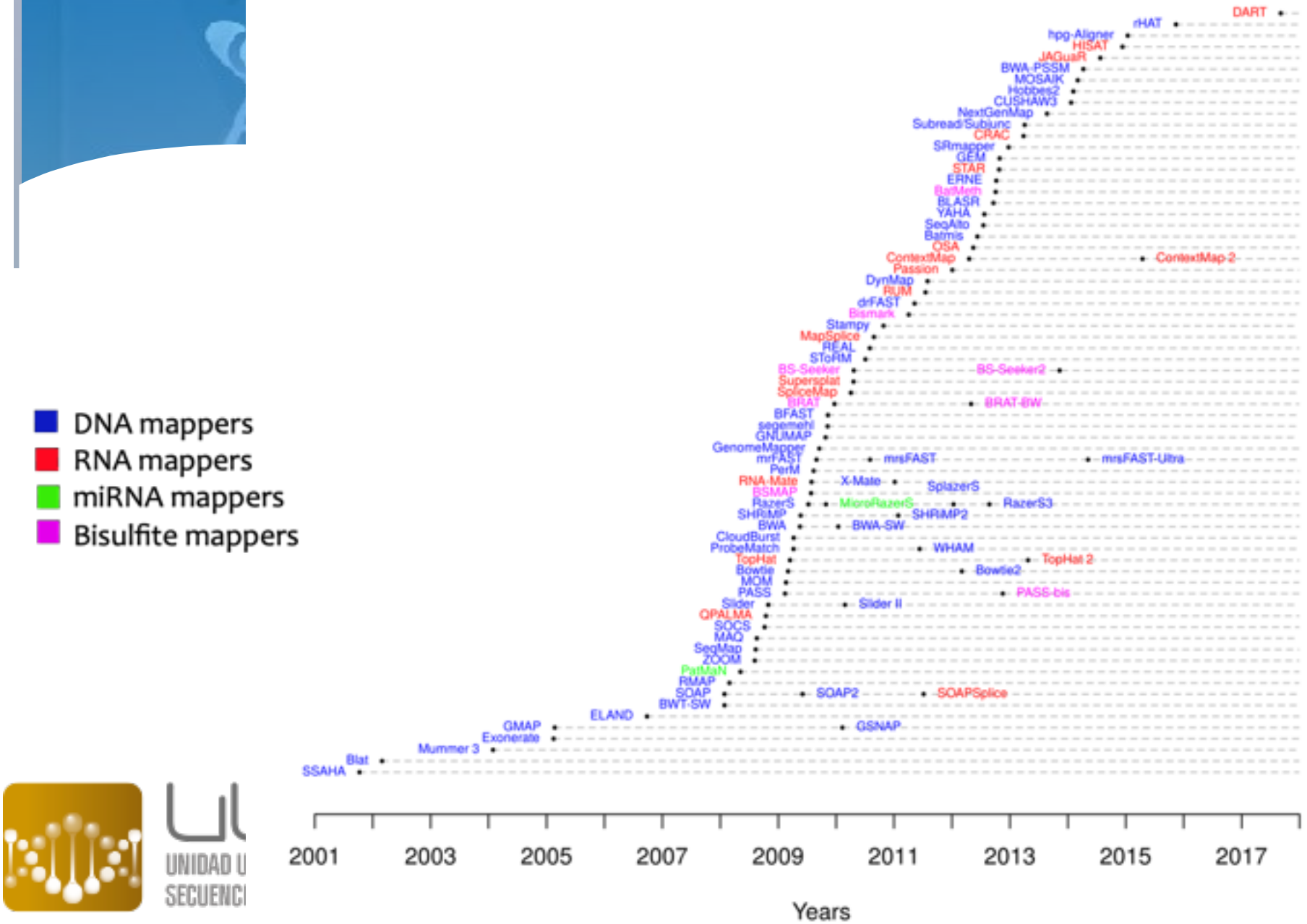
Software (Manufacturer)	Released	Last Updated	Resource load	Strengths and weaknesses
Velvet-Oases [100][101]	2008	2011	Heavy	The original short read assembler, now largely superseded.
SOAPdenovo-trans [102]	2011	2015	Moderate	Early short read assembler, updated for transcript assembly.
Trans-ABySS [103]	2010	2016	Moderate	Short reads, large genomes, MPI-parallel version available.
Trinity [104][105]	2011	2017	Moderate	Short reads, large genomes, memory intensive.
miraEST [106]	1999	2016	Moderate	Repetitive sequences, hybrid data input, wide range of sequence platforms accepted.
Newbler [107]	2004	2012	Heavy	Specialised for Roche 454 sequence, homo-polymer error handling.
CLC genomics workbench (Qiagen—Venlo, Netherlands) [108]	2008	2014	Light	Graphical user interface, hybrid data.

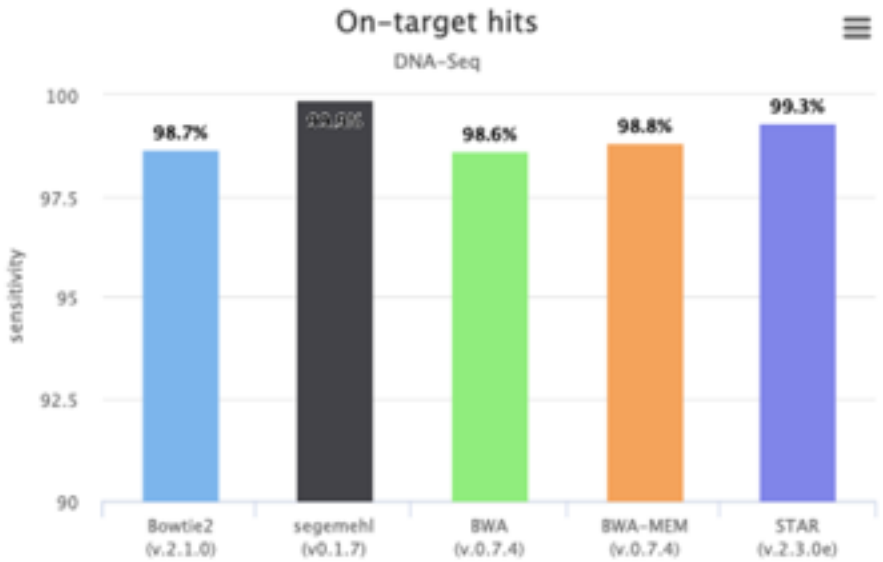
MPI, Message Passing Interface; RNA-Seq, RNA sequencing.

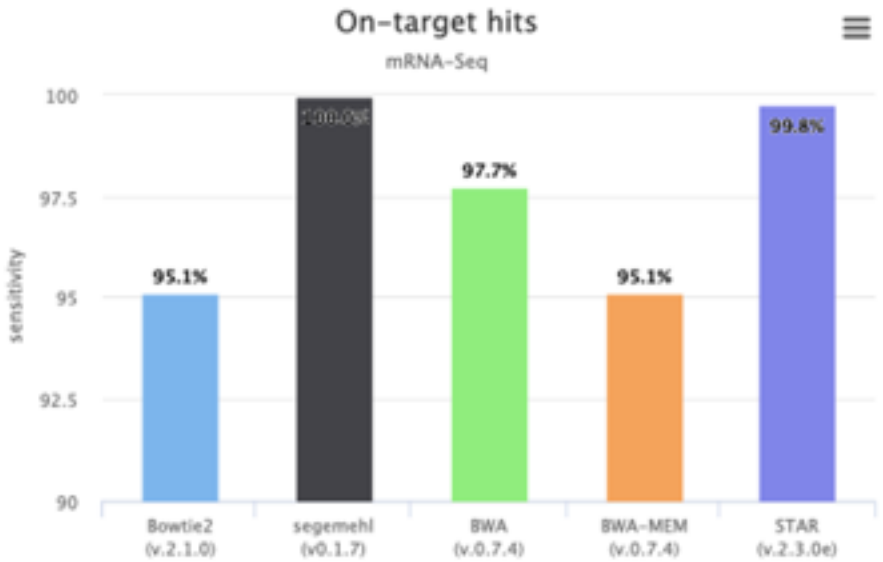
Fuente: https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457.t003

