

Guia de Introdução

Conteúdo

Prefácio	3
Como utilizar este guia	3
Como obter mais informação	3
Convenções usadas neste documento	4
Introdução	4
Sobre o Software	4
Sobre os métodos	4
Sobre o experimento exemplo	4
Utilização da ferramenta	5
Gerando e/ou Importando experimento	5
Caminho destino da análise	7
Selecionando método de análise	7
Exportando os dados	7

Prefácio

Como utilizar este guia

Este guia tem como propósito explicar como analisar os experimentos de RT-qPCR utilizando a ferramenta RTA easy. A introdução funciona como uma:

- Apresentação sobre o software, sobre os métodos utilizados para o processamento do experimento, contém informações sobre o experimento exemplo usado para o tutorial além de introduzir o andamento do tutorial.

Nos demais capítulos deste guia, você poderá observar os passos que seguem a utilização do software, logo estes capítulos seguintes funcionam como um:

- Tutorial, usando exemplos de dados experimentais fornecidos com o PCR em tempo real.

- Guia para suas próprias experiências.

Destinado a utilização por equipes de laboratório, investigadores e pesquisadores que utilizam a PCR em tempo real para análise de expressão gênica seja o motivo qual for.

Este guia assume que você:

- Está familiarizado com o sistema operacional no qual a ferramenta será executada.

- Está familiarizado com a utilização de planilha eletrônica.

- Saiba como manusear amostras de DNA e/ou RNA e prepará-las para a PCR, bem como o manuseio dos seus dados.

- Entenda o armazenamento de dados, a transferência de arquivos e a cópia e colagem.

Como obter mais informação

Para mais informação sobre o software leia o nosso artigo ()

Para mais informação sobre os métodos adotados no RTA easy leia os artigos:

Livak, K.J. Schmittgen, Thomas. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCt method.. Methods. 25. 402–408. Para ter acesso ao artigo clique **aqui**.

Pfaffl, M.W.. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res.. 2. Para ter acesso ao artigo clique **aqui**.

Para dúvidas que não foram explanadas neste guia, entre em contato conosco. Nossos contatos estão contidos no site do software. Para acessar o nosso site clique **aqui**.

Temos também a disposição dos usuários as nossas redes sociais, você será capaz de nos encontrar como @rtaeasy no Instagram, para acessar diretamente clique **aqui**.

Convenções usadas neste documento

Para ações esperadas pelos usuários utilizaremos a font **bold**, e para qualquer observação a ser feita, o texto será decorrido com a font *itálica*. Além de que caso houver situações que necessitem da atenção do usuário utilizaremos imagens gráficas específicas para este propósito.

Introdução

Sobre o Software

O RTA easy é um software para cálculo de expressão gênica que proporciona a opção da utilização dos métodos mais conhecidos e utilizados pela comunidade científica.

No RTA easy você será capaz de analisar seu experimento com vários genes alvos e diversos genes de referência de uma só vez, dado que a inclusão de múltiplas amostras de referências resulta em produtos mais precisos.

No RTA você irá gerar o modelo de planilha para inserir os dados do experimento, e selecionará o modelo de sua preferência para o cálculo.

Com seus dados analisados você poderá escolher como exportar os resultados, seja ele em forma textual *.txt*, gráfico *.png* e documento *.pdf*.

Sobre os métodos

O RTA easy tem como objetivo o cálculo da expressão relativa do experimento em questão. Temos diversos métodos referente ao cálculo da expressão gênica que comparam a expressão de gene(s) alvo(s) com gene(s) de referência(s), sendo dois deles os mais utilizados, o modelo delta-delta CT proposto por Livak e Schmittgen (2001) citado por cerca de 93 mil artigos e o de eficiência calibrada proposto por Pfaffl(2001), citado por mais de 24 mil artigos.

