

# **Análise da expressão gênica por meio da PCR quantitativa**

Dr<sup>a</sup> Patrícia Natália Silva

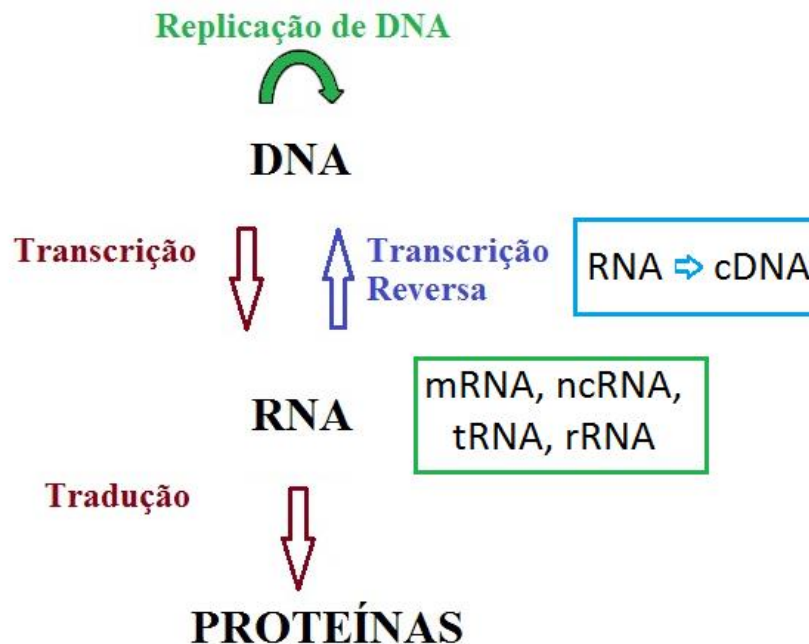
Curso de Introdução à análise bioinformática aplicada à genética

# Sumário

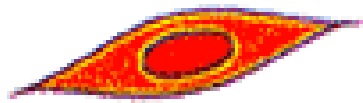
- Revisão sobre qPCR em expressão gênica
- Resumo de metodologias SYBR<sup>®</sup> e Taqman<sup>®</sup>
- Conceitos importantes
  - *Baseline, threshold, threshold cycle*, normalização e eficiência de reação
- Métodos de Análises:
  - $\Delta\Delta CT$  e curva padrão relativa
- Análises estatísticas
  - *Outliers*, comparação entre RQ,  $2^{-\Delta CT}$  e  $\Delta CT$

# Expressão gênica

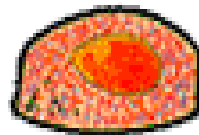
- Expressão gênica: processo pelo qual a informação de um gene é utilizado na síntese de um produto funcional



# Expressão gênica



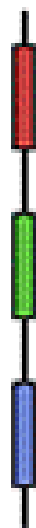
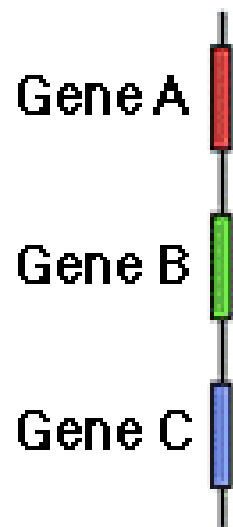
Muscle cell



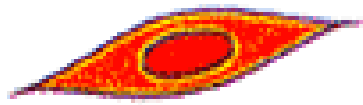
Skin cell



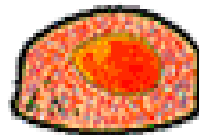
Nerve cell



# Expressão gênica



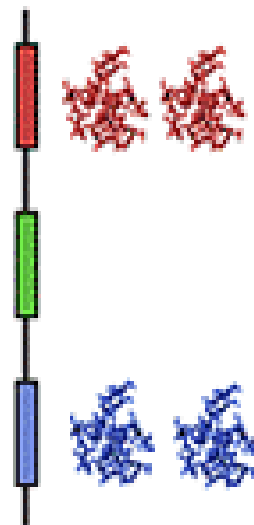
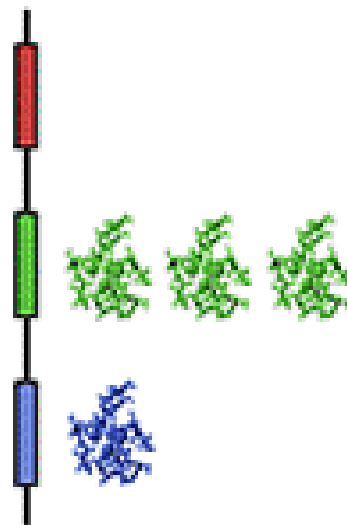
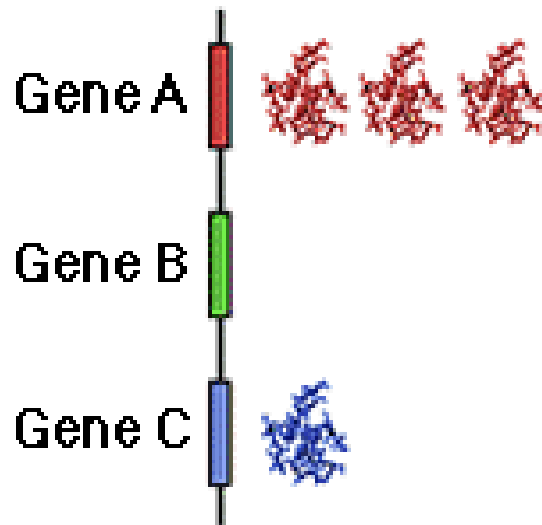
Muscle cell



Skin cell



Nerve cell



# PCR quantitativa em Tempo Real

- Método usado para medir a quantidade de cDNA inicial amplificado por PCR
- Há uma relação quantitativa entre a quantidade inicial da amostra alvo e a quantidade de produto da PCR após um determinado número de ciclos

$$P = T (1+E)^n$$
$$T_{\text{inicial}} = \frac{P_{\text{final}}}{(1+E)^n}$$

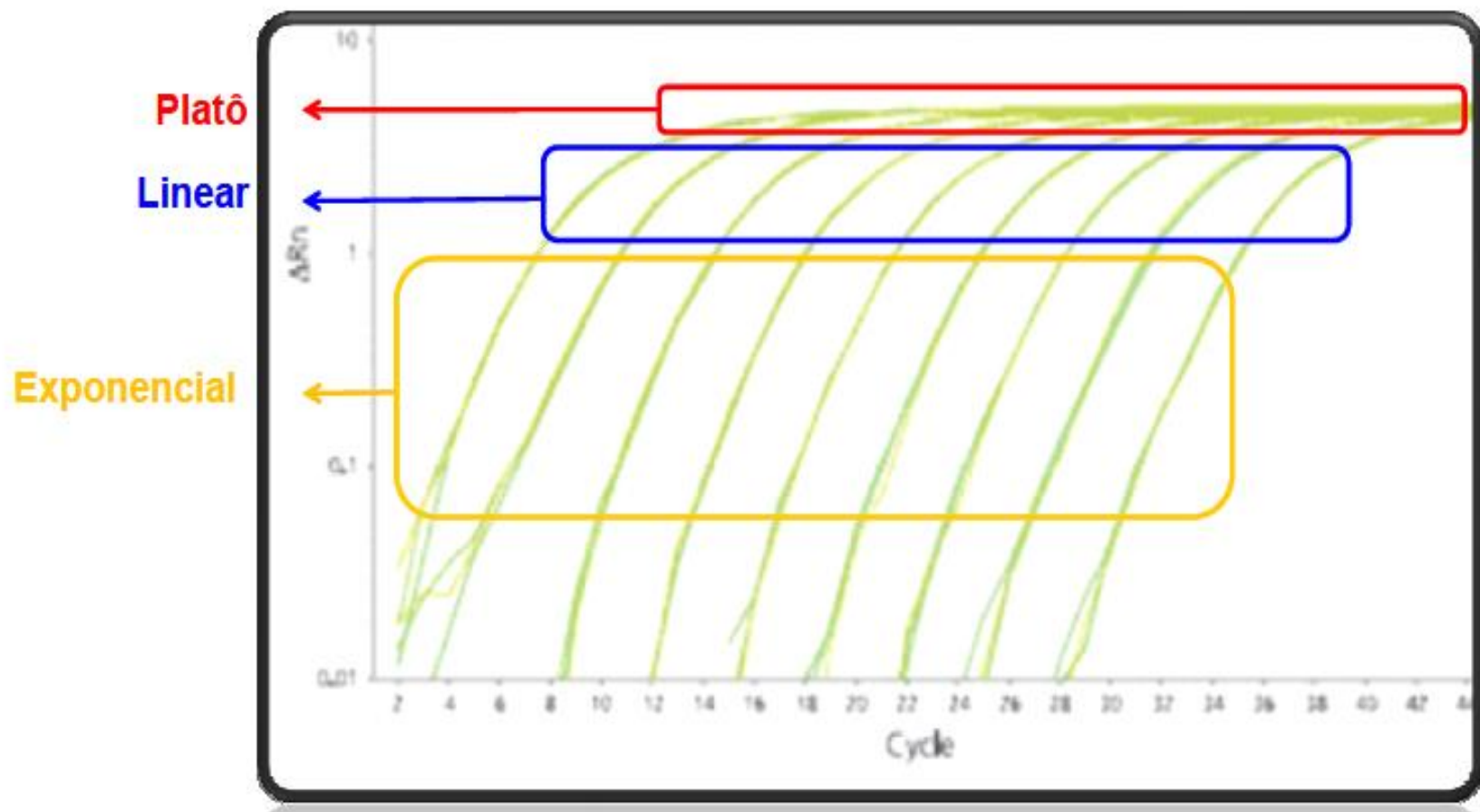
P = Produto final

T = Template no início da reação

n = Número de ciclos

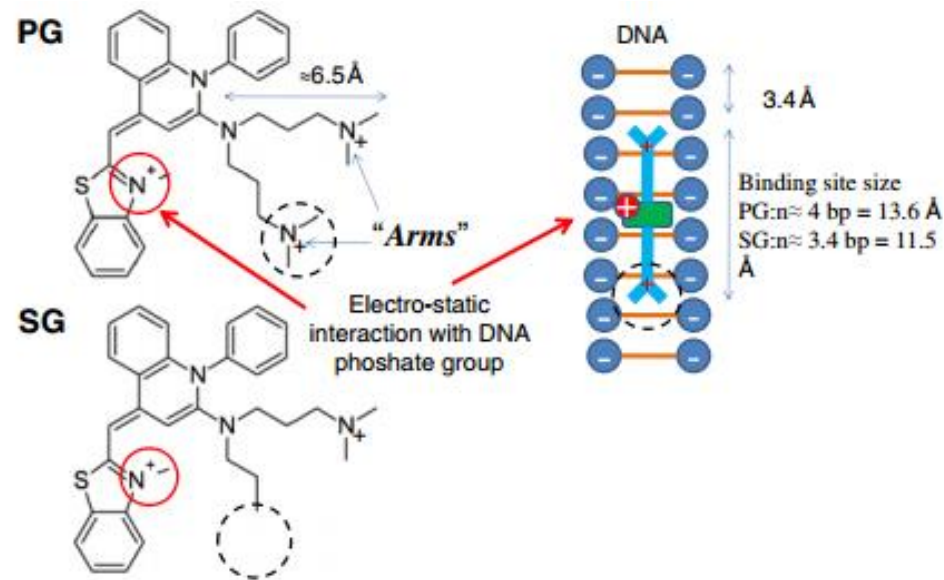
E = Eficiência

## Fases de uma PCR



# Sistemas de detecção da expressão gênica

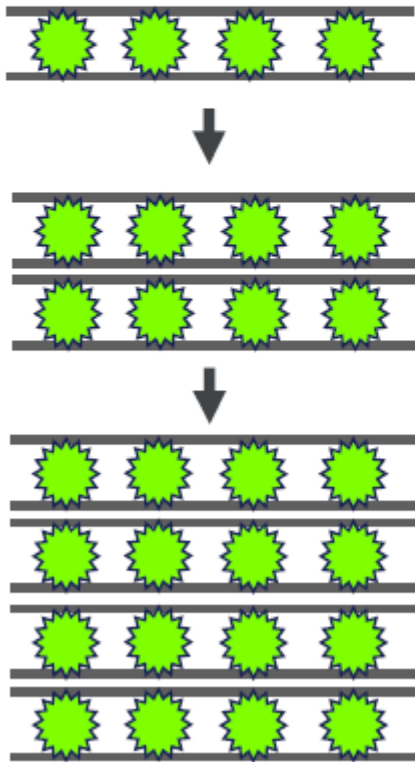
- Agentes intercalantes de DNA
- SYBR<sup>®</sup> Green
  - Afinidade por DNA dupla fita
  - 25 vezes mais sensível que o Brometo de Etídeo