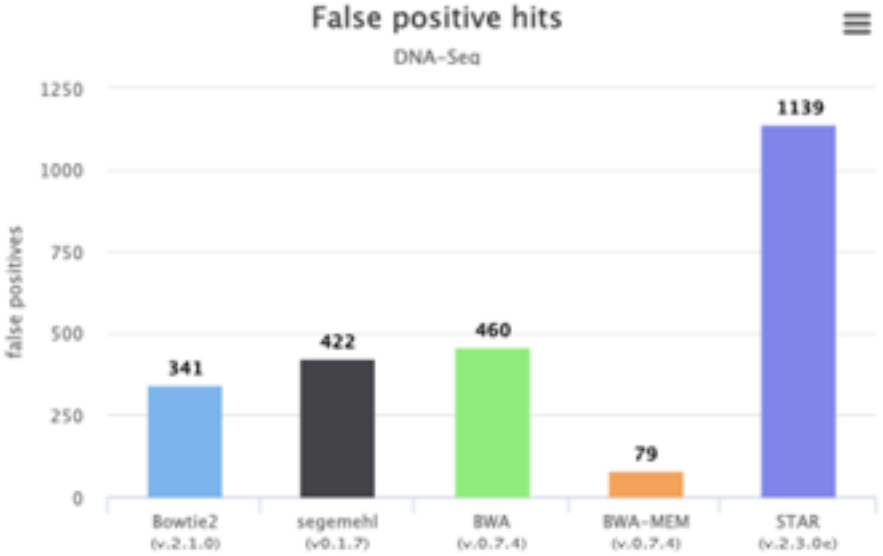
RNA-seq análisis

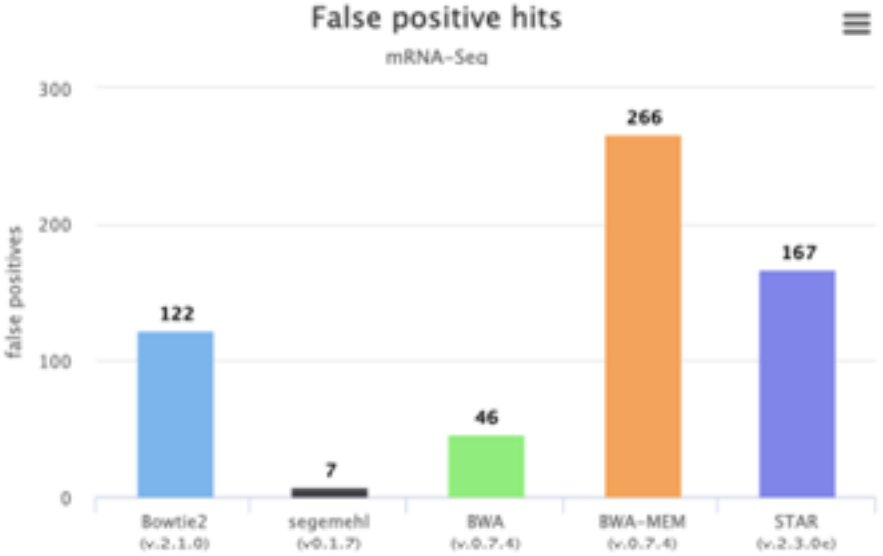
1. Extración y secuenciación de RNAseq
2. Quality Control
3. Ensamblado de Novo (cuando no ha sido reportado el transcrito)
4. Alineamiento
5. Cuantificación
6. Análisis de expresión diferencial


DNA mappers
RNA mappers
miRNA mappers
Bisulfite mappers
DART
rHAT
hpg-Aligner
HISAT
JAGuaR
BWA-PSSM
MOSAIK
Hobbes2
CUSHAW3
NextGenMap
Subread/Subjunc
CRAC
SRmapper
GEM
STAR
ERNE
BatMeth
BLASR
YAHA
SeqAlto
Batmis
OSA
ContextMap
ContextMap 2
Passion
DynMap
RUM
drFAST
Bismark
Stampy
MapSplice
REAL
STorRM
BS-Seeker
BS-Seeker2
Supersplat
SpliceMap
BRAT
BRAT-BW
BFAST
segemehl
GNUMAP
GenomeMapper
mrFAST
mrsFAST
mrsFAST-Ultra
PerM
RNA-Mate
X-Mate
SplazerS
BSMAP
RazerS
MicroRazerS
RazerS3
SHRiMP
SHRiMP2
BWA
BWA-SW
CloudBurst
ProbeMatch
WHAM
TopHat
TopHat 2
Bowtie
Bowtie2
MOM
PASS
PASS-bis
Slider
Slider II
QPALMA
SOCS
MAQ
SegMap
ZOOM
PatMaN
RMAP
SOAP
SOAP2
SOAPSplice
BWT-SW
ELAND
GSNAP
GMAP
Exonerate
Mummer 3
Blat
SSAHA
2001
2003
2005
2007
2009
2011
2013
2015
2017
Years





