Corso di Laurea in Biologia Molecolare, Università di Padova
Insegnamento di Informatica e Bioinformatica

Esercitazione 2

Padova, 13 aprile 2016

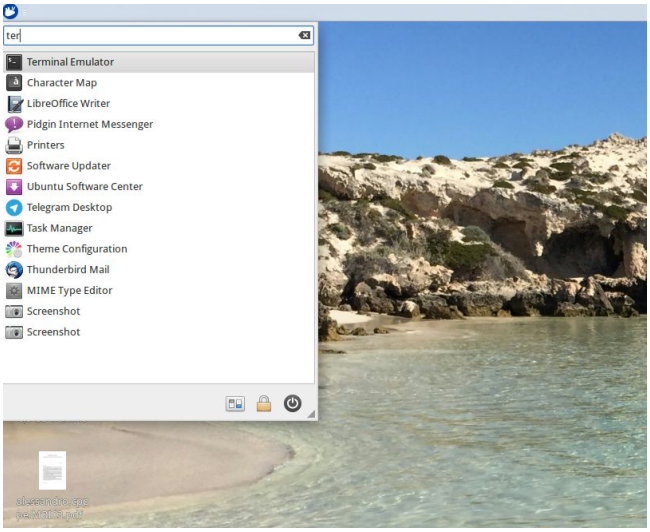
GUIDA

Uso della shell Unix

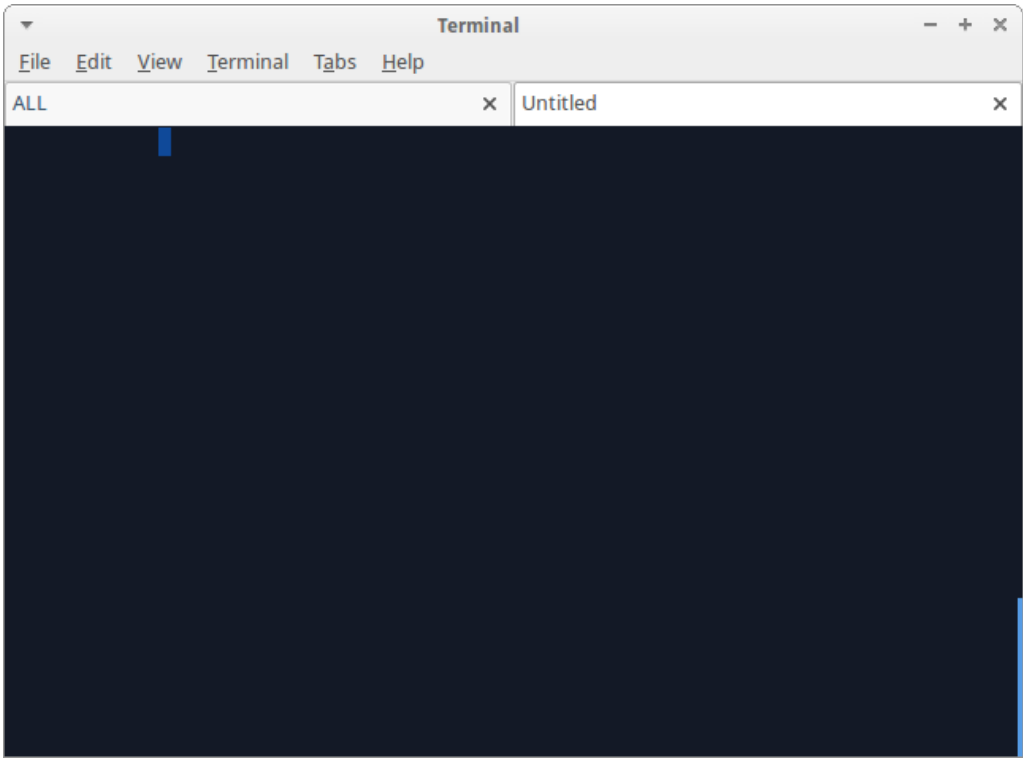
Obbiettivo dell'esercitazione

L'obbiettivo dell'esercitazione è di familiarizzare con alcuni comandi della shell Unix e di applicarli per analizzare file di sequenze biologiche nei formati più usati (FASTA, vcf). I file per l'esercitazione possono essere scaricati dal seguente indirizzo web: http://compgen.bio.unipd.it/downloads/bioinfo2be2.tgz
Estrarre dell'archivio la cartella contenente i file dell'esercitazione

Aprire un terminale



Aprire un terminale partendo dal menù delle applicazioni che si tova in alto a sinistra.