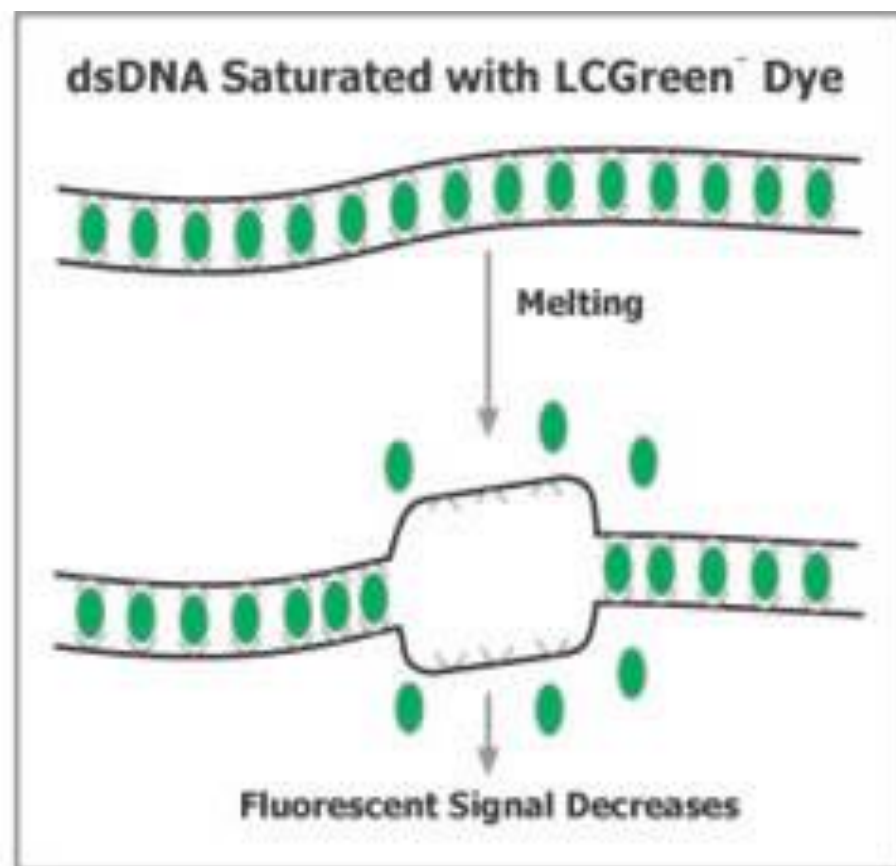
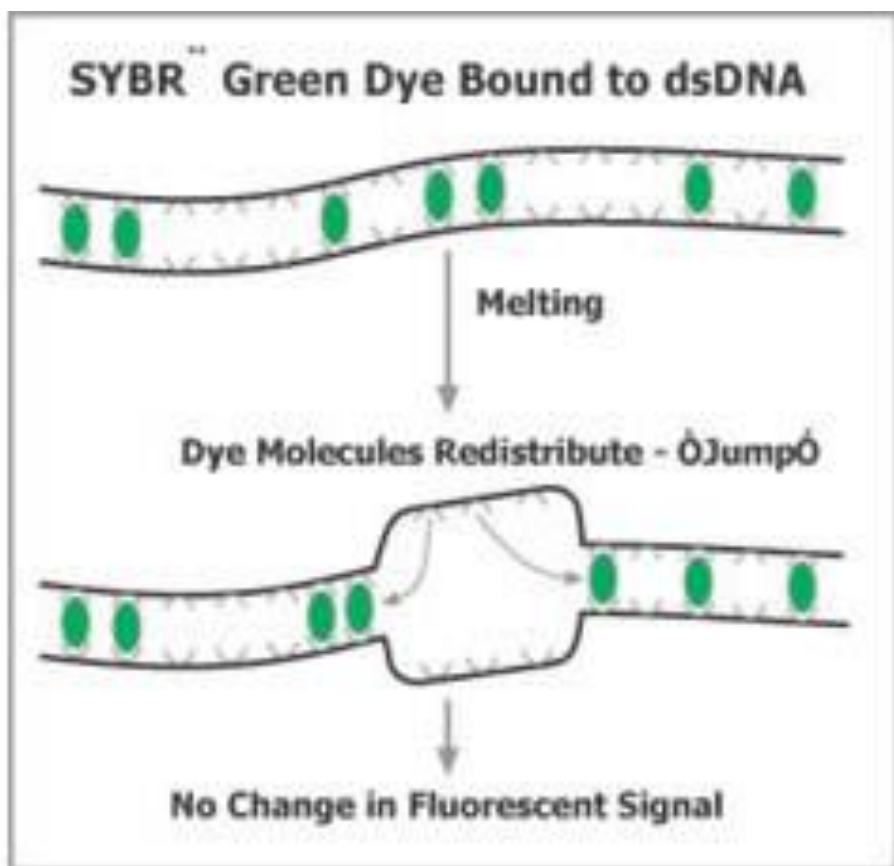


# Agentes Intercalantes de DNA

Aumento do sinal é proporcional o aumento do produto

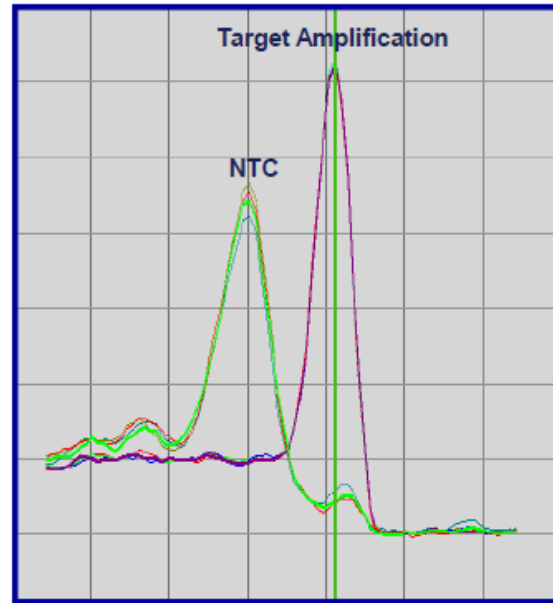
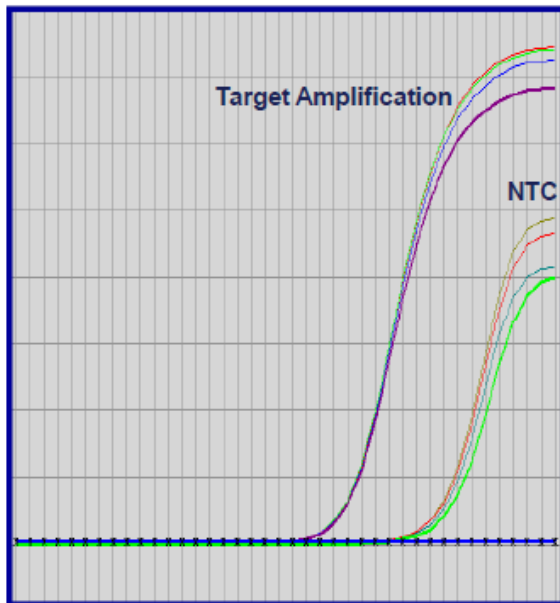


# Corantes de 3ª geração



# Intercalantes de DNA

- Curva de dissociação (Curva de *melting*)
- $T_m$  (Temperatura de *melting*)
  - Temperatura onde metade do produto de PCR está dissociado (desnaturado)



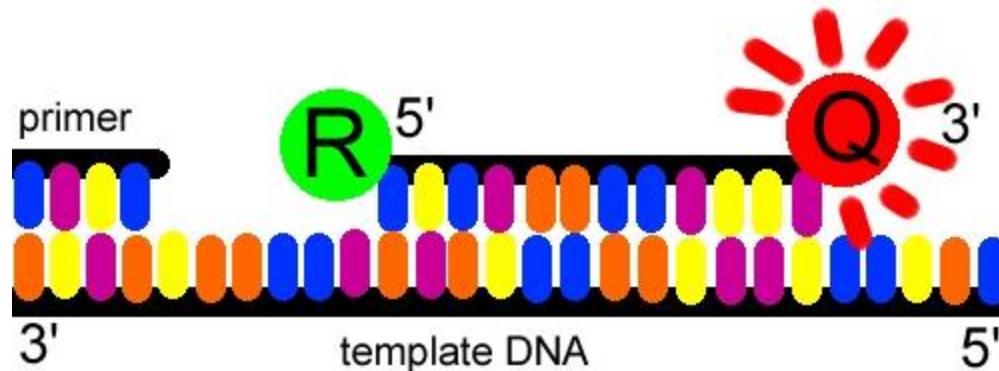
# Intercalantes de DNA

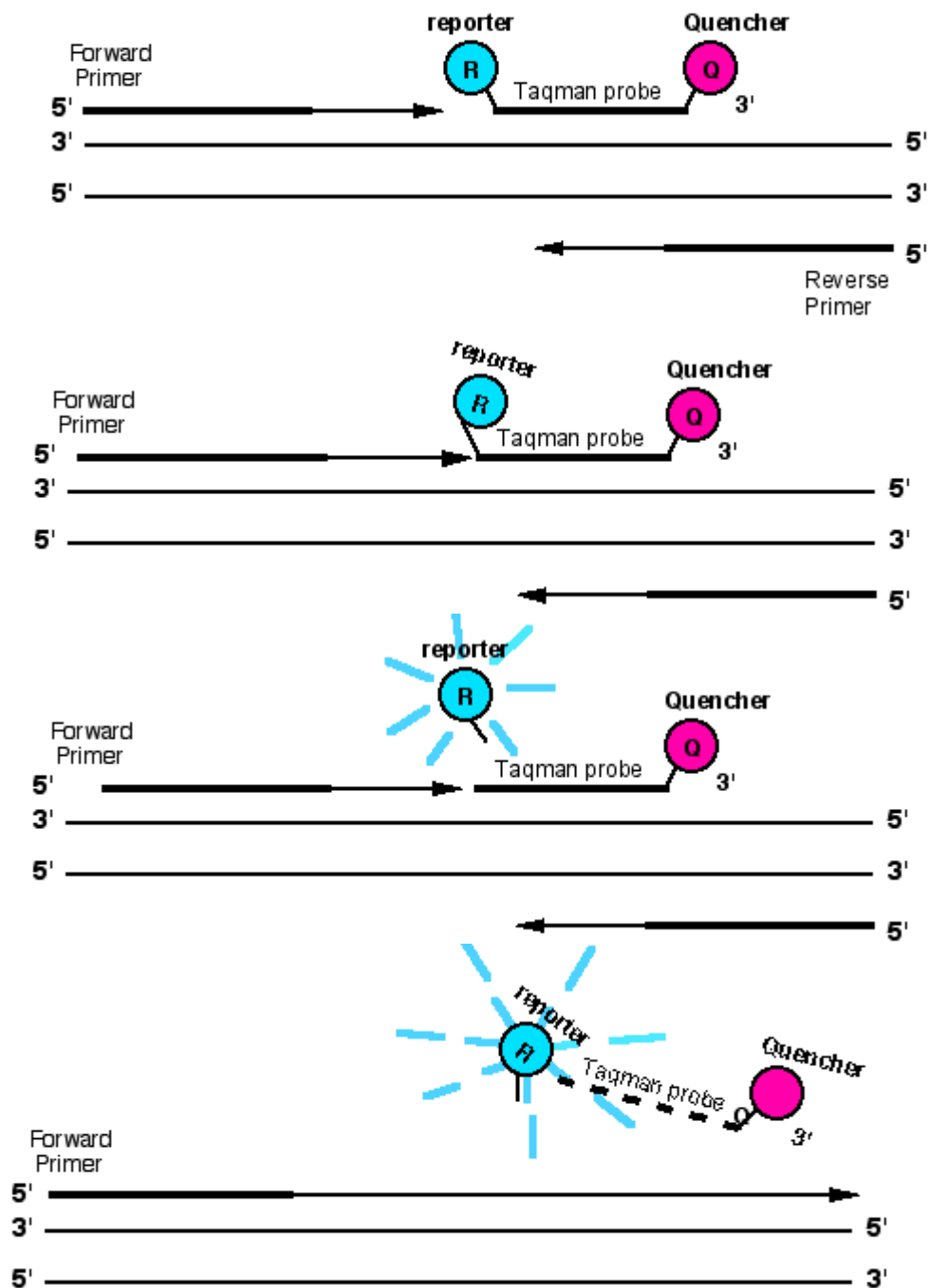
- Liga-se inespecificamente a qualquer dupla fita
- Produtos não específicos geram sinal
- Resultados quantitativos incorretos
- Desenho de *primers* para regiões desfavoráveis à síntese
- Menos dispendiosa

# Sondas TaqMan®

- Sondas lineares (hidrólise)
- Além dos *primers*:

Sonda com *Quencher* e *Reporter*





# TaqMan<sup>®</sup>

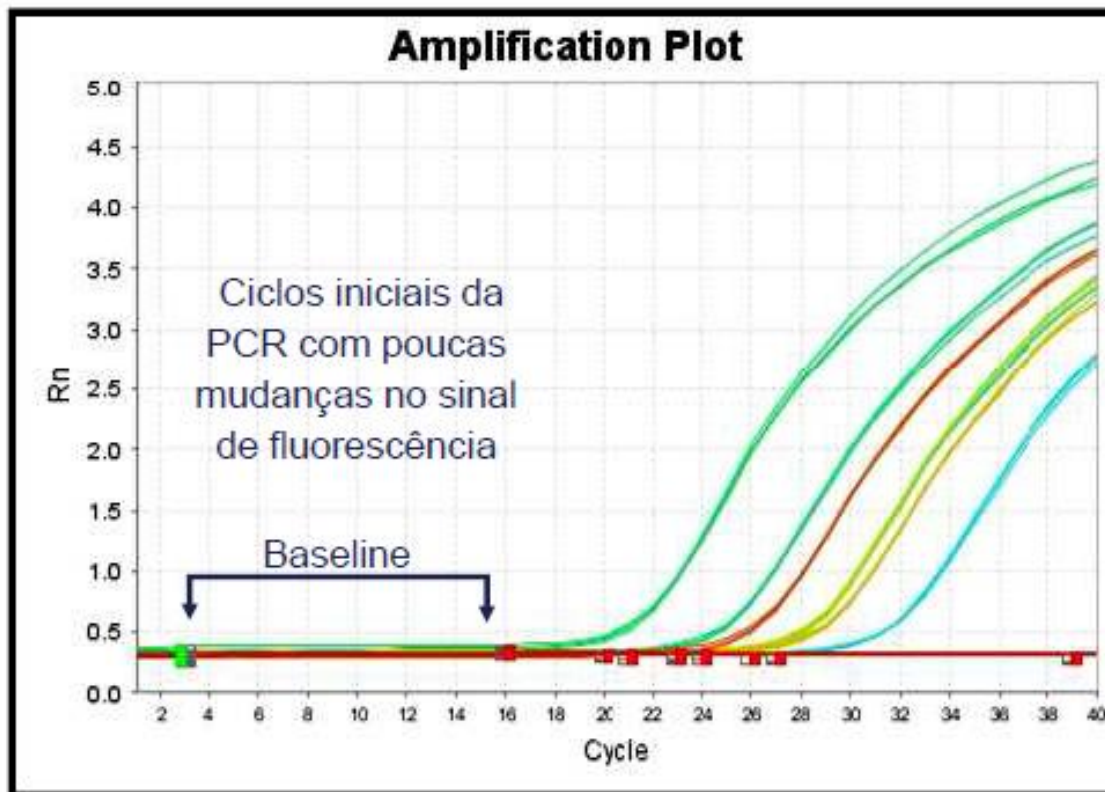
- Altamente específico e sensível
- Não permite, nem precisa de dissociação
- Permite Multiplex
- Mais dispendiosa \$



# Conceitos chave

- *Baseline*

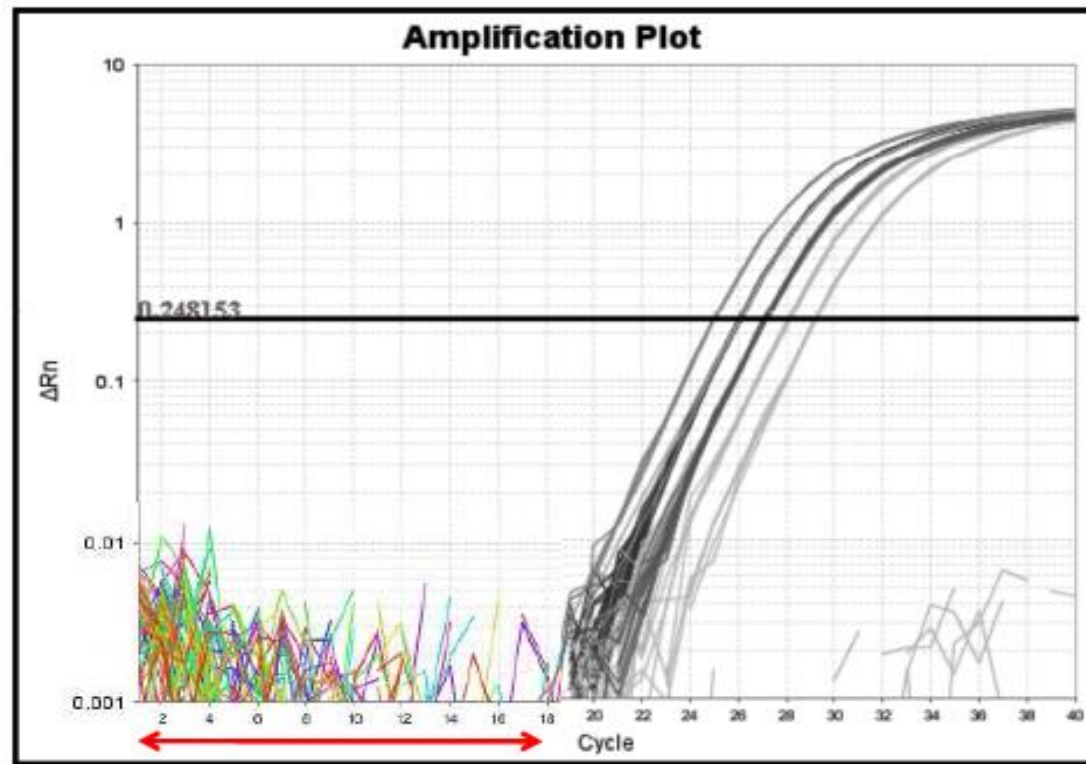
Fase onde a intensidade de sinal de produto amplificado não ultrapassa a quantidade de fluorescência presente no meio.





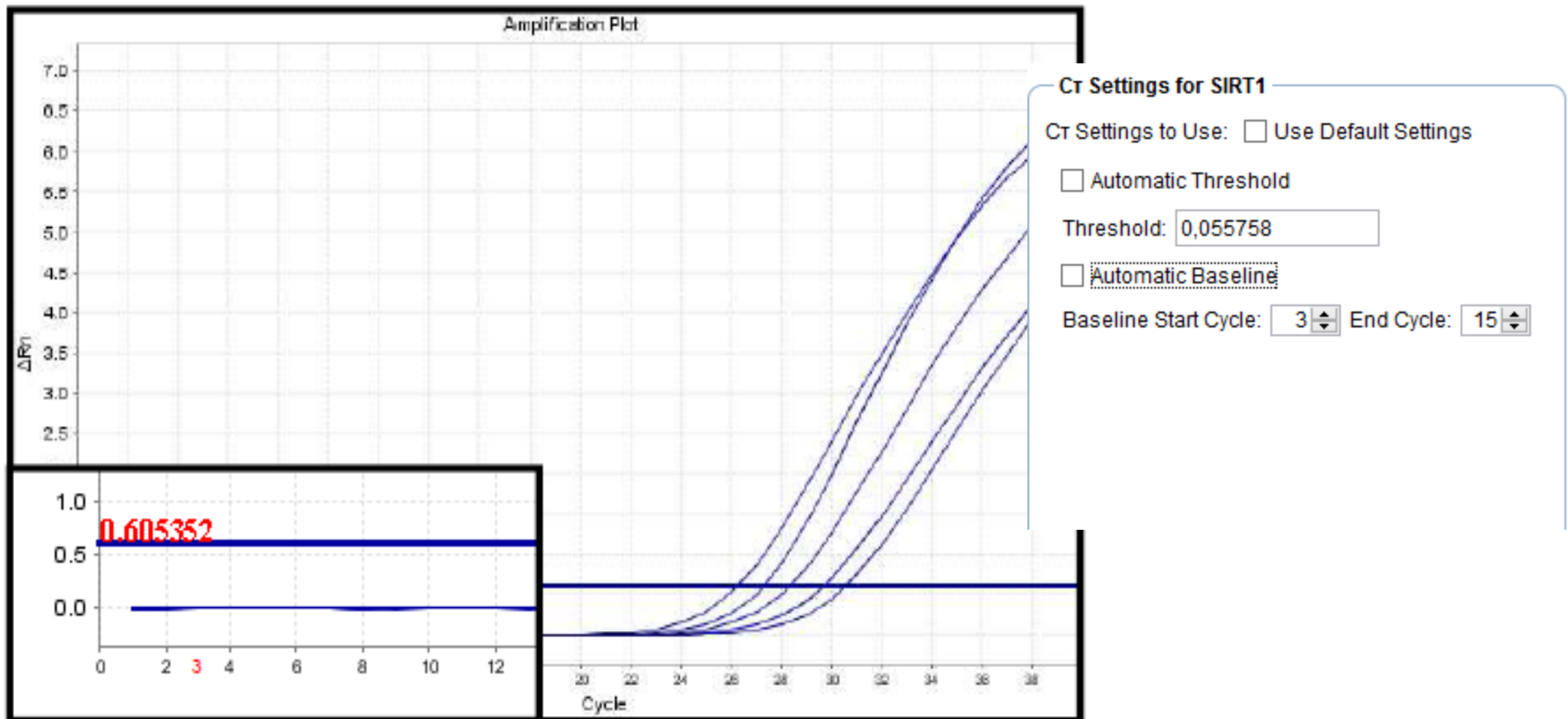
# *Baseline*

- Background – fluorescência dos primeiros ciclos da PCR



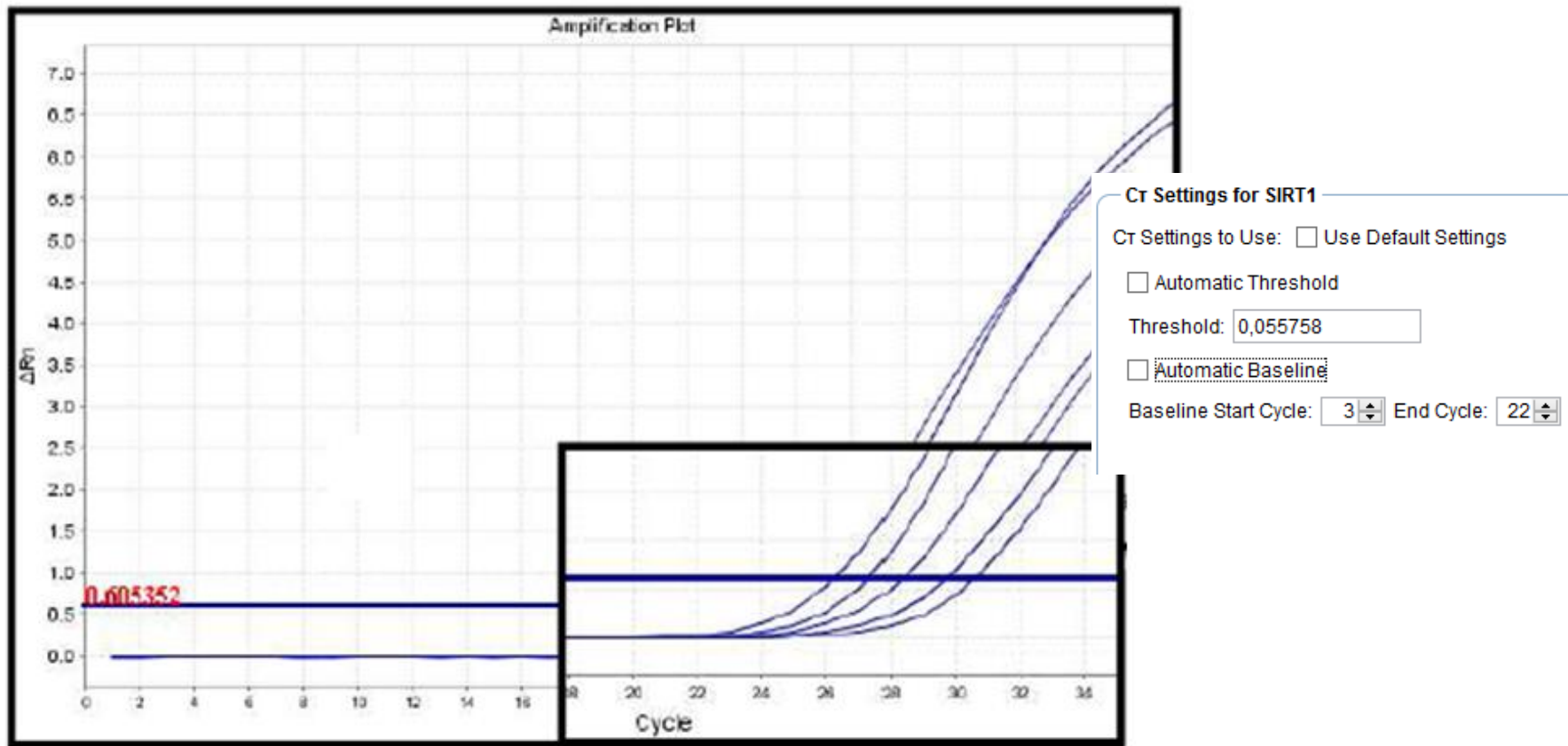
# Baseline

Em que ciclo começa?

