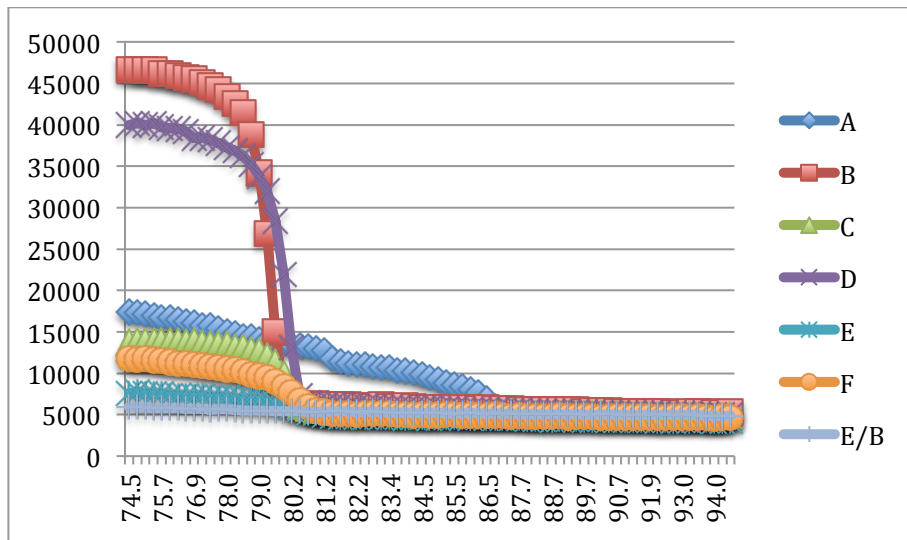
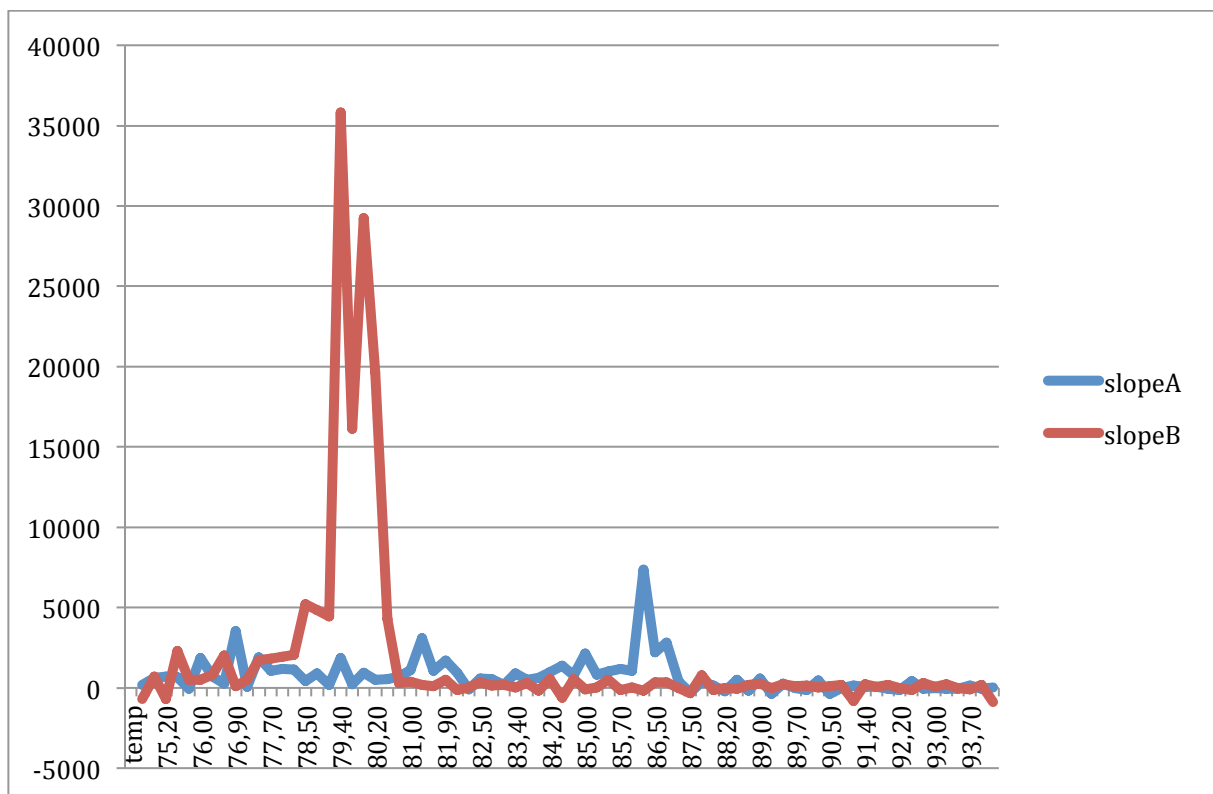


## Smeltcurves voor *C. psittaci* genotypen.

De smeltcurve is de intensiteit van de fluorescentie van het FAM signaal ten opzichte van de temperatuur. Bij oplopende temperatuur neemt de fluorescentie af als gevolg van het uiteen smelten van dubbelstrengs DNA. De dalende intensiteit van de fluorescentie ten opzichte van de stijgende temperatuur laat een sigmoidale curve zien.