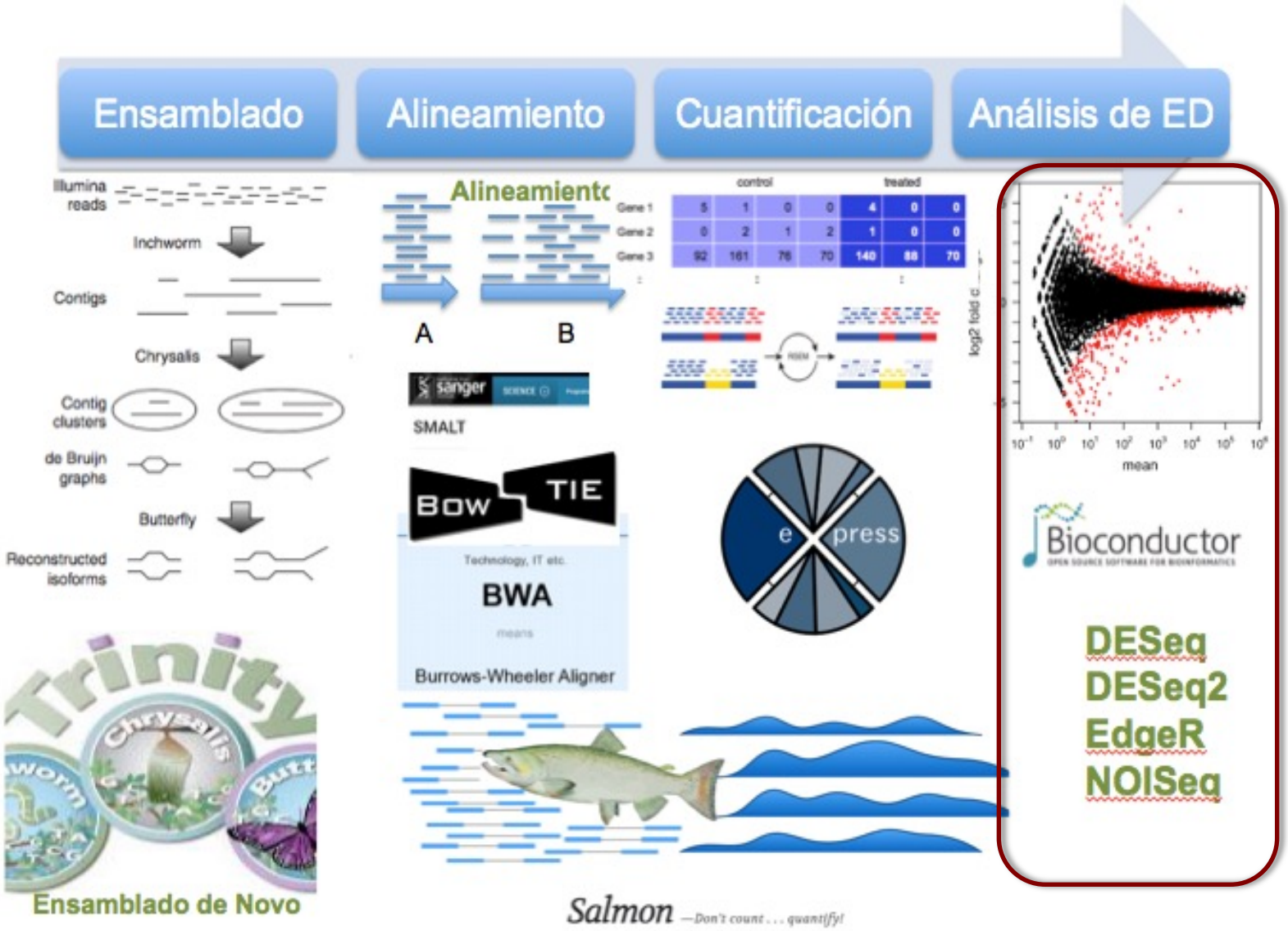




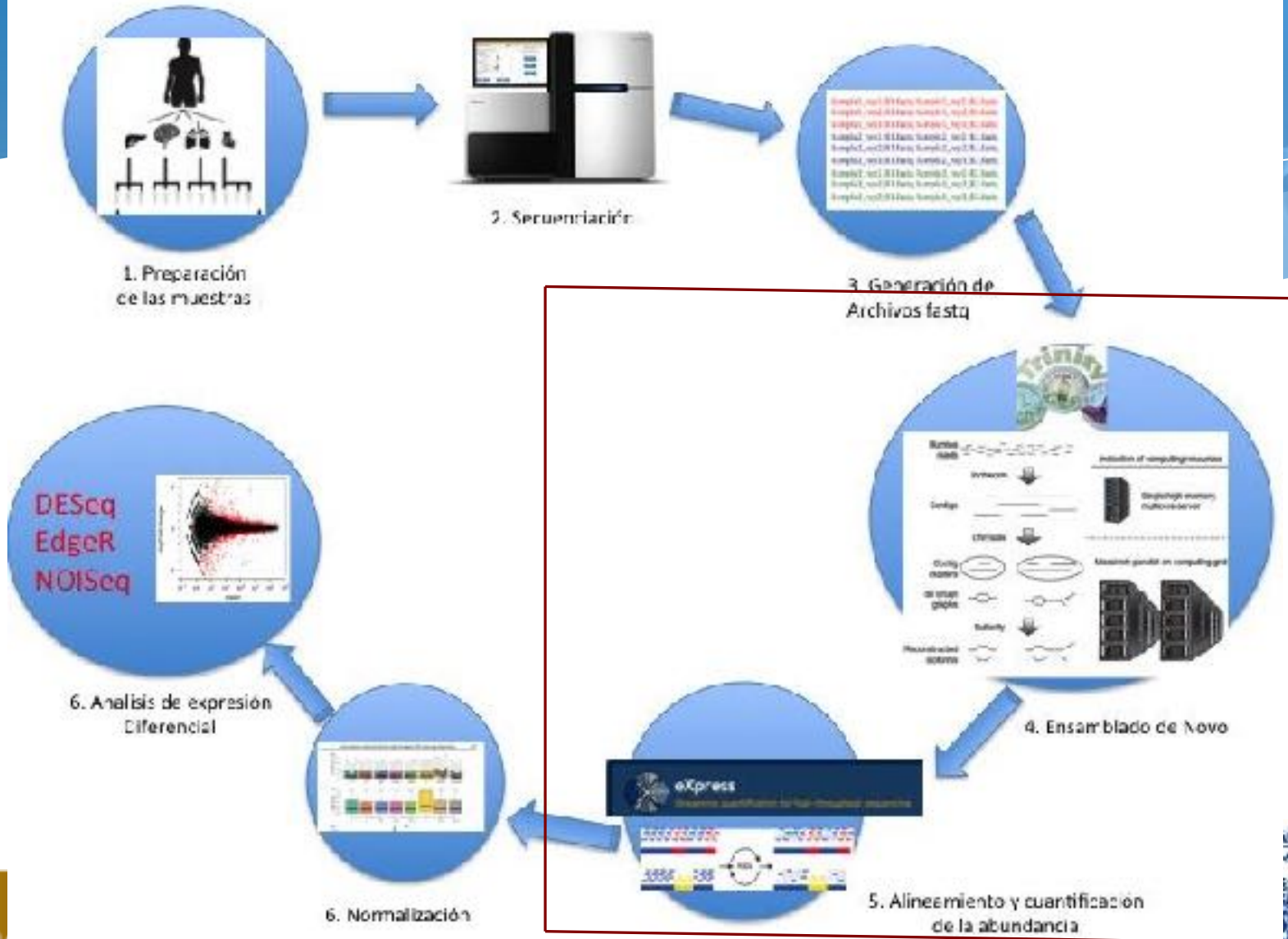
Source https://www.ecseq.com/support/benchmark

RNA-seq análisis

1. Extración y secuenciación de RNAseq
2. Quality Control
3. Ensamblado de Novo (cuando no ha sido reportado el transcrito)
4. Alineamiento
5. Cuantificación
6. Análisis de expresión diferencial

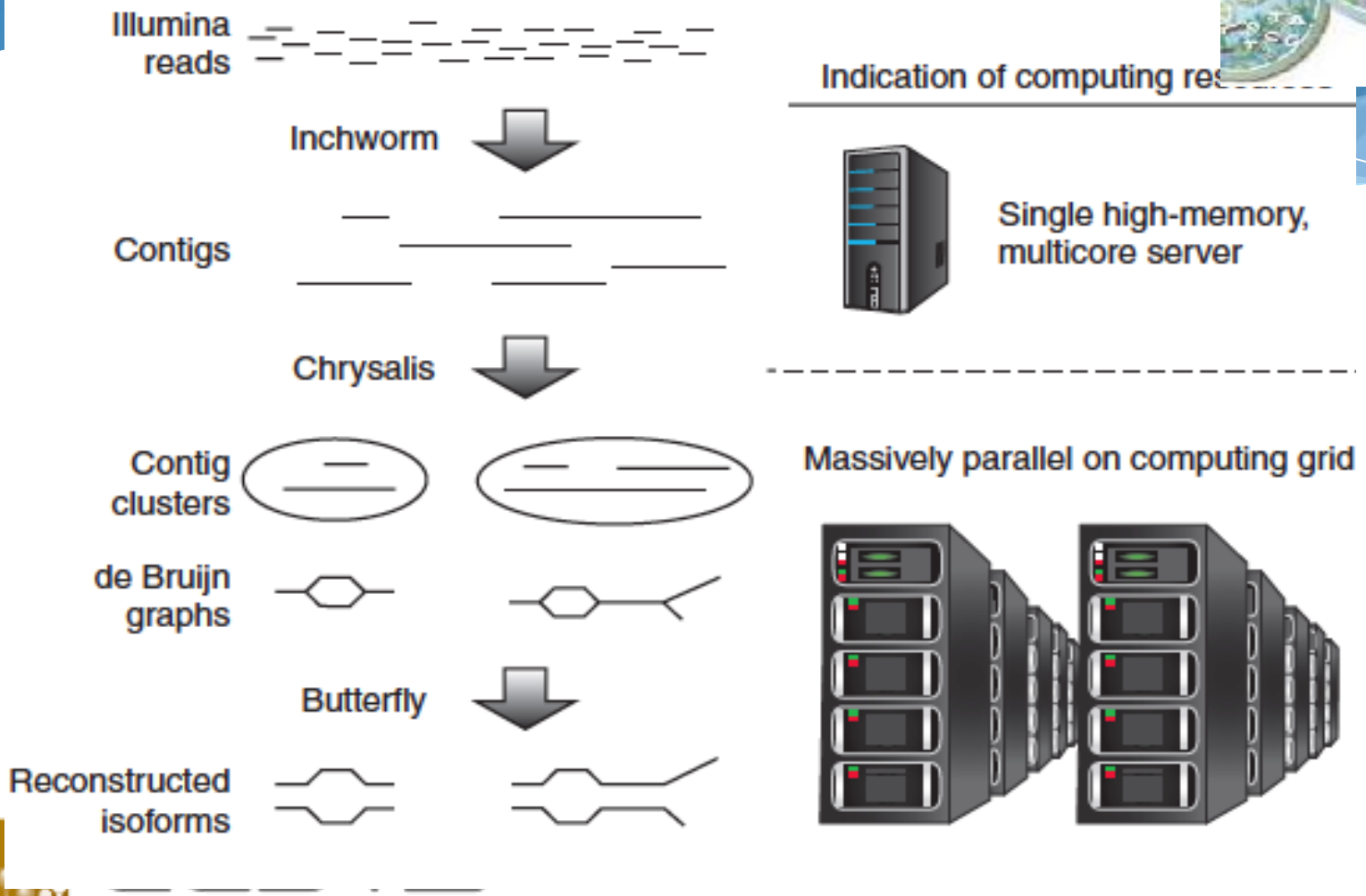

Ensamblado
Alineamiento
Cuantificación
Análisis de ED
Illumina reads
Inchworm
Contigs
Chrysalis
Contig clusters
de Bruijn graphs
Butterfly
Reconstructed isoforms
Alineamiento
A
B
SMALT
BOW TIE
Technology, IT etc.
BWA
means
Burrows-Wheeler Aligner
control
treated
Gene 1
Gene 2
Gene 3
log2 fold c
mean
e press
Bioconductor
DESeq
DESeq2
EdgeR
NOISeq
Trinity
Chrysalis
Ensamblado de Novo
Salmon —Don't count . . . quantify!

Nuestro flujo…



trinity

Trinity

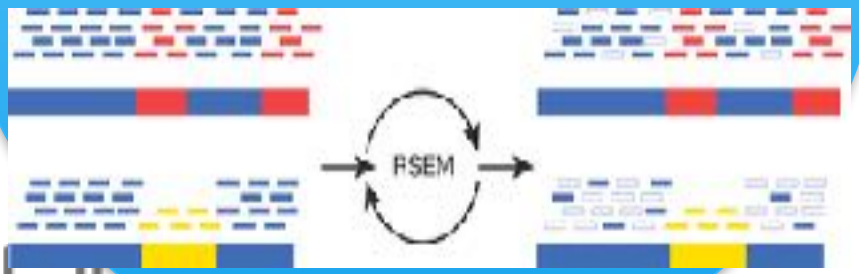


Fuente: Nat Protoc. 2013 Aug; 8(8). 10.1038/nprot.2013.084.