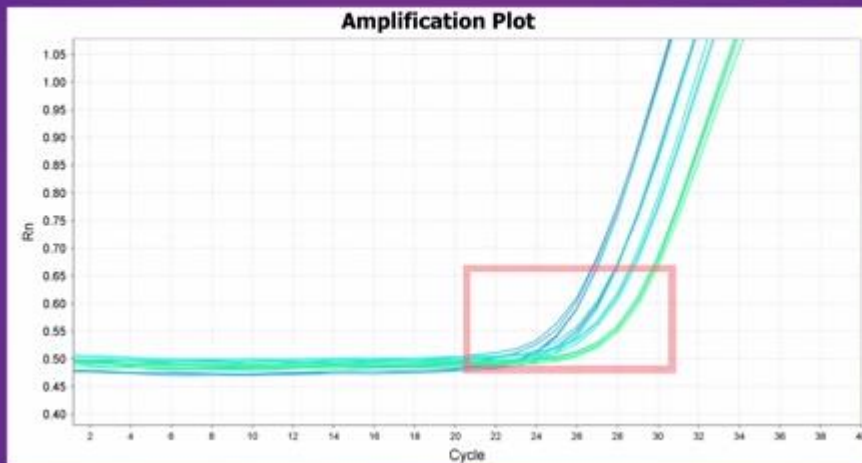


# Baseline

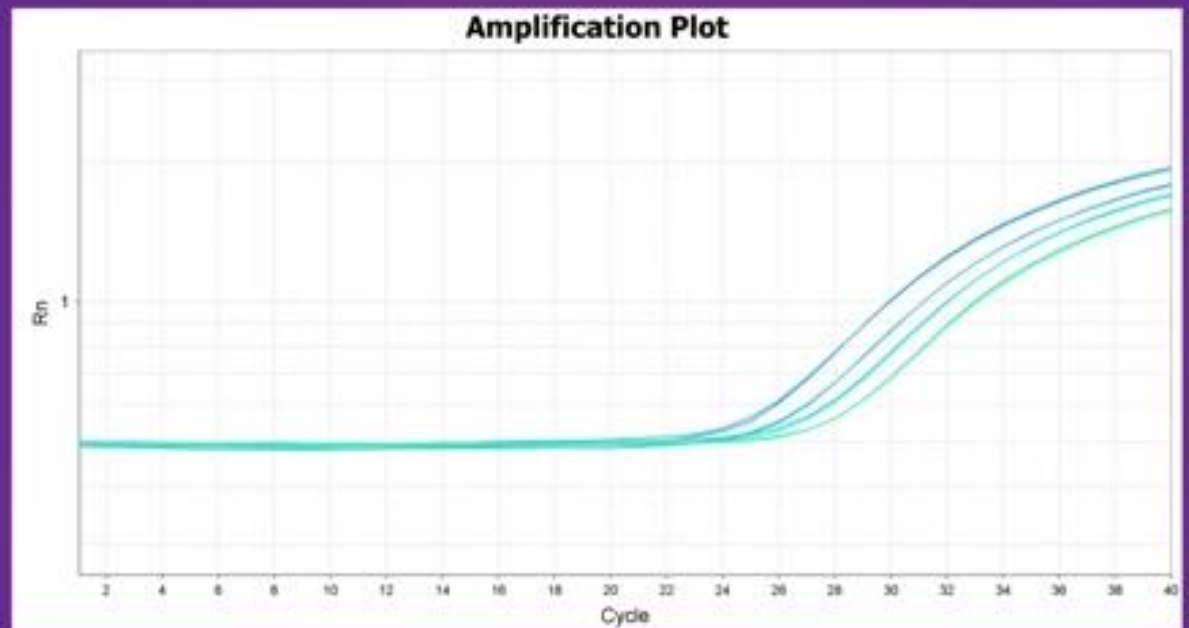
Em que ciclo termina?



## Before baseline subtraction



## After baseline subtraction



# Baseline

O que acontece se o *baseline* for muito baixo?



**Analysis Settings**

Cr Settings for RNase P TAMRA

Cr Settings to Use: ☐ Use Default Settings

☐ Automatic Threshold

Threshold: 0.605352

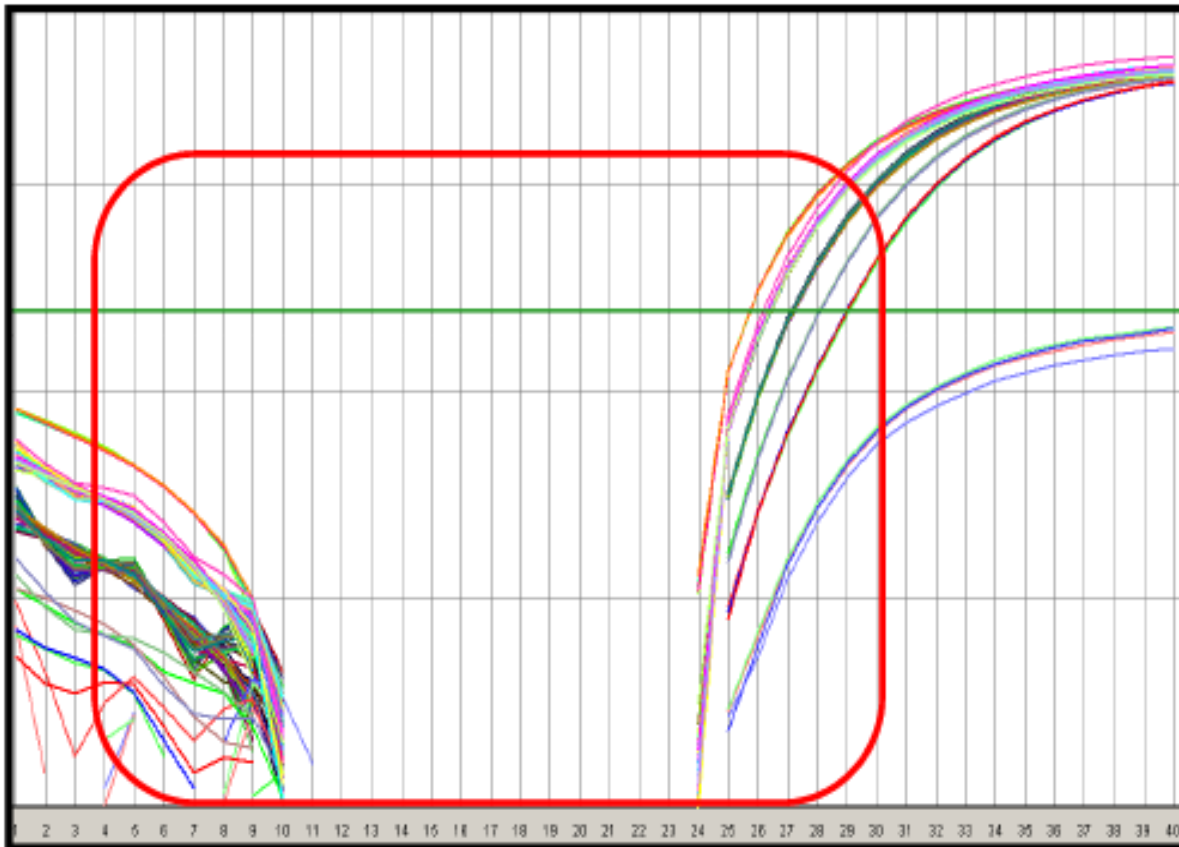
☐ Automatic Baseline

Baseline Start Cycle: 3 End Cycle: 6

Formato sigmoidal  
Sinal fluorescente não  
informativo

# Baseline

O que acontece se o *baseline* for muito alto?



**Analysis Settings**

Cr Settings for RNase P TAMRA

Cr Settings to Use: ☐ Use Default Settings

☐ Automatic Threshold

Threshold: 0.605352

☐ Automatic Baseline

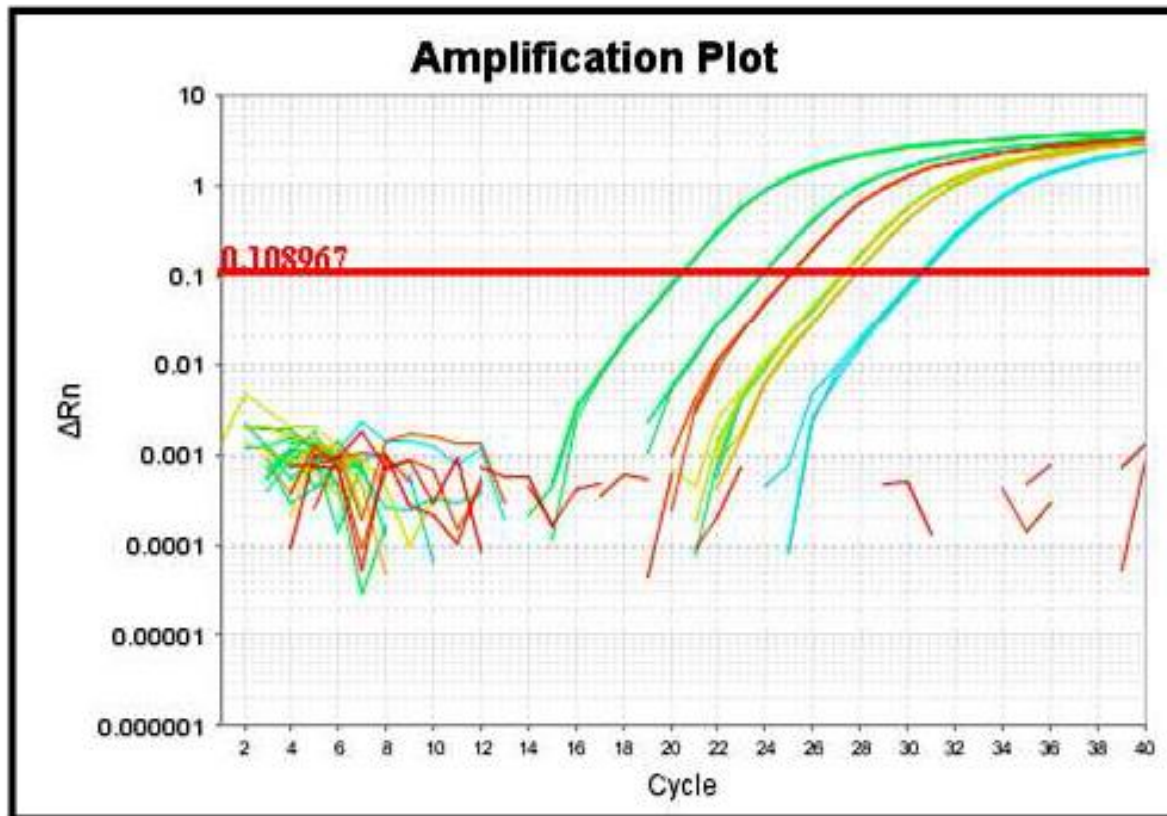
Baseline Start Cycle: 3 End Cycle: 26

Efeito dupla cascata  
Perda de sinal  
fluorescente informativo

# Conceitos chave

- *Threshold*

Nível arbitrário de fluorescência estabelecido em cima do *baseline* e dentro da região exponencial