No modelo delta-delta CT o paradigma calcula a expressão gênica deixando a critério de normalização do experimento para os genes de referência, com a característica de dobrar a quantidade de material genético a cada ciclo, o modelo entende que o total de material resultante do RT-qPCR é oque será considerado para o cálculo, já que a quantidade de materiais fluorescentes adicionais do experimento é quase nula.

Além de utilizar o método de eficiência calibrada (Pfaffl) para corrigir a pequena desvantagem que o uso dos corantes trazem para o experimento em tempo real, o pesquisador pode utilizar sequências de referência não relacionadas para normalizar o experimento, dado que a inclusão de múltiplas amostras de referências resulta em produtos mais precisos.

Sobre o experimento exemplo

Utilização da ferramenta

O RTA easy utiliza-se de algum software que manuseie planilha eletrônica, seja ele qual for, de agrado do usuário. A planilha eletrônica é importante pois a ferramenta gera o *template* do experimento alvo em forma de planilha, o usuário irá preencher a planilha gerada pelo RTA easy e importará a mesma para o software a fim de que seja feito o cálculo. Mais detalhes sobre o processo nos próximos capítulos.

Gerando e/ou Importando experimento

O primeiro passo para uma análise de sucesso é a criação do modelo do experimento adotado pelo software. Portanto, abra o software RTA easy e **clique** em *Generate a spreadsheet template*. Caso sua planilha experimento já exista no padrão criado pelo RTA easy, basta importar a planilha ao software. Para isso **clique** em *Load spreadsheet from file* e aponte a planilha para o RTA easy. Tudo isso pode ser observado na figura 1.