Software para Cuantificación

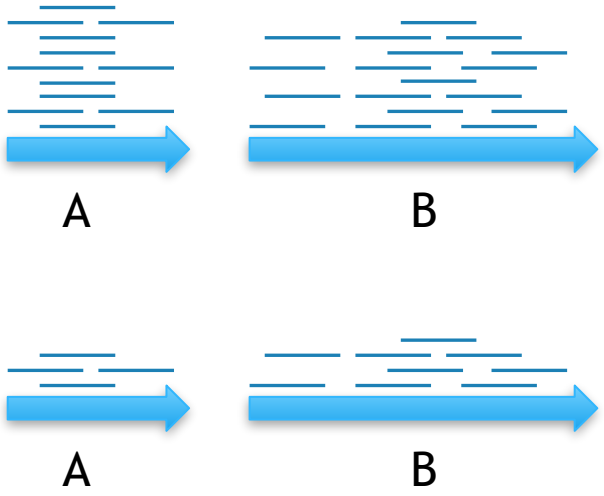
eXpress

Streaming quantification for high-throughput sequencing



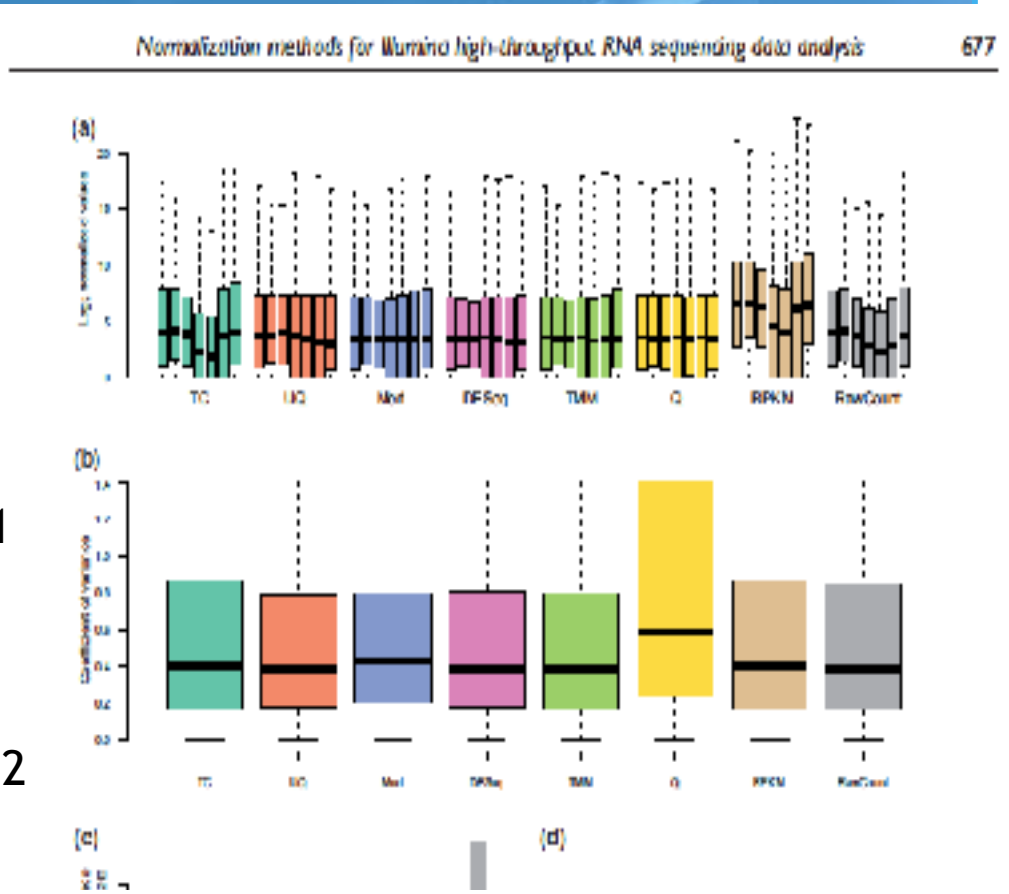
UNIDAD UNIVERSITARIA
SECUENCIACIÓN MASIVA Y BIOINFORMÁTICA

Normalización



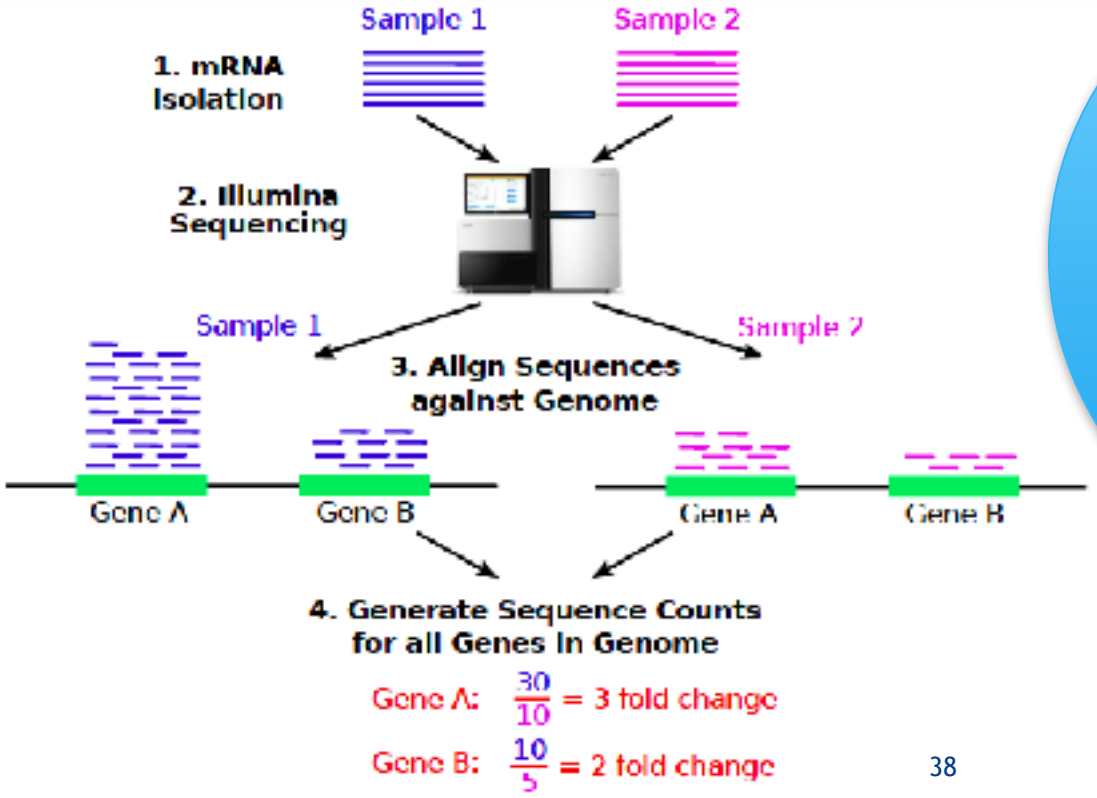
Replica 1

Replica 2

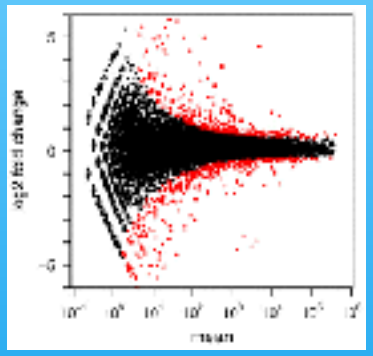


Fuente:
A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing

Paso 6. Análisis de Expresión Diferencial



DESeq
EdgeR
NOISeq
BySeq
...



6. Analisis de expresión Diferencial

4. Línea de comando típica de trinity

```
Trinity
#########################################################################
#
#  ______  ____   ____  ____   ____  ______  __ __
#  |      ||    \ |    ||    \ |    ||      ||  |  |
#  |      ||  D  ) |  | |  _  | |  | |      ||  |  |
#  |_|  |_||    /  |  | |  |  | |  | |_|  |_||  ~  |
#    |  |  |    \  |  | |  |  | |  |   |  |  |___, |
#    |  |  |  .  \ |  | |  |  | |  |   |  |  |     |
#    |__|  |__|\_||____||__|__||____|  |__|  |____/
#
#########################################################################
# Required:
#  --seqType <string>      :type of reads: ( fa, or fq )
#  --max_memory <string>   :suggested max memory to use by Trinity where limiting
can be
#       enabled. (jellyfish, sorting, etc) provied in Gb of RAM, ie.  '--max_memory
10G'
#
#  If paired reads:
#    --left  <string>  :left reads, one or more file names (separated by commas,no
spaces)
#    --right <string>  :right reads, one or more file names (separated by commas,no
spaces)
#
#  Or, if unpaired reads:
#      --single <string>   :single reads, one or more file names, comma-delimited
###################################
```

Línea de comando típica de trinity

Un típico comando de Trinity para ensamblar datos de RNAseq estrand no especifico, puede lucir como el siguiente:

```
$ Trinity --seqType fq --max_memory 50G \
--left reads_1.fq.gz --right reads_2.fq.gz \
--CPU 6
```

```
$ Trinity --help
```

Línea de comando típica de trinity

Cuando se realiza un análisis de expresión diferencial es muy común tener más de un archivo. Uno por tejido o por tratamiento y con varias réplicas, en ese caso, es posible invocar a Trinity con más de un archivo fastq de entrada:

```
$ Trinity --seqType fq --max_memory 50G \
--left condA_1.fq.gz,condB_1.fq.gz,condC_1.fq.gz
--right \
condA_2.fq.gz,condB_2.fq.gz,condC_2.fq.gz \
 --CPU 6
```

Nuevamente, la extensión gz, indica que los archivos están comprimidos.

Línea de comando típica de trinity

Trinity acepta un archivo describiendo las caracteristicas de las muestras a analizar (opción " **`--samples_file file`** ")

```
$ cat sample
condA    condA    condA_1.fq.gz    condA_2.fq.gz
condB    condB    condB_1.fq.gz    condB_2.fq.gz
condC    condC    condC_1.fq.gz    condC_2.fq.gz
```

Nuevamente, la extensión gz, indica que los archivos están comprimidos.