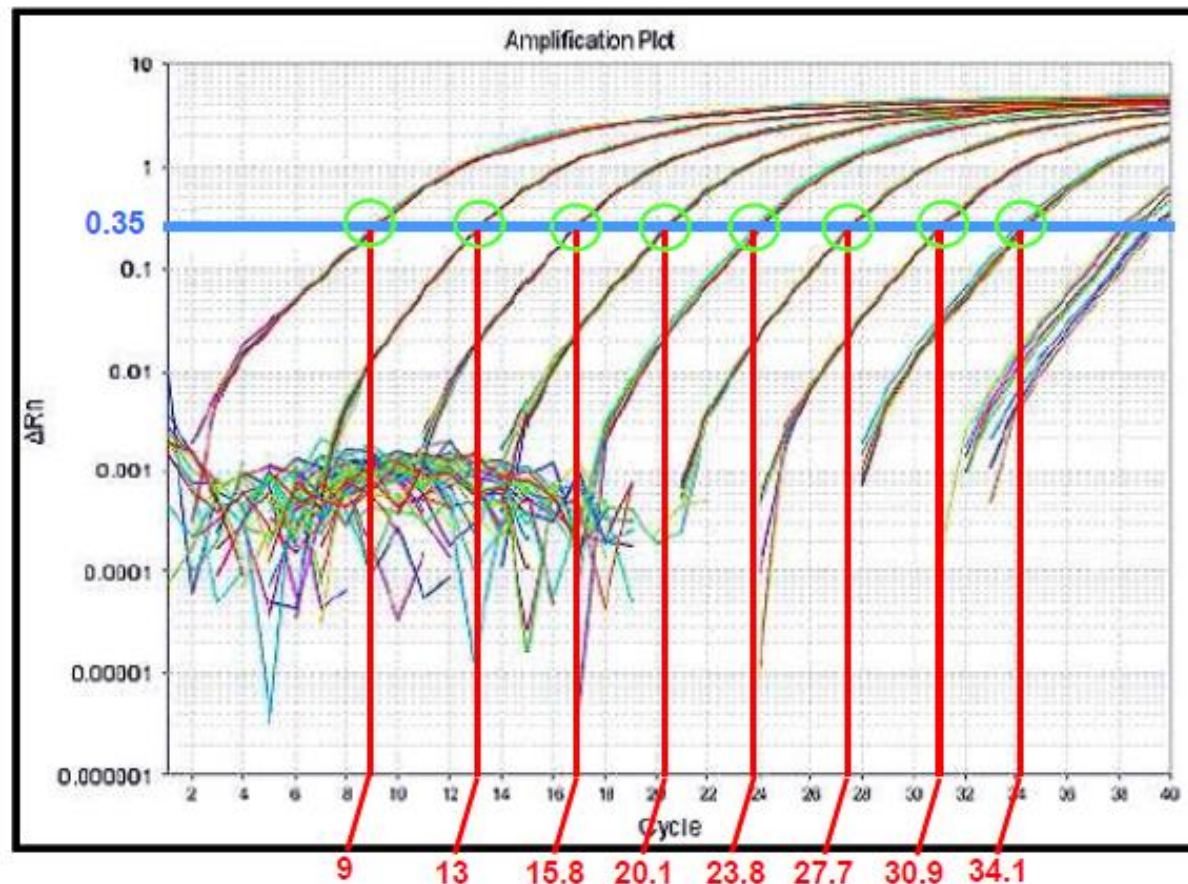




# Conceitos chave

- *Threshold cycle (Ct)*

Número de ciclos da PCR no qual a fluorescência atinge o *threshold*

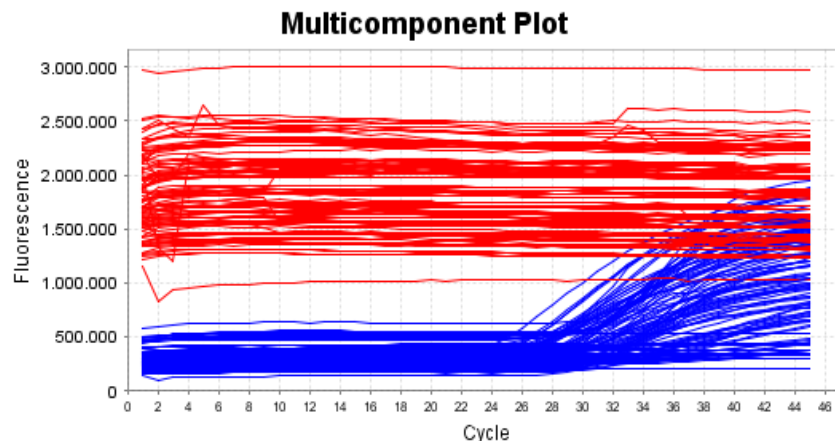




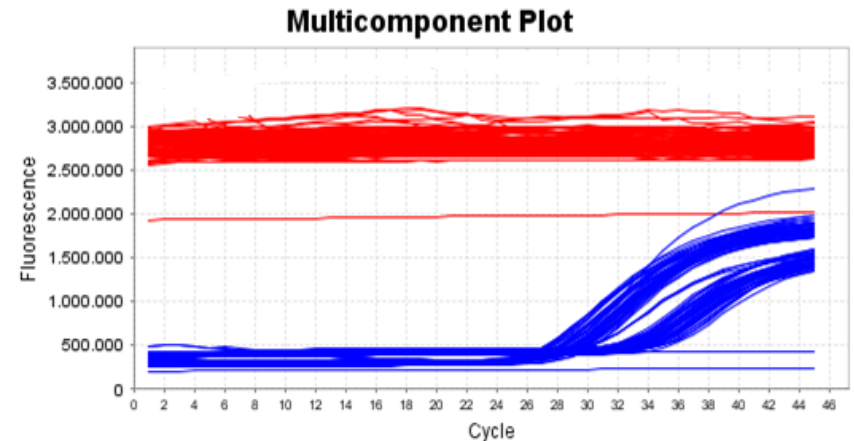
# Conceitos chave

## Normalizações:

- Reporter normalizado (Rn)
  - Sinal fluorescente normalizado por uma referência passiva
  - ROX – fluorescência presente no meio (correção de volumes e diferenças de detecção na placa)
    - Fluorescência do gene alvo/fluorescência do ROX



Legend  
■ FAM ■ ROX

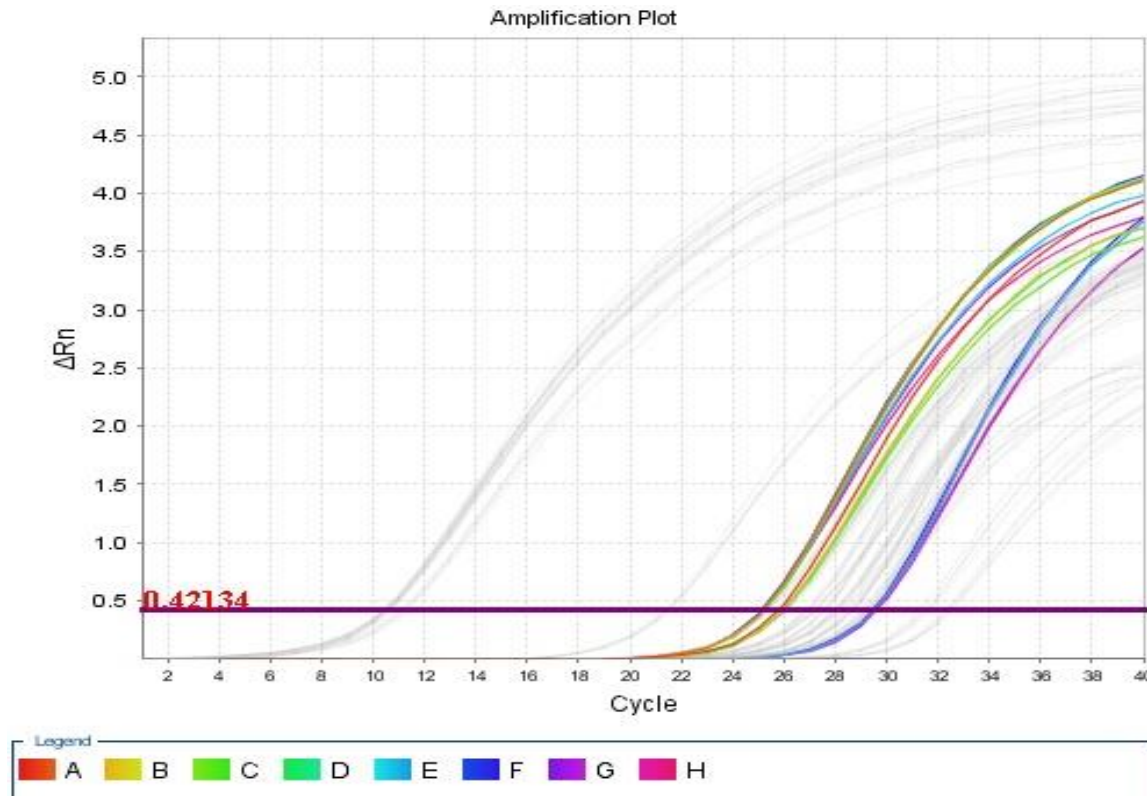


Legend  
■ FAM ■ ROX

# Conceitos chave

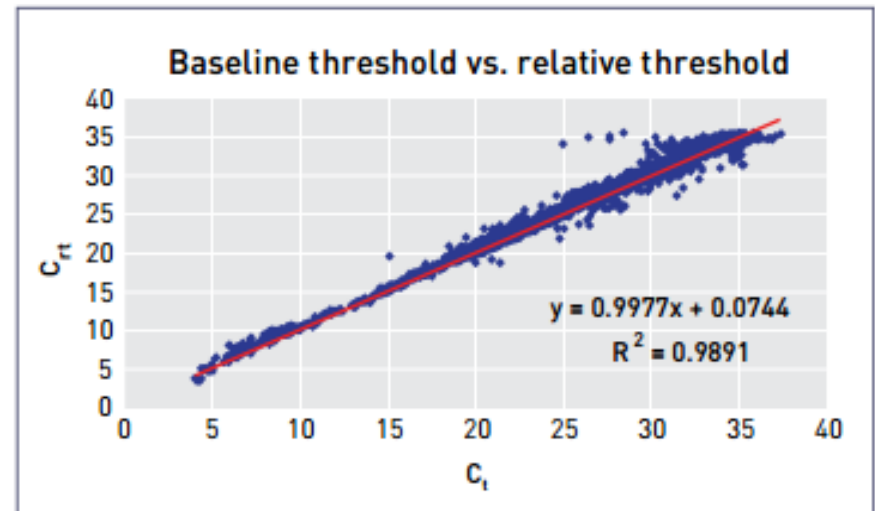
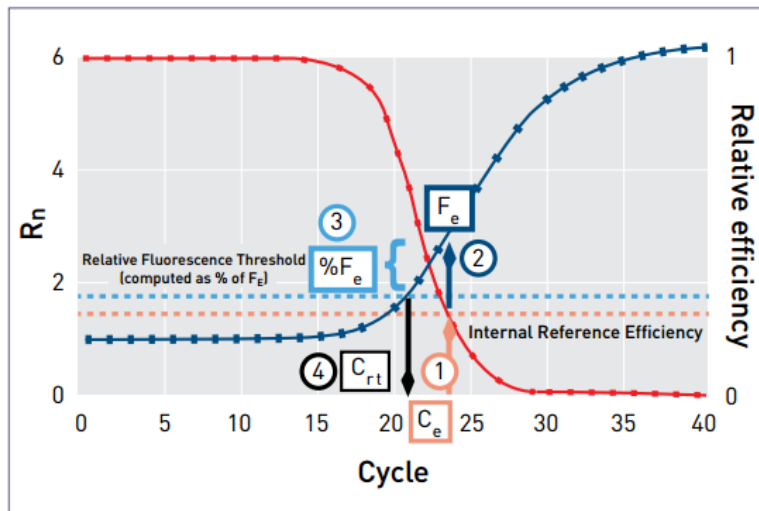
## Normalizações

- $\Delta R_n$ : Reporter normalizado corrigido pelo *baseline*

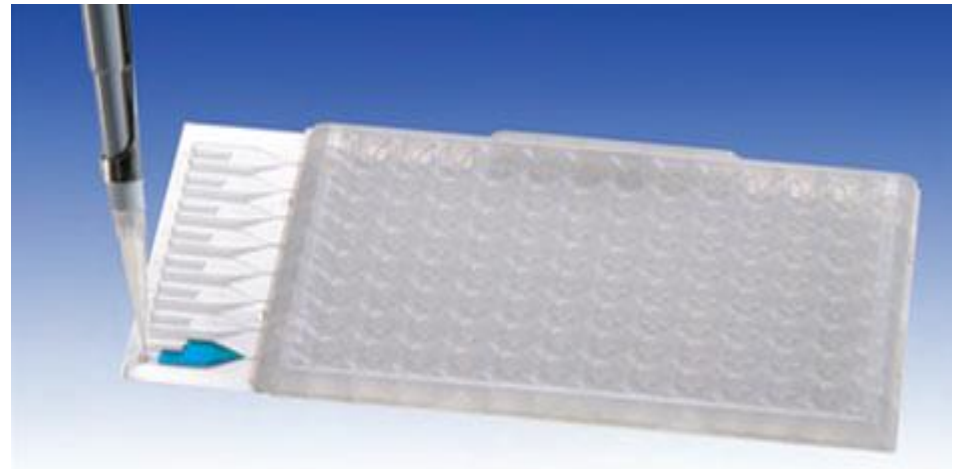
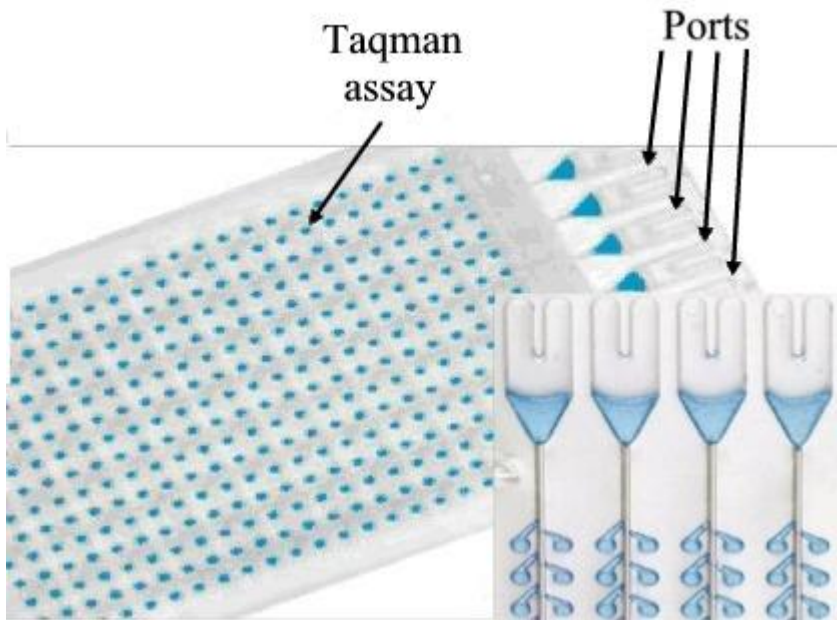


# Relative threshold cycle $\Delta C_{RT}$

- Correção de variações que podem ocorrer em reações com volume muito baixo
- Cálculo do  $C_t$  é realizado para cada curva, e não mais para todas as curvas do gene



	$C_t$ method	$C_{rt}$ method
Baselining	Amplification curve-specific	No baselining
Threshold	Target-specific	Curve-specific
$C_q$	Target-level $C_t$ values	Curve-level
Curves	Amplification curves	Reaction efficiency curves