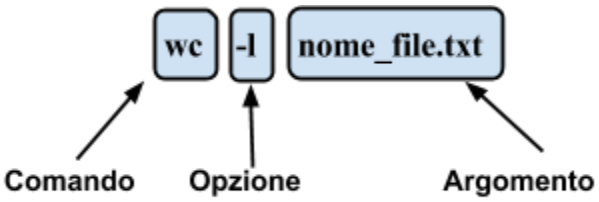


Lanciare il primo comando

```
ls
```

Il comando ls lista il contenuto di una directory/cartella

Anatomia di un comando Unix



Spostarsi nella cartella dove sono stati decompressi i file dell'esercitazione

Listare il contenuto della directory usando l'opzione -l sul comando ls:

```
ls -l
```

Il comando cd (change directory) serve per spostarsi tra le cartelle:

```
cd esercitazione_bioinfo_2
```

Il comando pwd (print working directory) mostra la directory in cui ci troviamo. I comandi che lanciamo agiscono sulla directory in cui ci troviamo:

```
pwd
```

```
/home/ale/Esercitazione/esercitazione_bioinfo_2
```

Il comando pwd restituisce il path o percorso dove ci troviamo. Il simbolo / (slash) permette di separare le cartelle tra loro.

Per spostarsi automaticamente nella proprio home directory usare il comando cd senza argomenti:

```
cd
```

Spostarsi nella cartella Downloads (Scaricati se il sistema è in italiano)

```
cd Downloads
```

```
Tornare nella cartella contenente i dati dell'esercitazione, usare il tasto tab per autocompletare il nome delle cartelle:
```

```
cd /home/ale/Esercitazione/esercitazione_bioinfo_2
```

Creare un unico file FASTA a partire da 10 sequenze singole

```
ls -l
```

Verranno visualizzati i nomi dei file presenti nella directory, tra cui 10 sequenze in formato FASTA di trascritti riconducibili a geni coinvolti nel cancro al seno. Ogni sequenza è in un file separato.

Visualizzare il contenuto di uno dei file con il comando cat:

```
cat seq01.fasta
```

Il comando cat "scorre" l'intero file. Per poterlo visualizzare una riga per volta usare il comando less:

```
less seq01.fasta
```

Usare le freccie verso l'alto e verso il basso per scorrere il contenuto del file. Per uscire dal comando less usare il tasto q. Un file fasta contiene un'intestazione che inizia con il carattere > e poi la sequenza vera e propria.

Concateniamo tutte le sequenze FASTA in un unico file. NB: ogni sequenza ha una propria intestazione, quindi concatenandole in un unico file saranno comunque riconoscibili.

```
cat seq*.fasta > all.fasta
```

* è un carattere speciale (*wild card*) che corrisponde ad uno o più caratteri. Il simbolo > redireziona l'output di un comando (cat in questo caso) in un file.

Ispezionare il file appena creato con:

```
less all.fasta
```

Verificare che il numero di sequenze nel file creato sia corretto:

```
grep ">" all.fasta
```

e contare quante righe vengono date in output, oppure per farlo in maniera automatica usare l'opzione -c del comando grep:

```
grep -c ">" all.fasta
```

Se vogliamo ottenere informazioni sul comando grep:

```
man grep
grep -h
```

Le Pipe

Spesso può essere utile inviare l'output di un comando non a video ma ad un altro comando prima di essere visualizzato. Usando l'operatore pipe '|' comunichiamo alla shell di collegare l'output del primo comando all'input del secondo comando.

Ad esempio per ottenere il numero **approssimativo** di nucleotidi totali presenti nelle nostre 10 sequenze:

```
grep -v ">" all.fasta  | wc -c
```

L'opzione -v indica a grep di invertire il match, cioè di non mostrarci le righe che hanno il match; è importante mettere le virgolette intorno al maggiore è un carattere che ha un significato preciso nella shell (redirezionamento dell'output di un comando).
Da notare che il numero ottenuto di caratteri che otteniamo non è preciso dato che vengono conteggiati anche i new line, cioè un carattere "invisibile" che indica al computer di andare a capo.