UNIDAD UNIVERSITARIA DE SECUENCIACIÓN MASIVA Y BIOINFORMÁTICA

Preparando los datos

1. Genere una carpeta llamada PracticaTrinity

```
$ mkdir PracticaTrinity
```

2. Entre en la carpeta:

```
$ cd PracticaTrinity
```

3. Genere las ligas a los archivos fastq de la carpeta /tmp/Data

```
$ ln -s /tmp/Data/*.*
```

4. Verifique que se generaron bien las ligas

```
$ ls -ltr
```

Línea de ejecución típica

Realizamos el ensamblado con todos las replicas disponibles (6 en total, 12 archivos fastq), en segundo plano. Usamos 2G de memoria y un solo cpu:

```
$ Trinity --seqType fq --max_memory 2G --CPU 1 \
--left \
Fructanos_1_R1.fastq,Fructanos_2_R1.fastq,Fructanos_3_R1.fastq,
Glicerol_1_R1.fastq,Glicerol_2_R1.fastq,Glicerol_3_R1.fastq \
–right \
Fructanos_1_R2.fastq,Fructanos_2_R2.fastq,Fructanos_3_R2.fastq,
Glicerol_1_R2.fastq,Glicerol_2_R2.fastq,Glicerol_3_R2.fastq \
--output trinity_output 2>&1 > run_all.log &
```

Linea de ejecución tipica

Otra opción, es usar el archivo descriptor: Archivo_de_Muestras.txt

```
$ Trinity --seqType fq --max_memory 2G --CPU 1 \
 --samples_file Archivo_Muestras.txt \
 --output trinity_output2 > run_all2.log 2>&1 &
```

Práctica 1

Consideré muestras en 2 condiciones (Fructuano y Glicerol), con 3 replicas cada una, en archivos en formato fastq, pareados, que se encuentran en el subdirectorio:

/tmp/Data/ para llevar a cabo el ensamblado de novo, usando trinity,

1. Conectarse al servidor bioinformatica.insp.mx -p 265
2. Si aun no lo ha hecho, haga la preparación de los datos con lo indicado en la diapositiva 44
3. Calcule cuantas Secuencias participaran en el ensamblado, para determinar la cantidad de GB
4. Nos preparemos para llevar a cabo el ensamblado de Novo usando trinity . Ejecute cualquiera de las versiones mostradas en la diapositiva 44 o 45

5. Monitoreando el Progreso de Trinity

Monitoreo de la ejecución de Trinity

Trinity puede fácilmente tomar varios días por lo que es muy útil tener la capacidad de monitorear el proceso y el estado (Inchworm, Chrysalis, Butterfly) . Hay algunas maneras generales de hacerlo:

1. Revisar como proceso de Trinity y verificar cuanta memoria esa consumiento:

```
top
```

```
PID USER      PR  NI    VIRT    RES    SHR S  %CPU %MEM     TIME+   COMMAND
32853 vjimenez  20   0 1286212  20520   3228 S 179.0  0.0   1:14.71 bowtie-
align-s
32854 vjimenez  20   0  125540  35904   2404 S  56.3  0.0   0:25.80 samtools
32855 vjimenez  20   0  746340 729944   2208 S   4.6  0.6   0:02.40 samtools
    8 root      20   0       0      0      0 S   0.3  0.0   8:27.28
rcu_sched
   68 root      20   0       0      0      0 S   0.3  0.0   2:21.11 rcuos/8
35229 vjimenez  20   0 5373648 339968  14852 S 119.0  0.3   0:11.30 java
35387 vjimenez  20   0 5373648  38648  14560 S  18.2  0.0   0:00.55 java
```

Monitoreando la ejecución de Trinity

2. Enviando el proceso a segundo plano. Hay que asegurarse de capturar la salida estándar ‘stdout’ y los errores ‘stderr’ mientras se corre el proceso de Trinity. Usando bash, esto se hace de la siguiente manera:

```
Trinity ... opts ... 2>&1 > run.log &

tail –f run_all2.log
```

background

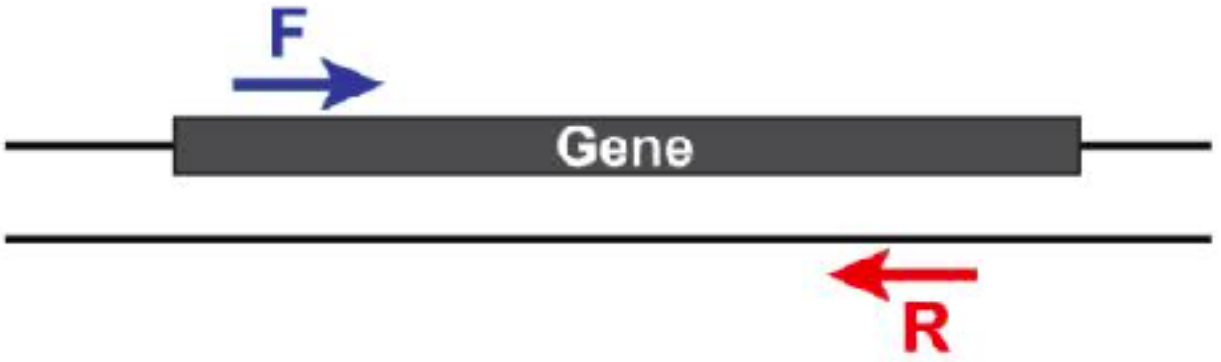
archivo de salida

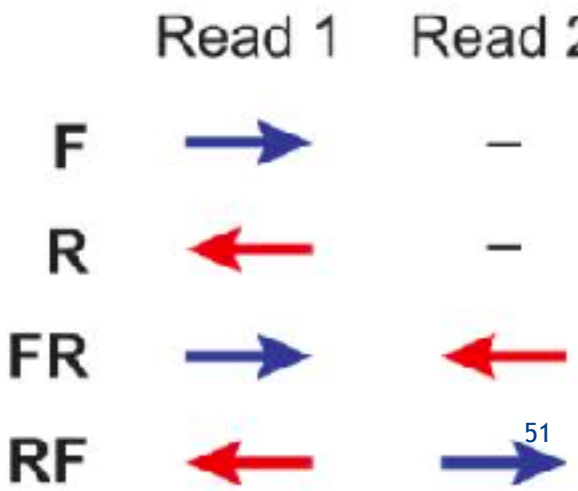
Estándar output

UNIDAD UNIVERSITARIA DE SECUENCIACIÓN MASIVA Y BIOINFORMÁTICA

Tipo de libreria

1. Con el parámetro –SS_lib_type podemos especificar el tipo de librería con el que se prepararon las muestras





7. Revisando la salida del ensamblado

1. Es posible que al termino de la ejecución de un proceso de trinity, se vean asi: succeeded(88) 100% completed.

```
All commands completed successfully. :-)



** Harvesting all assembled transcripts into a single multi-fasta file...

Wednesday, December 8, 2021: 04:38:34   CMD: find /home/vjimenez/Prueba/PracticaTrinity/trinity_out_dir/
read_partitions/ -name '*inity.fasta'  | /home/bioinformatica/trinityrnaseq-v2.9.0/util/support_scripts/
partitioned_trinity_aggregator.pl --token_prefix TRINITY_DN --output_prefix /home/vjimenez/Prueba/
PracticaTrinity/trinity_out_dir/Trinity.tmp
-relocating Trinity.tmp.fasta to /home/vjimenez/Prueba/PracticaTrinity/trinity_out_dir/Trinity.fasta
Wednesday, December 8, 2021: 04:38:34   CMD: mv Trinity.tmp.fasta /home/vjimenez/Prueba/PracticaTrinity/
trinity_out_dir/Trinity.fasta


########################################################################
Trinity assemblies are written to /home/vjimenez/Prueba/PracticaTrinity/trinity_out_dir/Trinity.fasta
########################################################################


Wednesday, December 8, 2021: 04:38:34   CMD: /home/bioinformatica/trinityrnaseq-v2.9.0/util/support_scripts/
get_Trinity_gene_to_trans_map.pl /home/vjimenez/Prueba/PracticaTrinity/trinity_out_dir/Trinity.fasta > /home/
vjimenez/Prueba/PracticaTrinity/trinity_out_dir/Trinity.fasta.gene_trans_map
```

Revisando la salida de trinity

Cuando Trinity termina de ejecutarse, se crea un archivo Trinity.fasta como archivo de salida en el subdirectorio de salida Trinity_out_dir/ (o en el directorio de salida que se haya especificado con el opción --output)