# Conceitos chave

## Eficiência

- E= 100% tem que garantir que a amplificação dobra a cada ciclo

$$\textit{Template inicial} = \frac{\textit{Produto Final}}{(1 + \textit{Eficiência})^n \text{ de ciclos}}$$

$$P = T (1 + E)^n$$

# Conceitos chave

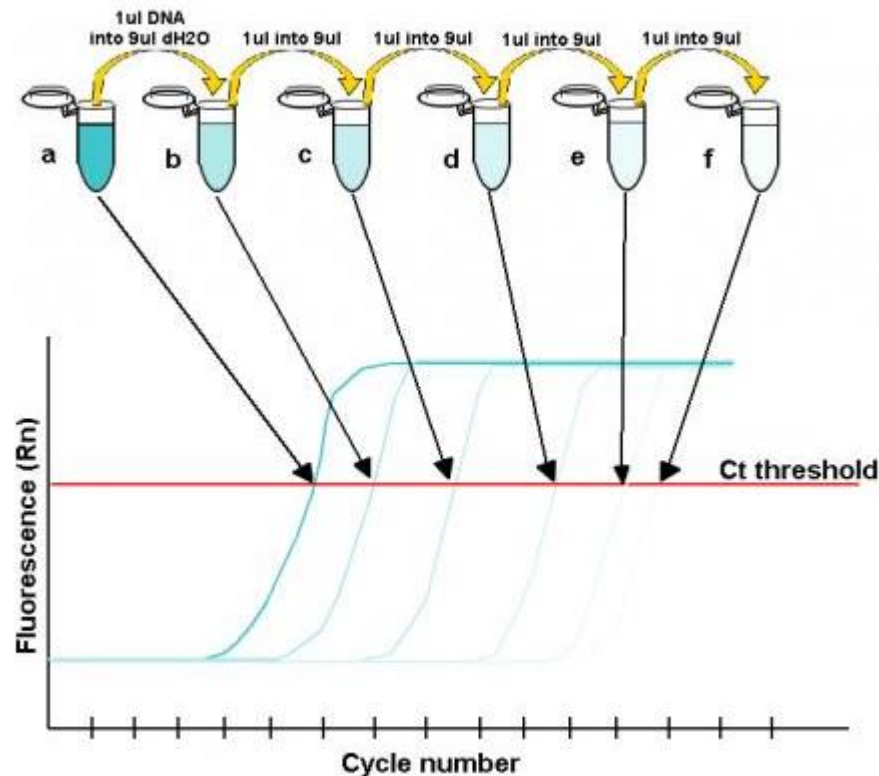
## Eficiência

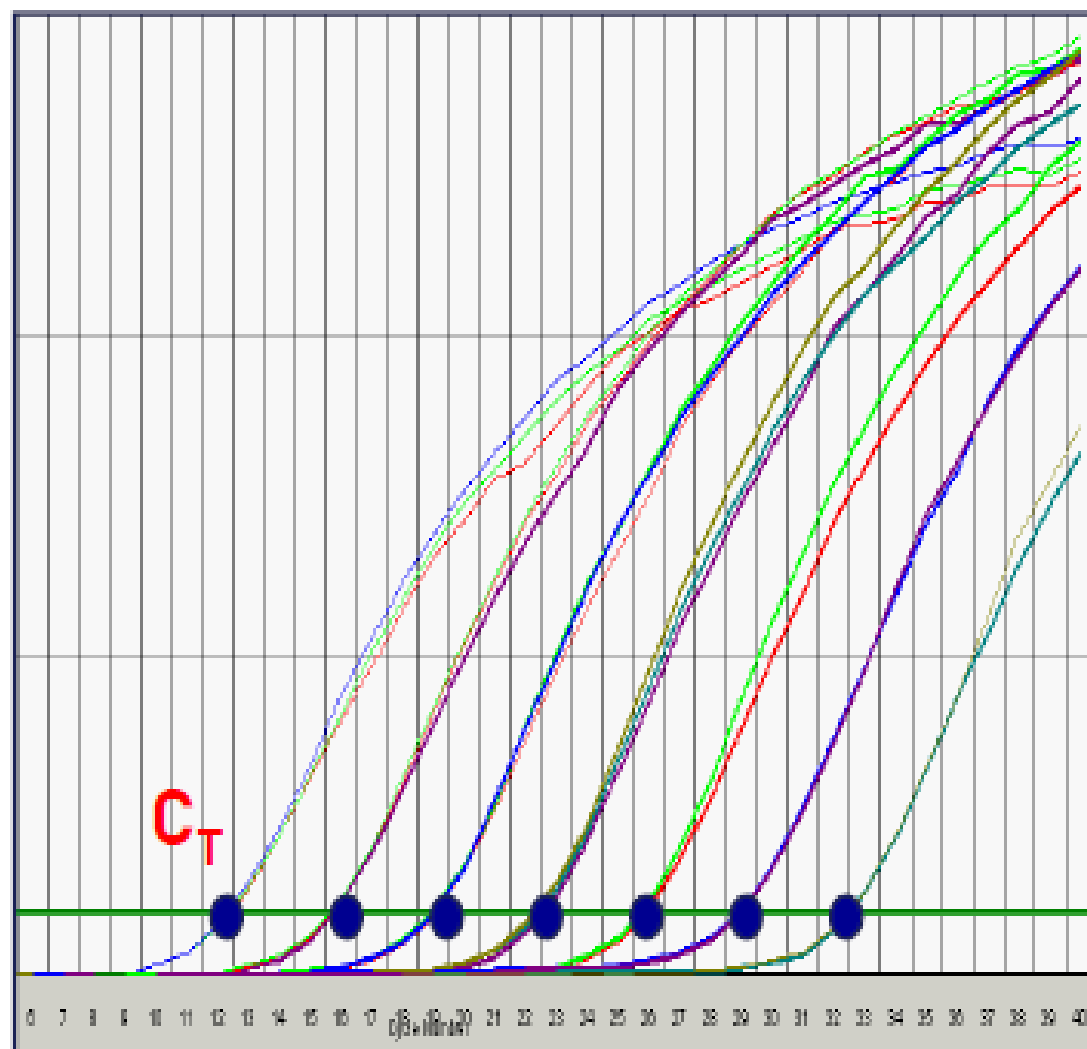
Pode variar de acordo com:

- O preparo da reação
- A qualidade do *templates*
- A presença de inibidores
- O desenho dos *primers*
- As condições de ciclagem
- A qualidade dos reagentes
- A concentração dos reagentes
- O tamanho do *amplicon*

# Eficiência da Reação - Curva padrão

- Curva padrão para calcular a eficiência da reação
- Diluições seriadas 1:10, 1:5, 1:2



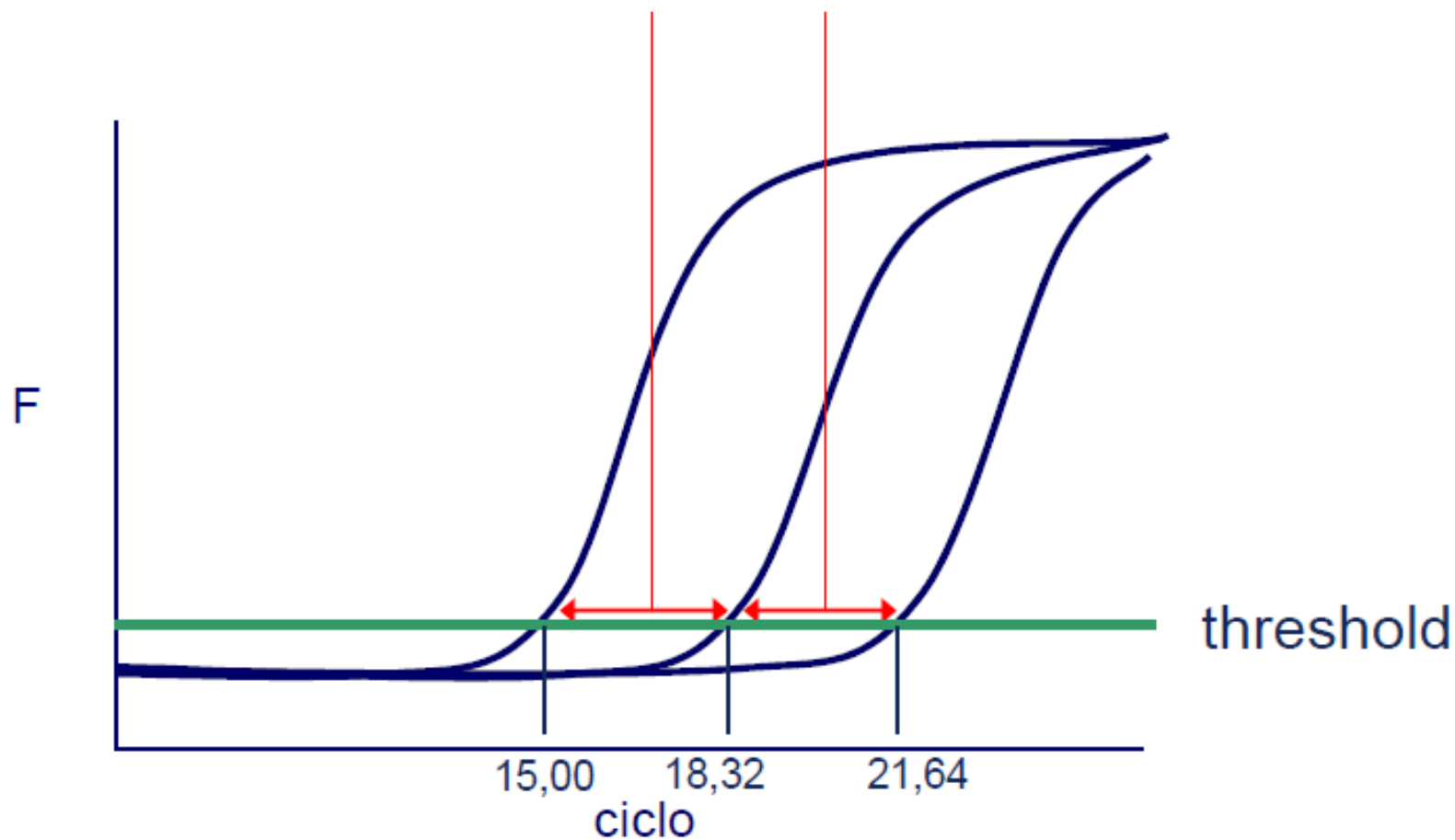




$\Delta \Delta Ct$

Eficiência de PCR

100% eficiência: diluição 1:10, 3.32 ciclos entre cada diluição



$\Delta \Delta C_t$

Eficiência de PCR

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

- E equivale ao coeficiente de regressão  $R^2$
- Calculado com base no *slope* (coeficiente linear da reta) de acordo com a equação da regressão linear da curva padrão
- Proximidade entre os pontos individuais de  $C_t$  e a reta
- Varia entre 0-1, quanto mais perto de 1, mais ajustado

$\Delta \Delta Ct$

## Eficiência de PCR

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

$$E = 10^{(-1/-3,33)} - 1$$

$$E = 10^{0,30} - 1$$

$$E = 1,995 - 1$$

$$E = 0,995 \text{ ou } 99,5\%$$

- $E=100\%$  - slope de -3,32
- Mais negativos (Ex: -3,7)  $E < 100\%$
- Mais positivos (Ex: -2,9)  $E > 100\%$  (pipetagem, qualidade da amostra)

# Gene de referência/endógeno

- **Utilizado para corrigir variações relacionadas à:**
  - Quantidade de tecido utilizado na extração (número de células total)
  - Eficiência de extração de RNA (por exemplo, em tecidos diferentes)
  - Eficiência da transcrição reversa (RT) e da amplificação (PCR)
  - Quantificação de RNA/cDNA inicial
  - Pipetagem de RNA/cDNA nas reações
  - Degradação de RNA/cDNA