Analisi di un file VCF (Variant Call Format)

Per una descrizione dettagliata del formato vcf consultare il seguente documento in formato pdf:
http://samtools.github.io/hts-specs/VCFv4.2.pdf

```
##fileformat=VCFv4.2
##fileDate=20090805
##source=myImputationProgramV3.1
##reference=file:///seq/references/1000GenomesPilot-NCBI36.fasta
##contig=<ID=20,length=62435964,assembly=B36,md5=f126cdf8a6e0c7f379d618ff66beb2da,species="Homo sapiens",taxonomy=x>
##phasing=partial
##INFO=<ID=NS,Number=1,Type=Integer,Description="Number of Samples With Data">
##INFO=<ID=DP,Number=1,Type=Integer,Description="Total Depth">
##INFO=<ID=AF,Number=A,Type=Float,Description="Allele Frequency">
##INFO=<ID=AA,Number=1,Type=String,Description="Ancestral Allele">
##INFO=<ID=DB,Number=0,Type=Flag,Description="dbSNP membership, build 129">
##INFO=<ID=H2,Number=0,Type=Flag,Description="HapMap2 membership">
##FILTER=<ID=q10,Description="Quality below 10">
##FILTER=<ID=s50,Description="Less than 50% of samples have data">
##FORMAT=<ID=GT,Number=1,Type=String,Description="Genotype">
##FORMAT=<ID=GQ,Number=1,Type=Integer,Description="Genotype Quality">
##FORMAT=<ID=DP,Number=1,Type=Integer,Description="Read Depth">
##FORMAT=<ID=HQ,Number=2,Type=Integer,Description="Haplotype Quality">
#CHROM POS     ID        REF    ALT     QUAL FILTER INFO                              FORMAT      NA00001        NA00002        NA00003
20     14370   rs6054257 G      A       29   PASS   NS=3;DP=14;AF=0.5;DB;H2           GT:GQ:DP:HQ 0|0:48:1:51,51 1|0:48:8:51,51 1/1:43:5:.,.
20     17330   .         T      A       3    q10    NS=3;DP=11;AF=0.017               GT:GQ:DP:HQ 0|0:49:3:58,50 0|1:3:5:65,3   0/0:41:3
20     1110696 rs6040355 A      G,T     67   PASS   NS=2;DP=10;AF=0.333,0.667;AA=T;DB GT:GQ:DP:HQ 1|2:21:6:23,27 2|1:2:0:18,2   2/2:35:4
20     1230237 .         T      .       47   PASS   NS=3;DP=13;AA=T                   GT:GQ:DP:HQ 0|0:54:7:56,60 0|0:48:4:51,51 0/0:61:2
20     1234567 microsat1 GTC    G,GTCT  50   PASS   NS=3;DP=9;AA=G                    GT:GQ:DP    0/1:35:4       0/2:17:2       1/1:40:3
```

Noi ci concentreremo dulle “data lines” e non sulle righe dell’intestazione (header file).
Dare un’occhiata al file con il comando less:

```
less sample.vcf
```

Contiamo il numero di righe nel file:

```
wc -l sample.vcf
```

Questo comando ci mostra il numero totale di righe nel file compresa l’intestazione. A noi interessa sapere quante varianti sono presenti nel file. Quindi procederemo con il creare un file vcf senza l’intestazione:

```
grep -v “^#” sample.vcf   > sample_no_header.vcf
```

Il primo argomento di grep in questo caso è una regular expression, ossia un modo per indicare famiglie di stringe (parole). In questo caso la nostra regular expression specifica tutte le parole che sono all’inizio della riga (^) e che iniziano con #. Questa è una caratteristica unica delle righe presenti nell’intestazione del file vcf. Ricordatevi che l’opzione -v indica a grep di invertire il match, quindi di non mostrarci le righe che “matchano” la regular expression.

Contiamo ora quante varianti ci sono all’interno del nostro file:

```
wc -l sample_no_header.vcf
```

Il comando cut

Vogliamo ora vedere quante varianti sono state identificate nel cromosoma 1. Ci serve il comando cut che come citato nella sua man page: “cut out selected portions of each line of a file”. Quindi ci permette di selezionare soltanto alcune porzioni da ogni riga del file. In particolare le “porzioni” devono essere delimitate da un qualche carattere detto “delimiter” che nel nostro caso è il TAB.
Facciamo in modo di farci stampare la il primo campo (il numero del cromosoma):

```
cut -f 1 sample_no_header.vcf
```

Ora selezioniamo solo le righe che contengano il cromosoma 1:

```
cut -f 1 sample_no_header.vcf | grep 1
```

E infine contiamo quante sono:

```
cut -f 1 sample_no_header.vcf | grep 1 | wc -l
```

E per finire proviamo a fare la stessa cosa partendo dal file vcf contentente anche l’intestazione, senza creare un file intermedio.

```
grep -v "#"  sample.vcf | cut -f 1 | grep 1 | wc -l
```