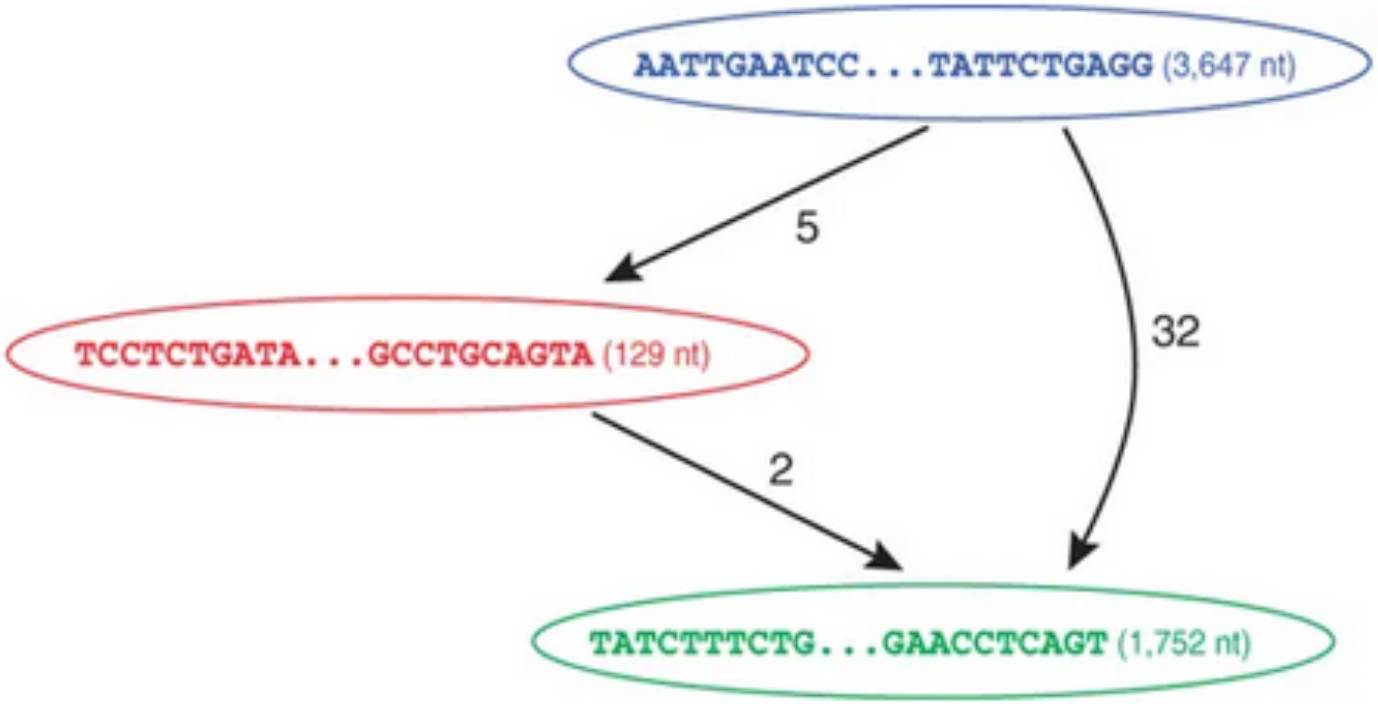
Numero de Acceso Gen Isoformas

```
>TRINITY_DN53_c0_g1_i1 len=352 path=[0:0-351]
GGGTATTTATAAATGTACATATGATATAAATTCGAACTATAGCGTTTCAAGCATTACC
TTAATTCGTGCTTAGATTTTATCATACCAGTATCCTCTGAGGGAACGACAATCCATTG
CTAAATAGTTCAGCATGTCCATCAGGTACTAGTAGATTGATAATATCGTTGAAGTAAA
ATCCAATGATGATAACCAAGTAGGCCAGAATCAAAATCGAACCCTTGAAGTAGTTACT
TCTTCCCTCCGAATGGACGTGACAATAGAGCAGCATGCTCACAATCCACGCCCAAGTA
TCACACTTCGGGAATAAGAGAACAAATACGTAGTCTCTGAGGTTCTCTCCCAAGTGCT
CGGT
```

Revisando la salida de Trinity
2 isoformas

```
>TRINITY_DN32_c0_g1_i2 len=1108 path=[0:0-69 2:70-1107]
AGATCTATCACTAATCCGATGCAAATCTTTTGTTCTCACTGCTGTGAGATTTCTAATGAATTAAT
ACTTACTTTCTCTGGGAAGATGCAAAGTCGTTGGCAGTCTGAATATTACCCTTAAGGCCATCAAC
TGCCACCTTAACGAGCTCAGACTCAGCGGGAGAAATCTTAGGGAGAATATTCGTGACCTTTTCGG
CACCATTAGGTCCAAAGGTAATGGGTAAGGCGAAGTAATCGATACCAAGCTCCTTGCGAACCTCT
TCACCTCCAGGAAGACCCTCTAGG
../..
>TRINITY_DN32_c0_g1_i1 len=1102 path=[1:0-63 2:64-1101]
ATCATATCAAGAAAAGCGGGTTGACAATAATAGGGTATCATCAATGCTCACTTATCATTTACCGC
TTTCTCTGGGAAGATGCAAAGTCGTTGGCAGTCTGAATATTACCCTTAAGGCCATCAACTGCCAC
CTTAACGAGCTCAGACTCAGCGGGAGAAATCTTAGGGAGAATATTCGTGACCTTTTCGGCACCAT
TAGGTCCAAAGGTAATGGGTAAGGCGAAGTAATCGATACCAAGCTCCTTGCGAACCTCTTCACCT
CCAGGAAGACCCTCTAGGTGAACA
../..
```

Isoformas



Fuente: Nat Protoc. 2013 Aug; 8(8): 10.1038/nprot.2013.084.
Published online 2013 Jul 11. doi: [10.1038/nprot.2013.084](https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084)

Revisando la salida de trinity

Una vez que el ensamblado esta completo, se puede conocer que tan “bueno” es, y seguramente comparar la calidad del ensamblado con ensamblados similares de distintos ensambladores ó distintas corridas con distintos parámetros.

Caracterizando la calidad de un ensamblado

1. Examinar la representación del ensamblado de las lecturas de RNASeq. Idealmente, al menos el 80% de los datos de entrada estarán representados en el transcriptoma ensamblado. El resto de las lecturas no ensambladas corresponden a transcriptomas con baja expresión, con cobertura insuficiente para ser ensamblados o de muy baja calidad o lecturas aberrantes.

2. Examinar la representación de los genes reconstruidos de longitud completa codificantes para proteínas, buscando los transcritos ensamblados a través de bases de datos de secuencias de proteínas conocidas

Caracterizando la calidad de un ensamblado

3. Calcular el E90N50 de los contigs. El valor del contig N50 esta basado sobre el conjunto de los transcritos que representan 90% de total de la expresión.

Calcular el N50 de los contigs

1. Sobre la base de las longitudes de los contigs ensamblados del transcriptoma, podemos calcular la longitud estadística Nx convencional, tal que al menos x% de los nucleótidos de transcripción reunidos se encuentran en contigs que son al menos de la longitud Nx. El método tradicional está calculando N50, de tal manera que al menos la mitad de todas las bases montadas están en contigs de transcripción de al menos el valor de longitud N50.

UUSMB
UNIDAD UNIVERSITARIA DE SECUENCIACIÓN MASIVA Y BIOINFORMÁTICA

Calculando N50:

```
$ $TRINITY_HOME/util/TrinityStats.pl  trinity_output/
Trinity.fasta
################################
## Counts of transcripts, etc.
################################
Total trinity 'genes':    109
Total trinity transcripts:    113
Percent GC: 45.43

########################################
Stats based on ALL transcript contigs:
########################################

    Contig N10: 3366
    Contig N20: 2133
    Contig N30: 1888
    Contig N40: 1748
    Contig N50: 1434

    Median contig length: 753
    Average contig: 1006.62
```

Calculando N50:

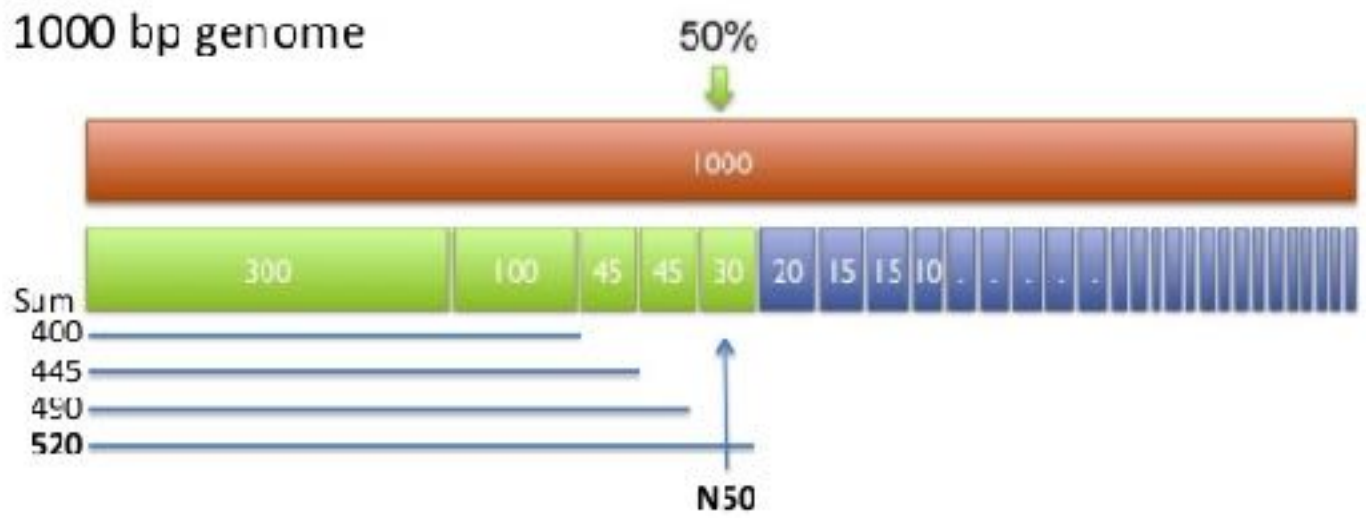
```
#######################################################
## Stats based on ONLY LONGEST ISOFORM per 'GENE':
#######################################################

    Contig N10: 3366
    Contig N20: 2238
    Contig N30: 1888
    Contig N40: 1748
    Contig N50: 1456

    Median contig length: 753
    Average contig: 1006.35
    Total assembled bases: 109692
```