# Gene de referência

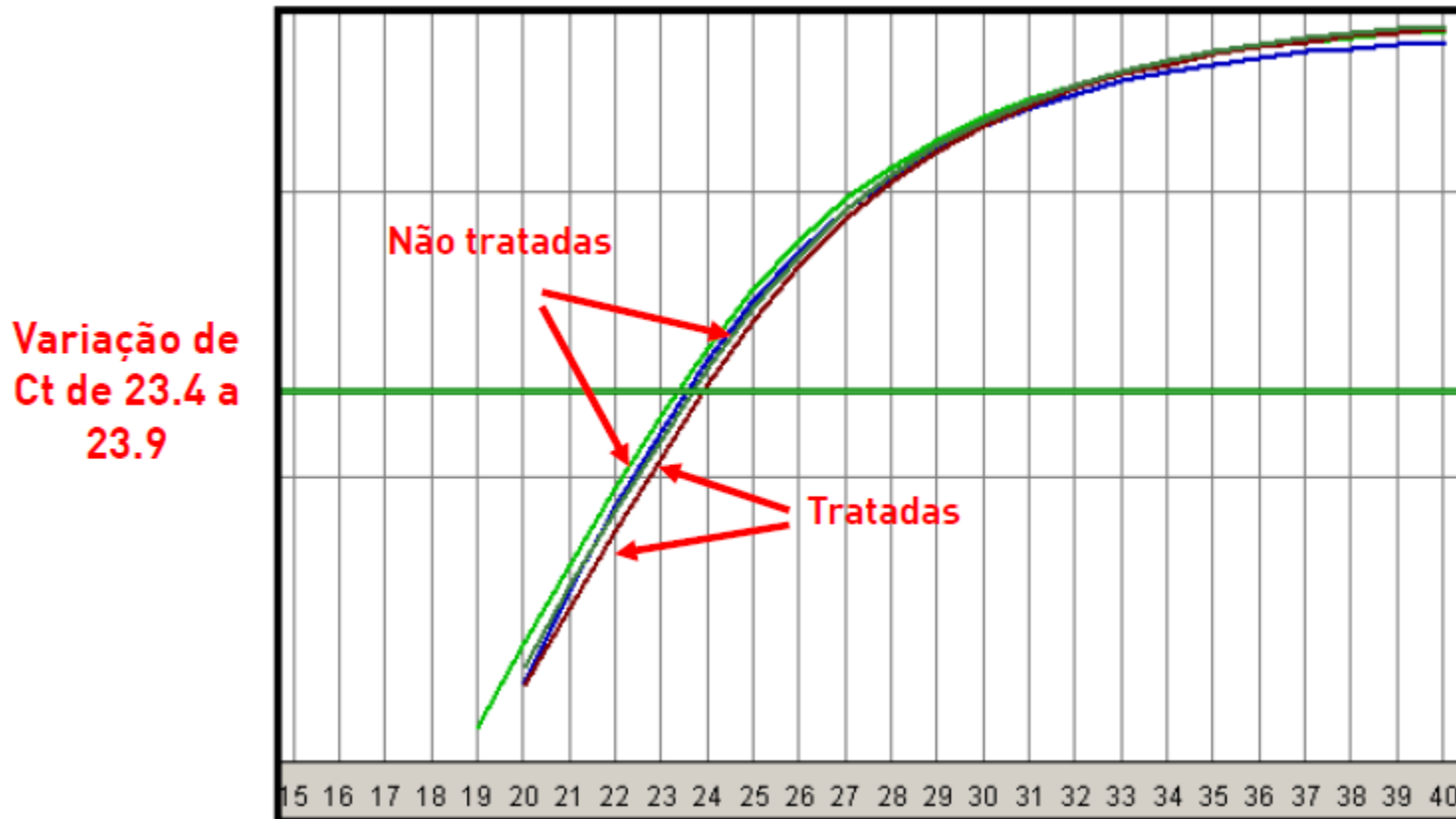
Qual é o gene de referência ideal?

$$\frac{\text{Expressão no Tratado}}{\text{Expressão no Controle}} = \sim 1$$

Aquele cuja expressão gênica não tenha grandes  
variações entre as diferentes condições  
experimentais!

# Gene Referência

- Amostras tratadas e não tratadas: amplificação do gene referência



# Métodos para Cálculo da Quantificação Relativa

- **Ct Comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ )** – Preparo mais simples pois não requer curva padrão. É necessária a validação das eficiências dos ensaios do gene alvo e endógeno, que devem ser semelhantes
- **Curva Padrão Relativa** – Não requer validação da eficiência, nem que a eficiência dos ensaios do alvo e do endógeno sejam semelhantes. Requer construção de curva padrão, portanto uso de mais reagentes e espaço na placa

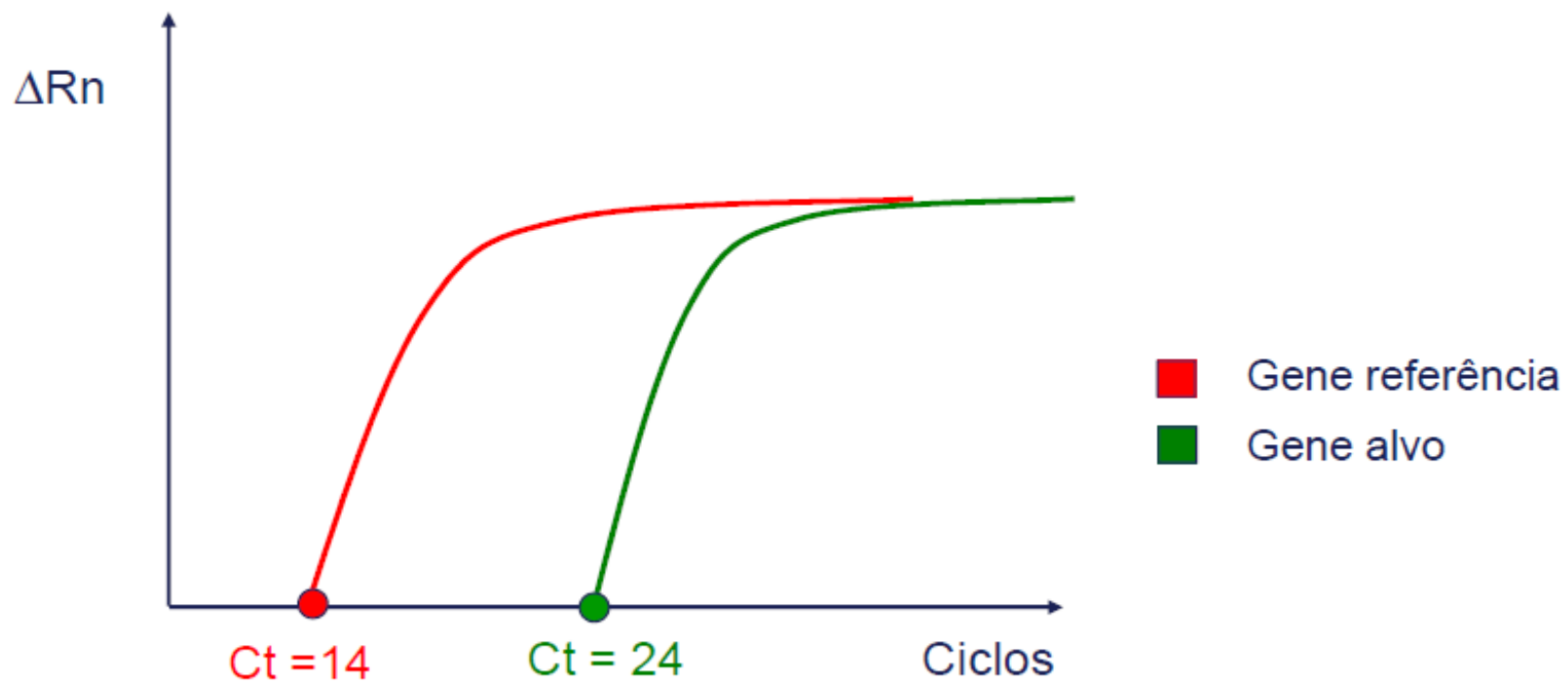
# $\Delta\Delta Ct$

## Validação do Método do $C_T$ Comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ )

Gene Alvo - Gene Referência	<b>Eficiência*</b> <small>* Tolerância de +- 10%</small>	<b>Cálculo</b>
Alvo = GR	100 %	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Alvo = GR	<100%	$(1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$
Alvo $\neq$ GR	NA	<b>Curva Padrão Relativa</b>



$\Delta \Delta Ct$



$$\Delta Ct = 24 - 14 = 10$$

## $\Delta \Delta C_t$

	<b>c-myc</b> <i>Ct ± desvio</i>	<b>GAPDH <i>Tecido</i></b> <i>Ct ± desvio</i>	<b><math>\Delta C_t</math></b> <i>c-myc - GAPDH</i>	<b><math>\Delta \Delta C_t</math></b> $\Delta C_t - \Delta C_t$	<b><math>2^{-\Delta \Delta C_t}</math></b> <i>Rel. ao cérebro</i>
<b>Cérebro</b>	<b>30.49 ± 0.15</b>	<b>23.63 ± 0.09</b>	<b>6.86 ± 0.17</b>	<b>0.00 ± 0.17</b>	<b>1.0 ± 0.11</b>
Rim	27.03 ± 0.06	22.66 ± 0.08	4.37 ± 0.10	-2.50 ± 0.10	5.6 ± 0.32
Fígado	26.25 ± 0.07	24.60 ± 0.07	1.65 ± 0.10	-5.21 ± 0.10	37.0 ± 2.52
Pulmão	25.83 ± 0.07	23.01 ± 0.07	2.81 ± 0.10	-4.05 ± 0.10	16.5 ± 1.10

$$\Delta C_T = C_T (\text{alvo}) - C_T (\text{gene de referência})$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T (\text{amostra}) - \Delta C_T (\text{calibrador})$$

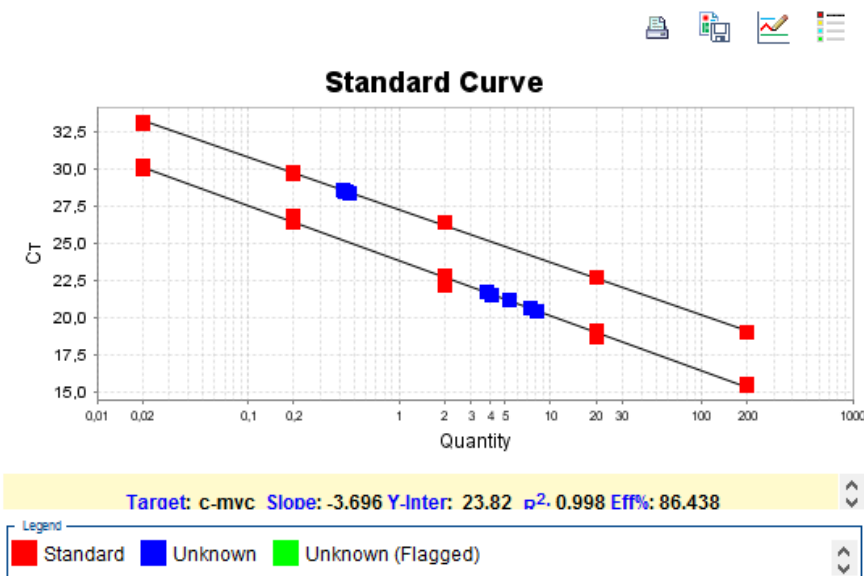
$$\text{Quantidade Relativa} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

## $\Delta \Delta C_t$

- Vantagem:
  - > Não há necessidade de utilizar curva padrão em toda placa.
  - > Redução na quantidade de reagentes.
- Considerações:
  - > Necessita ser validado.
  - > Eficiência de amplificação do alvo (gene de interesse) e da referência interna (gene de referência) deve ser igual (dp =  $\pm 10\%$ ).
  - > Taqman Gene Expression Assays possuem eficiência próxima de 100%
  - > Ideal para um grande número de alvos e/ou amostras ou para validação de resultados de microarray.

# Curva Padrão Relativa

- Necessita de curva padrão do gene alvo e do endógeno a cada placa
- Gasta mais reagentes, amostra e \$
- Ideal para estudos com número amostral pequeno
- Não necessita testar a eficiência dos ensaios
- Resultados mais precisos



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N c-m Ct Uni	N c-m Ct Uni	N c-m Ct Uni	N GAI Ct Uni	N GAI Ct Uni	N GAI Ct Uni	U c-m 7.39	U c-m 8.13	U c-m 0.47	U G... 0.44	U G... 0.43	U G... 0.43
B	U c-m 5.32	U c-m 4.1	U c-m 3.76	U G... 0.44	U G... 0.43	U G... 0.43	S c-m 200	S c-m 200	S c-m 200	S c-m 20	S c-m 20	S c-m 20
C	S c-m 2	S c-m 2	S c-m 2	S c-m 0.2	S c-m 0.2	S c-m 0.2	S c-m 0.02	S c-m 0.02	S c-m 0.02	S G... 200	S G... 200	S G... 200
D	S G... 20	S G... 20	S G... 20	S G... 2	S G... 2	S G... 2	S G... 0.2	S G... 0.2	S G... 0.2	S G... 0.02	S G... 0.02	S G... 0.02
E												
F												
G												
H												

Wells: U 12 Unknown S 30 Standard N 6 Negative Control

48 Empty

## Curva Padrão Relativa

<i>Tecido</i>	<b>c-myc</b> <i>Valor Arbitrário</i>	<b>GAPDH</b> <i>Valor Arbitrário</i>	<b>c-myc<sub>N</sub></b> <i>Norm. c/ GAPDH</i>	<b>c-myc<sub>N</sub></b> <i>Rel. ao cérebro</i>
<b>Cérebro</b>	<b>0.039 ± 0.004</b>	<b>0.54 ± 0.034</b>	<b>0.07 ± 0.008</b>	<b>1.0 ± 0.12</b>
Rim	0.41 ± 0.016	1.02 ± 0.052	0.40 ± 0.025	5.5 ± 0.35
Fígado	0.70 ± 0.036	0.28 ± 0.013	2.49 ± 0.173	34.2 ± 2.37
Pulmão	0.93 ± 0.044	0.81 ± 0.041	1.15 ± 0.079	15.7 ± 1.09

Gene alvo

Amostra alvo normalizada

---

Gene de referência

---

Amostra calibradora normalizada

# Análise estatística dos dados

- Verificar a distribuição dos dados:
  - Eles apresentam distribuição normal?
- Existem *outliers* entre as amostras?
  - Calcular zscore e excluí-los?
- Comparação entre grupos:
  - Teste-t, Anova, Mann-Whitney...
- Qual variável usar?
  - RQ?  $2\text{-}\Delta\text{CT}$ ?  $\Delta\Delta\text{CT}$ ?