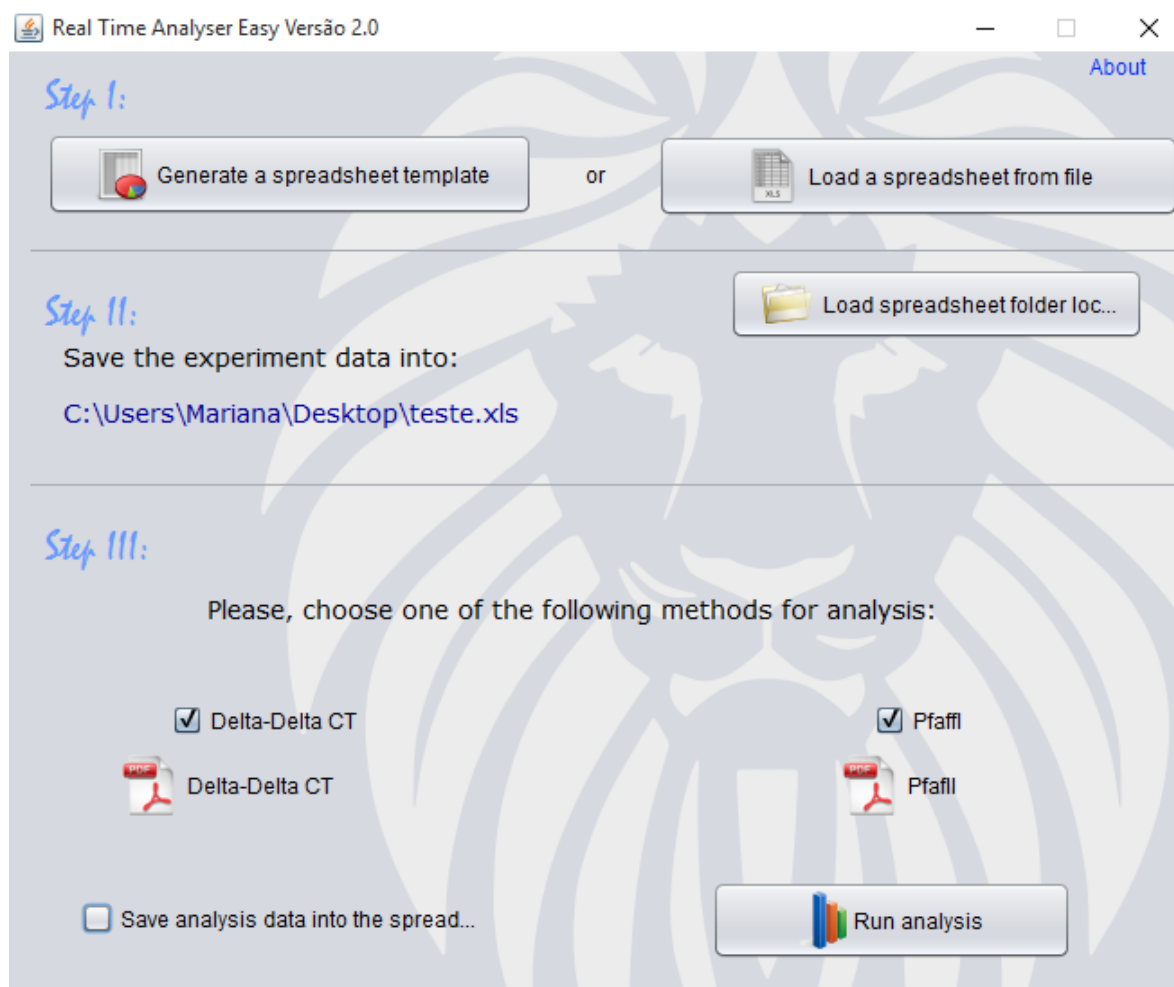


Figura 1: Tela Inicial do software

Vamos partir do pressuposto que não exista nenhuma planilha. Ao clicar em criar planilha, você encontrará a janela de entradas, onde você poderá inserir as quantidades relacionadas ao seu experimento. No experimento exemplo temos 2 (dois) genes alvos, 2 (dois) genes de referência, 3 (três) tratamentos, 1 (uma) triplicata biológica e 3 (três) triplicatas técnicas. Portanto, na janela de entradas o usuário que analisará este experimento colocará no software as quantidades como:

Figura 2: Tela de entradas

Depois disso, você será capaz de criar a planilha na forma certa e padronizada. Para isto, **clique** em *Generate Template*. No RTA você poderá observar o caminho da planilha importada no *Step II* (observe na figura 1), além de abrir a pasta do local da planilha, para isto, **clique** em *Load spreadsheet folder location*.

Após a criação da planilha modelo para o seu experimento, **abra** a planilha e insira os dados. Ao abrir, a planilha estará no padrão criado por você anteriormente, podemos observar a planilha do experimento exemplo na figura ??.

Para que a sua análise corra bem, **modifique** o(s) gene(s) alvo(s) e o(s) tratamento(s), e **adicione** os CTs do(s) gene(s) alvo(s) (coluna E da planilha) e **adicione** os CTs do(s) gene(s) de referência (coluna F...).

Após inserir os dados na planilha template, importe a planilha para o RTA easy. **Clique** em *Load spreadsheet folder location*. Logo após, procure no computador a planilha do experimento padronizada para o RTA easy, **selecione** a planilha e **clique** em *Open*. Uma vez com a planilha criada, este será o primeiro passo depois do software aberto.

Observação: Caso a planilha já esteja no padrão gerado pelo RTA easy, não é necessário criar uma planilha, basta importar para o software.

Caminho destino da análise

No segundo passo você poderá observar onde o resultado da análise será salvo, nele você conseguirá ver o endereço do caminho e poderá abrir a pasta. Para observar a pasta destino, **clique** em *Abrir diretório da planilha*.

Selecionando método de análise

No terceiro passo **selecione** o modelo que deseja adotar para a análise, Delta-Delta CT ou Pfaffl (Eficiência Calibrada), para isto **clique** na respectiva checkbox. Ao selecionar o modelo, **clique** em *Analisar*. Caso tenha escolhido o modelo Pfaffl, **informe** para o software qual a eficiência dos genes.

Exportando os dados