N50

50% of the genome is in contigs as large as the N50 value

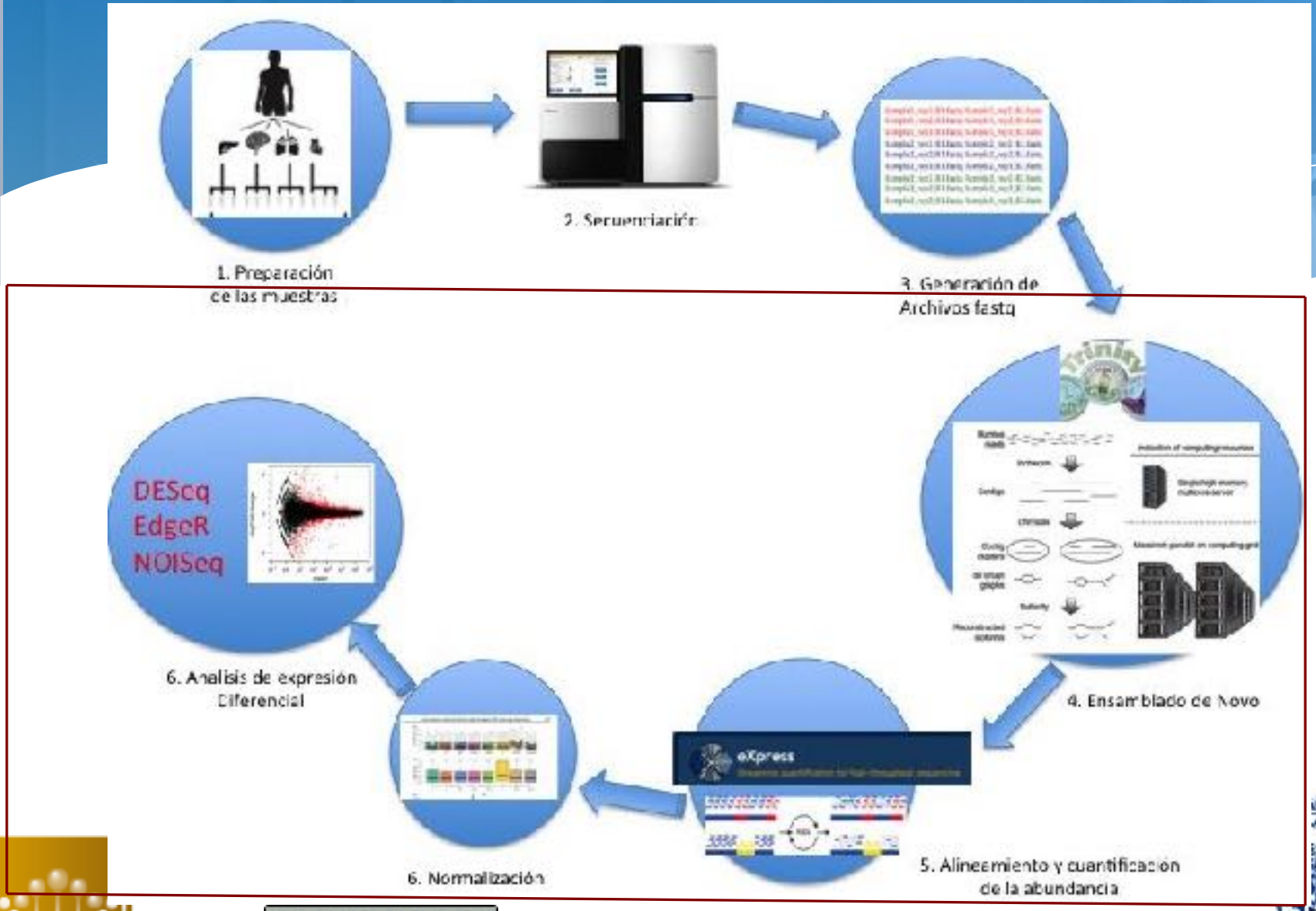


Courtesy of Michael Schatz, CSHL

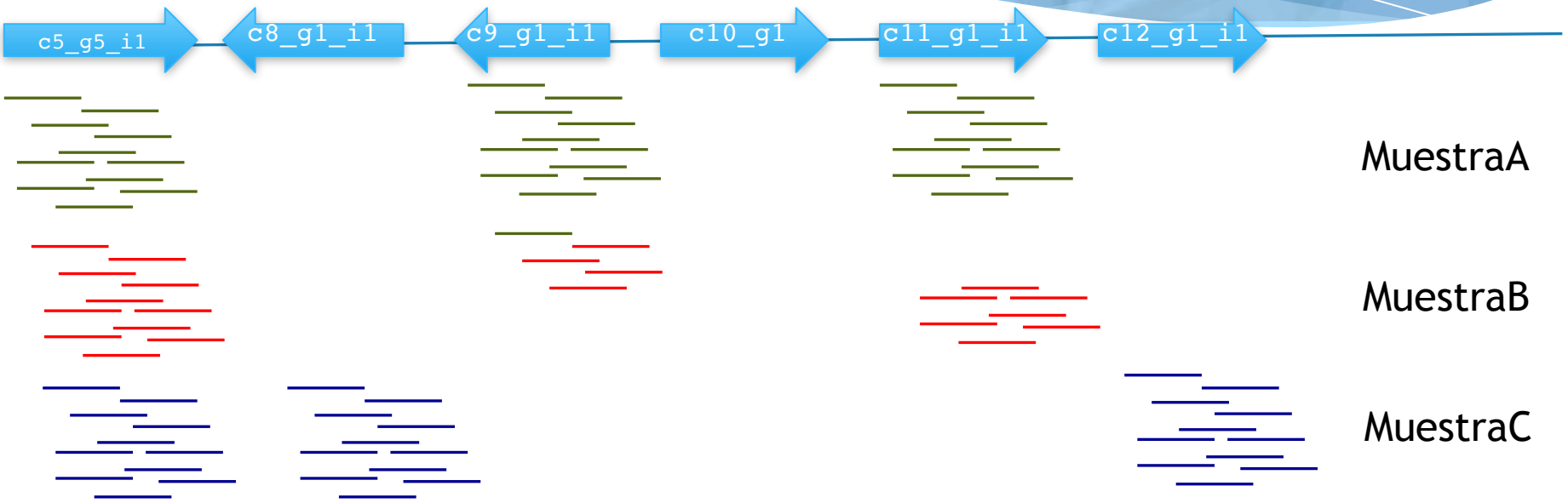
Analizar los transcritos

1. ¿Cómo podríamos ver si algunos de los transcritos obtenidos son partes de proteinas referenciadas?
2. ¿Que necesitarían con datos?

8. Cuantificación de los transcritos

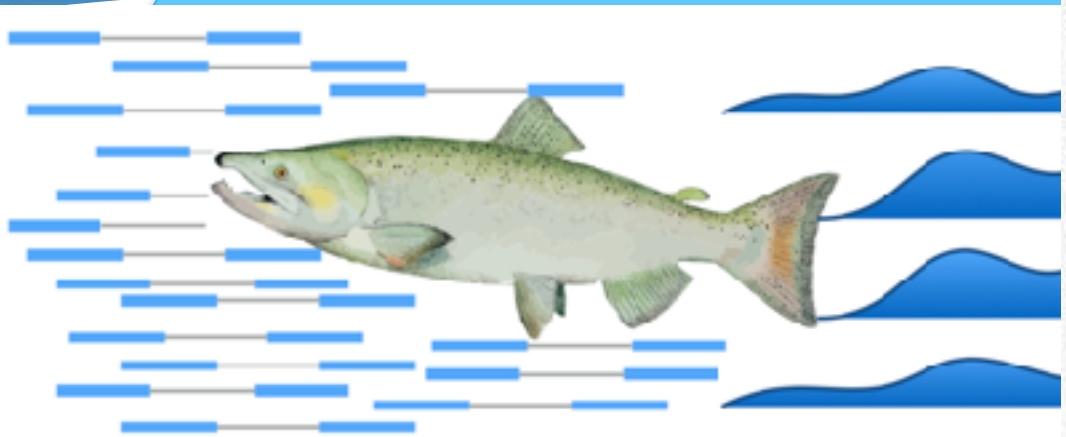

1. Preparación de las muestras
2. Secuenciación
3. Generación de Archivos fastq
4. Ensamblado de Novo
5. Alineamiento y cuantificación de la abundancia
6. Normalización
6. Analisis de expresión Diferencial
DESeq
EdgeR
NOISeq
trinity

Cuantificación por transcrito



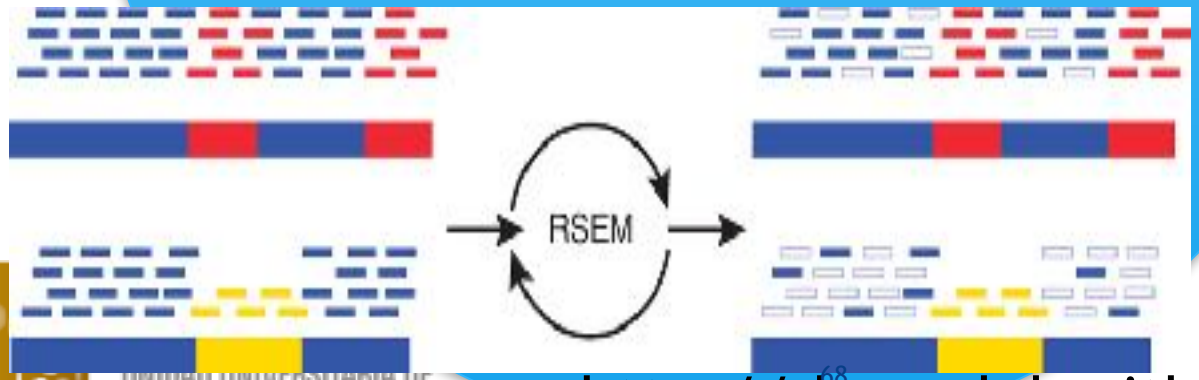
UNIDAD UNIVERSITARIA DE SECUENCIACIÓN MASIVA Y BIOINFORMÁTICA

métodos basados en la cuantificación del alineamiento



https://pachterlab.github.io/kallisto

Salmon —Don't count . . . quantify!