Door de helling te berekenen tussen de meetpunten en deze uit te zetten tegen de temperatuur, en daar de inversie van te nemen, zou er een 'gaussian' curve zichtbaar moeten zijn. In praktijk is er geen duidelijke weergave van pieken die verwacht worden bij een smeltcurve.



Daarom probeer ik een andere optie. In plaats van het stap-voor-stap berekenen van de helling, wordt op de data een non-lineaire regressie analyse uitgevoerd. Een non-lineaire regressie model voor een sigmoidale curve wordt beschreven volgens de formule<sup>1</sup>:

$$m(x, \phi) = \frac{\phi_1}{1 + \exp[-(x - \phi_2)/\phi_3]}$$

met

$$\phi_1 = \theta_1 \quad \phi_2 = -\theta_2/\theta_3.$$

en

$$\phi_3 = 1/\theta_3$$

Phi 1, 2 en 3 zijn parameters die simpel berekend kunnen worden in R met de volgende script:

```
> # read data
> data <- read.csv("D.csv", header = TRUE)
>
> pop.ss <- nls(D ~ SSlogis(temp, phi1, phi2, phi3), data=data)
> summary(pop.ss)
```

Formula: D ~ SSlogis(temp, phi1, phi2, phi3)

Parameters:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
phi1	40123.8407	1428.1821	28.094	< 2e-16 ***
phi2	79.9752	0.1498	533.704	< 2e-16 ***
phi3	-0.7427	0.1240	-5.989	7.57e-08 ***

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 4530 on 72 degrees of freedom

Number of iterations to convergence: 0

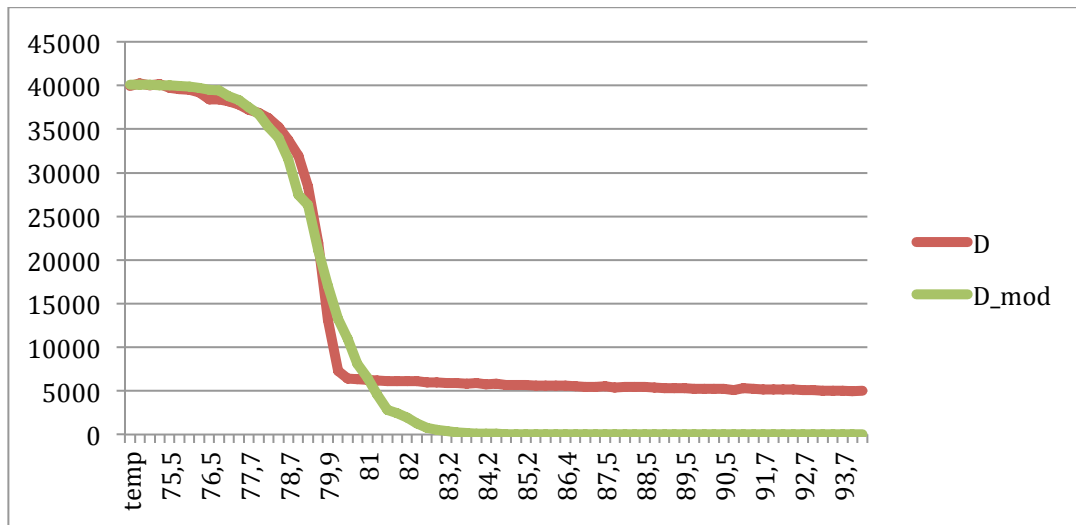
Achieved convergence tolerance: 4.903e-06

```
> coef(pop.ss)[[1]]
[1] 40123.84
> coef(pop.ss)[[2]]
[1] 79.97518
> coef(pop.ss)[[3]]
[1] -0.7426901
> |
```

---

<sup>1</sup> Nonlinear regression and nonlinear least squares in R. An Appendix to An R Companion to Applied Regression, second edition John Fox & Sanford Weisberg. 13-12-2010.

Hoewel volgens de berekeningen het model (groene lijn) sterk significant gelijk is aan de originele data (rode lijn, genotype D), komen de lijnen in de grafiek niet helemaal met elkaar overeen. Hoe de smeltcurves in het model er uit zien, dat moet ik nog bekijken. Ik verwacht dat er teveel verschil zal zijn in de T<sub>m</sub> waarden.



Om alles samen te vatten, ik kan niet zomaar een smeltcurve maken door de afgeleide te nemen van de ruwe data. Ergens vindt er nog één of andere transformatie plaats. Misschien heb jij nog documentatie hoe de data onder de grafiek wordt gegenereerd? Zonder deze data zal het lastig zijn om de smeltcurves te reproduceren vanuit de ruwe data.

Echter, ik vind het een interessant onderwerp. Ik ga er mij in verdiepen. Er is redelijk veel te lezen op internet over smeltcurves. Misschien dat ik ergens een antwoord vind.

Voor de publicatie zal ik dus niet snel betrouwbare curves kunnen reproduceren. Vind je het goed als ik jouw data gebruik om hier verder mee te puzzelen? Misschien kan ik dit probleem delen, bv via een blog of R-community. Als ik de cijfers iets verander (bijvoorbeeld toevoegen van ruis) kan ik dan jouw ruwe data gebruiken? Ik zal dan ook niet verwijzen naar het psittaci onderzoek. Het gaat mij om de methode hoe je smeltcurves kunt reproduceren buiten de software van de fabrikant om.

Met vriendelijke groet,

Robert ten Hove