http://deweylab.github.io/RSEM/

Trinity soporta RSEM, eXpress y kallisto y salmon.

```
$ $TRINITY_HOME/util/align_and_estimate_abundance.pl

#########################################################################
#
#########################
#  Essential parameters:
#########################
#
#  --transcripts <string>           transcript fasta file
#  --seqType <string>               fq|fa
#  If Paired-end:
#     --left <string>
#     --right <string>
…
#   or (preferred):
#      --samples_file <string>    tab-delimited text file indicating biological replicate
relationships.
#                                  ex.
#                          cond_A    cond_A_rep1    A_rep1_left.fq    A_rep1_right.fq
#                          cond_A    cond_A_rep2    A_rep2_left.fq    A_rep2_right.fq
#                          cond_B    cond_B_rep1    B_rep1_left.fq    B_rep1_right.fq
#                          cond_B    cond_B_rep2    B_rep2_left.fq    B_rep2_right.fq
#
#  --est_method <string>           abundance estimation method.
#                                        alignment_based:  RSEM
#                                        alignment_free: kallisto|salmon
```

Trinity soporta RSEM, eXpress y kallisto. y salmon

```
#  --est_method <string>           abundance estimation method.
#                                        alignment_based:  RSEM|eXpress
#                                        alignment_free: kallisto|salmon
#
# --output_dir <string>            write all files to output directory
#
#
#  if alignment_based est_method:
#       --aln_method <string>          bowtie|bowtie2|(path to bam file)
#                                     (note: RSEM requires bowtie)
#                                      (if you already have a bam file,
#                      you can use it here instead of rerunning bowtie)
```

Preparamos el genoma de referencia

1. Preparamos el genoma de referencia para los alineamientos y estimación de la abundancia:

```
$TRINITY_HOME/util/align_and_estimate_abundance.pl \
--transcripts trinity_output/Trinity.fasta \
--est_method RSEM --aln_method bowtie2 \
--trinity_mode --prep_reference
```

Ejecución de la alineación y contabilización

2. Luego corremos el alineamiento y la estimación de la abundancia para cada uno de los tratamientos, para cuantificar la replica:

```
$TRINITY_HOME/util/
align_and_estimate_abundance.pl \
--transcripts trinity_sample/Trinity.fasta \
 --seqType fq \
--left Fructanos_1_R1.fastq \
--right Fructanos_1_R2.fastq  --est_method RSEM \
--aln_method bowtie --trinity_mode  \
--output_dir Fruct_rep1
```

Ejecución de la estimación de abundancias

Lo podemos hacer también con todas las muestras de una vez
En este caso, creara un directorio por replica.

```
$ $TRINITY_HOME/util/
align_and_estimate_abundance.pl \
--transcripts trinity_sample/Trinity.fasta \
 --seqType fq \
--sample_file Archivo_Muestras.txt\
--est_method RSEM \
--aln_method bowtie2 --trinity_mode  \
--output_dir rsem_sample
```

1. Además, de el número de lecturas mapeadas al transcrito, se calcula una medida normalizada considerando la longitud del transcrito y otra normalización considerando el tamaño de la librería.
2. Las métricas de expresión normalizadas son reportadas como *"fragments per kilobase transcript length per million fragments mapped"* (FPKM)
3. o *'transcripts per million transcripts'* (TPM).

Salida de RSEM

1. La aplicación de RSEM genera dos archivos de salidas principales conteniendo la información de la estimación de las abundancias:
2. `RSEM.isoforms.results:` conteo de lecturas por transcrito
3. `RSEM.genes.results:` conteo de lecturas por gene

Revisando la salida

3. Revisemos al final el archivo de conteos de genes o isoformas:

```
 $ head Fructanos_rep1/RSEM.*results
==> Fructanos_rep1/RSEM.genes.results <==
gene_id transcript_id(s)    length  effective_lengthexpected_countTPMFPKM
TRINITY_DN0_c0_g1   TRINITY_DN0_c0_g1_i1,TRINITY_DN0_c0_g1_i2520.00368.64394.003862.955457.39
TRINITY_DN10_c0_g1  TRINITY_DN10_c0_g1_i1   2235.002083.64674.001169.141651.71
TRINITY_DN11_c0_g1  TRINITY_DN11_c0_g1_i1   2368.002216.64218.00355.46502.18

==> Fructanos_rep1/RSEM.isoforms.results <==
transcript_id   gene_id length  effective_lengthexpected_countTPMFPKMIsoPct
TRINITY_DN0_c0_g1_i1    TRINITY_DN0_c0_g1   520 368.64394.003862.955457.39100.00
TRINITY_DN0_c0_g1_i2    TRINITY_DN0_c0_g1   496 344.640.000.000.000.00
TRINITY_DN10_c0_g1_i1   TRINITY_DN10_c0_g1 22352083.64674.001169.141651.71100.00
```

Construyendo las matrices de Abundancias

1. Usando las estimaciones de abundancias para cada una de las muestras se construye una matriz de conteos y una matriz de valores de expresión normalizados, usando el siguiente script:

```
$ $TRINITY_HOME/util/abundance_estimates_to_matrix.pl

#########################################################################
#
# Usage:
#  $TRINITY_HOME/util/abundance_estimates_to_matrix.pl \
#    --est_method <method>  sample1.results sample2.results ...
# Required:
#
#  --est_method <string>       RSEM|eXpress|kallisto
#                                                  (needs to know what format to
expect)
#
# Options:
#
#  --cross_sample_norm <string>        TMM|UpperQuartile|none
#                                                          (default: TMM)
#
#  --name_sample_by_basedir          name sample column by
#                                   dirname instead of filename
#
#  --basedir_index <int>          default(-2)
#
#  --out_prefix <string>              default: 'matrix'
```

Construcción de la matriz de abundacias

```
$ $TRINITY_HOME/util/abundance_estimates_to_matrix.pl  \
     --est_method RSEM --name_sample_by_basedir\
      --gene_trans_map trinity_output/Trinity.fasta.gene_trans_map \
      Fructanos_rep1/RSEM.isoforms.results  \
Fructanos_rep3/RSEM.isoforms.results   \
Glicerol_rep2/RSEM.isoforms.results \
Fructanos_rep2/RSEM.isoforms.results \
Glicerol_rep1/RSEM.isoforms.results \
Glicerol_rep3/RSEM.isoforms.results
```

Práctica 2.

1. Genere la matriz de abundancias a partir de los archivos de conteos de los 3 Fructanos y los 3 gliceroles. Recuerde que fueron generados con el metodo RSEM.

Práctica 3. Solución

1. Genere la matriz de abundancias a partir de los archivos de conteos de los 3 Fructanos y los 3 gliceroles. Recuerde que fueron generados con el metodo RSEM.

```
${TRINITY_HOME}/util/abundance_estimates_to_matrix.pl  \
    --est_method RSEM --name_sample_by_basedir\
     --gene_trans_map trinity_output/Trinity.fasta.gene_trans_map \
     Fructanos_rep1/RSEM.isoforms.results  \
Fructanos_rep3/RSEM.isoforms.results   \
Glicerol_rep2/RSEM.isoforms.results \
Fructanos_rep2/RSEM.isoforms.results \
Glicerol_rep1/RSEM.isoforms.results \
Glicerol_rep3/RSEM.isoforms.results
```

Práctica 4.

1. Utilizamos el método **kallisto** para realizar el mismo estudio de abundancia y obtener la matriz final
2. Para la matriz final, se utilizan los archivos “**abundance.tsv**”
3. ¿Notan una diferencia en velocidad, resultados?
4. Podrian realizar ahora el estudio de E90N50

Estadístico ExN50

1. Una alternativa al estadístico Contig Nx que podría ser considerado más apropiado para los datos de ensamblaje de transcriptoma es el estadístico ExN50. Aquí, N50 se calcula igual que el anterior pero se limita a los mejores transcripciones más altamente expresados que representan x% del total de los datos de expresión normalizados. Esto requiere que se haya realizado la estimación de la abundancia de transcripción primero:

```
$ $TRINITY_HOME/util/misc/contig_ExN50_statistic.pl \
RSEM.isoform.TMM.EXPR.matrix trinity_output/Trinity.fasta |
tee ExN50.stats
```

Referencias

1. Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T (2017) Transcriptomics technologies. PLoS Comput Bio 13(5): e1005457. https://doi. org/10.1371/journal.pcbi.1005457
2. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. [Internet]. Babraham Institute [cited 2017 Apr 27]. http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/.
3. Lo CC & Chain PS. Rapid evaluation and quality control of next generation sequencing data with FaQCs. BMC Bioinformatics. 2014 15:366. https://doi.org/10.1186/s12859-014-0366-2 PMID: 25408143
4.

Dra Ernestina Godoy
Dr. Jesus Ulises Garza Ramos
INSP
Gracias!!

veronica.jimenez@ibt.unam.mx

UUSMB
UNIDAD UNIVERSITARIA DE SECUENCIACIÓN MASIVA Y BIOINFORMÁTICA