1: Amostra A100

	Amostra	Idade
1	A100	6
2	A103	6
3	A105	7
4	A107	8
5	A110	5
6	A115	8
7	A116	6
8	A120	6
9	A121	8
10	A127	7
11	A128	7
12	A137	7
13	A138	8
14	A139	7
15	A140	7
16	A141	7
17	A142	6
18	A143	8
19	A144	8
20	A145	7
21	A146	74
22	A147	85
23	A148	75

- Reports
- Descriptive Statistics**
- Tables
- Compare Means
- General Linear Model
- Generalized Linear Models
- Mixed Models
- Correlate
- Regression
- Loglinear
- Neural Networks
- Classify
- Dimension Reduction
- Scale
- Nonparametric Tests
- Forecasting
- Survival
- Multiple Response
- Missing Value Analysis...
- Multiple Imputation
- Complex Samples
- Quality Control
- ROC Curve...

- 123 Frequencies...
- Descriptives...
- Explore...**
- Crosstabs...
- Ratio...
- P-P Plots...
- Q-Q Plots...



po	Estudo	Benéfico_Cerebral	Gene_Nome	Média_CTs
2		999	HSPA8	28,875
2		999	HSPA8	28,256
2		999	HSPA8	27,237
2		999	HSPA8	26,087
2		999	HSPA8	27,903
1	2	999	HSPA8	28,362
1	2	999	HSPA8	29,116
1	2	999	HSPA8	26,424
1	2	999	HSPA8	26,349
1	2	999	HSPA8	27,419
1	2	999	HSPA8	27,773
1	2	999	HSPA8	28,030
1	2	999	HSPA8	27,765
1	2	999	HSPA8	27,403
1	2	999	HSPA8	27,110
1	2	999	HSPA8	26,931
1	2	999	HSPA8	26,702
1	2	999	HSPA8	27,209
1	2	999	HSPA8	27,806
1	2	999	HSPA8	28,716
1	2	999	HSPA8	27,578
1	2	999	HSPA8	27,173
1	2	999	HSPA8	30,821



File Edit View Data Transform Analyze Direct Marketing Graphs Utilities Add-ons Window Help



1 : Amostra

A100

	Amos	decido	Gene	Tipo_Extração	Regiao_Cerebral	Gene_Nome	Média_CTs	C	
1	A100	1	2	2	999	HSPA8	28,8750		
2	A103	1	2	2	999	HSPA8	28,2565		
3	A105	1	2	2	999	HSPA8	27,2376		
4	A107							0874	
5	A110							9030	
6	A115							3628	
7	A116							1164	
8	A120							4244	
9	A121							3491	
10	A127							4196	
11	A128							7736	
12	A137							0304	
13	A138							7657	
14	A139							4031	
15	A140	72	2	1				1107	
16	A141	73	1	1				9312	
17	A142	68	2	1				7020	
18	A143	89	1	1				2099	
19	A144	84	2	1					
20	A145	72	1	1	1	2	999	HSPA8	27,8061
21	A146	74	2	1	1	2	999	HSPA8	28,7165
22	A147	85	1	1	1	2	999	HSPA8	27,5788
23	A148	75	1	1	1	2	999	HSPA8	27,1737
									30,8218

Explore: Plots

Boxplots

☒ Factor levels together

☐ Dependents together

☐ None

☒ Stem-and-leaf

☒ Histogram

Normality plots with tests

☒ Spread vs Level with Levene Test

☐ None

☐ Power estimation

☐ Transformed Power: Natural log

☐ Untransformed

Continue

Cancel

Help

Explore

Dependent List:

dois\_DCT

Factor List:

Label Cases by:

Display

☒ Both

☐ Statistics

☐ Plots

OK

Paste

Reset

Cancel

Help

**Explore: Plots**

**Boxplots**

- ☒ Factor levels together
- ☐ Dependents together
- ☐ None

**Descriptive**

- ☒ Stem-and-leaf
- ☒ Histogram

☒ Normality plots with tests

**Spread vs Level with Levene Test**

- ☐ None
- ☐ Power estimation
- ☐ Transformed Power: Natural log
- ☐ Untransformed

Continue Cancel Help

**Explore**

**Dependent List:** dois\_DCT

**Factor List:**

**Label Cases by:**

**Display**

- ☒ Both
- ☐ Statistics
- ☐ Plots

OK Paste Reset Cancel Help

Statistics... Plots... Options... Bootstrap...

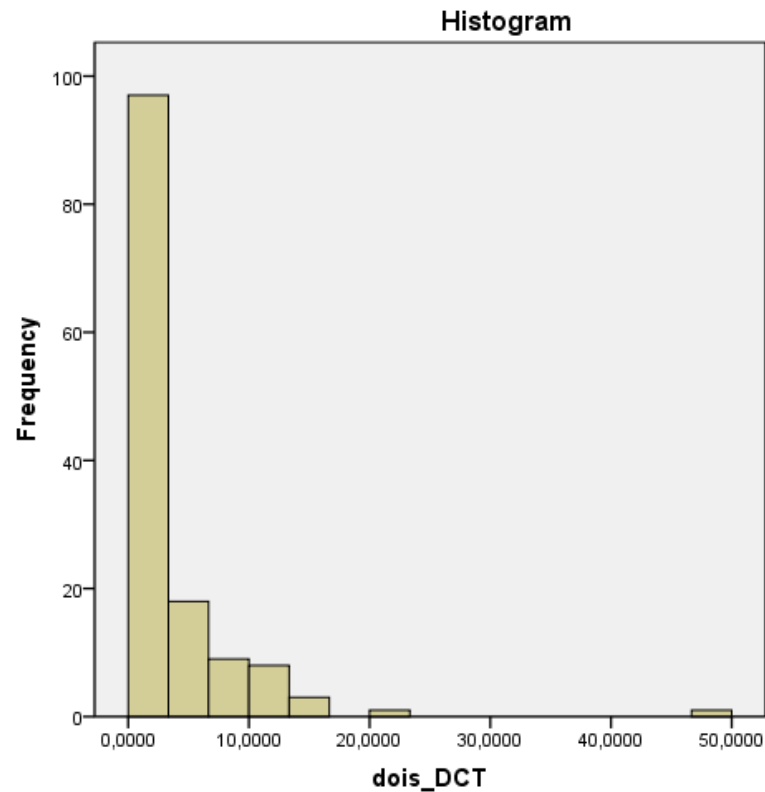


# Distribuição

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
dois_DCT	,274	137	,000	,559	137	,000

a. Lilliefors Significance Correction





File Edit View Data Transform Analyze Direct Marketing Graphs Utilities Add-ons Window Help



1: dois\_DCT 1,2643

	po	Tecido	G
1	1	1	
2	1	1	
3	1	1	
4	1	1	
5	1	1	
6	1	1	
7	1	1	
8	1	1	
9	1	1	
10	1	1	
11	1	1	
12	1	1	
13	1	1	
14	1	1	
15	1	1	
16	1	1	
17	1	1	
18	1	1	
19	1	1	
20	1	1	
21	1	1	2
22	1	1	2
23	1	1	2

- Reports
- Descriptive Statistics
- Tables
- Compare Means
- General Linear Model
- Generalized Linear Models
- Mixed Models
- Correlate
- Regression
- Loglinear
- Neural Networks
- Classify
- Dimension Reduction
- Scale
- Nonparametric Tests
- Forecasting
- Survival
- Multiple Response
- Missing Value Analysis...
- Multiple Imputation
- Complex Samples
- Quality Control
- ROC Curve...

- Frequencies...
- Descriptives...

- Explore...
- Crosstabs...
- Ratio...
- P-P Plots...
- Q-Q Plots...

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

999 HSPA8

Media_CTs	Ct_B_Actina	DCt	dois_DCT	sangu
28,8750	28,5367	,3383	1,2643	
28,2565	27,7403	,5161	1,4301	
27,2376	27,0597	,1779	1,1313	
26,0874	27,5968	-1,5094	,3512	
27,9030	28,7008	-,7978	,5752	
28,3628	29,1938	-,8310	,5622	
29,1164	28,3979	,7185	1,6455	
26,4244	25,8127	,6117	1,5281	
26,3491	27,9729	-1,6238	,3245	
27,4196	28,3757	-,9561	,5155	
27,7736	27,1956	,5781	1,4928	
28,0304	26,4956	1,5348	2,8975	
27,7657	27,9710	-,2053	,8673	
27,4031	27,0410	,3621	1,2853	
27,1107	26,6239	,4868	1,4013	
26,9312	26,7134	,2177	1,1629	
26,7020	27,9439	-1,2419	,4228	
27,2099	27,9723	-,7625	,5895	
27,8061	27,3492	,4570	1,3726	
28,7165	28,5972	,1193	1,0862	
27,5788	25,7370	1,8417	3,5844	
27,1737	27,8417	-,6680	,6294	
30,8218	31,5305	-,7087	,6119	

1

Data View Variable View

Descriptives...

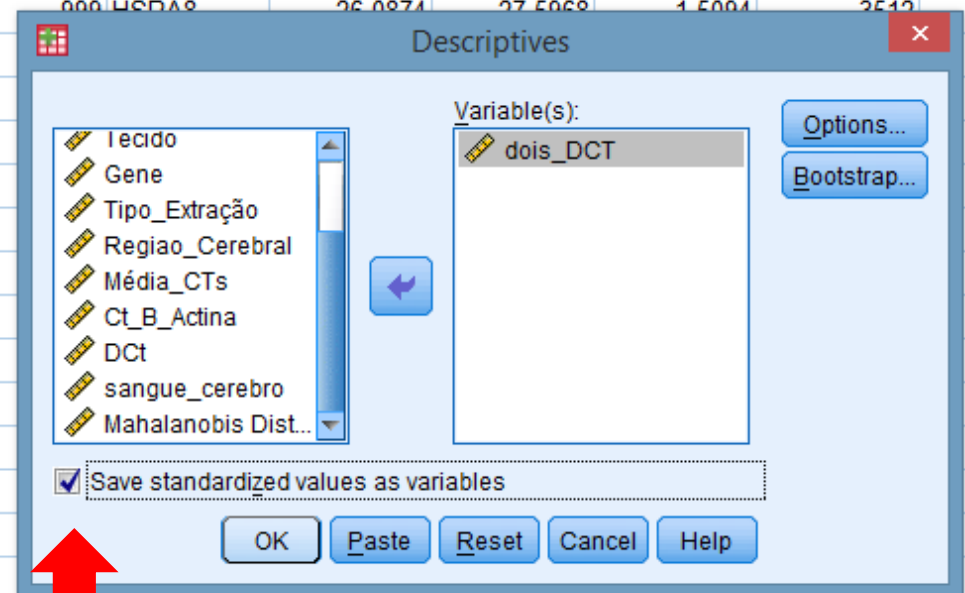


File Edit View Data Transform Analyze Direct Marketing Graphs Utilities Add-ons Window Help



1: dois\_DCT 1,2643

	po	Tecido	Gene	Tipo_Extração	Regiao_Cerebral	Gene_Nome	Média_CTs	Ct_B_Actina	DCt	dois_DCT	sangue
1	1	1	2	2	999	HSPA8	28,8750	28,5367	,3383	1,2643	
2	1	1	2	2	999	HSPA8	28,2565	27,7403	,5161	1,4301	
3	1	1	2	2	999	HSPA8	27,2376	27,0597	,1779	1,1313	
4	1	1	2	2	999	HSPA8	26,0874	27,5068	1,5004	2,512	
5	1	1	2	2							
6	1	1	2	2							
7	1	1	2	2							
8	1	1	2	2							
9	1	1	2	2							
10	1	1	2	2							
11	1	1	2	2							
12	1	1	2	2							
13	1	1	2	2							
14	1	1	2	2							
15	1	1	2	2							
16	1	1	2	2							
17	1	1	2	2							
18	1	1	2	2	999	HSPA8	27,2099	27,9723	-,7625	,5895	
19	1	1	2	2	999	HSPA8	27,8061	27,3492	,4570	1,3726	
20	1	1	2	2	999	HSPA8	28,7165	28,5972	,1193	1,0862	
21	1	1	2	2	999	HSPA8	27,5788	25,7370	1,8417	3,5844	
22	1	1	2	2	999	HSPA8	27,1737	27,8417	-,6680	,6294	
23	1	1	2	2	999	HSPA8	30,8218	31,5305	-,7087	,6119	





1: Zdois\_DCT -38960439669266 Visible: 15 of 23

	Grupo	Tecido	Gene	Tipo_Extração	Regiao_Cerebral	Gene_Nome	Média_CTs	Ct_B_Actina	DCt	dois_DCT	sa	Zdois_DCT	va
1	2	1	1	2	2	999 HSPA8	28,8750	28,5367	,3383	1,2643	4	-,38960	
2	2	1	1	2	2	999 HSPA8	28,2565	27,7403	,5161	1,4301	4	-,35944	
3	1	1	1	2	2	999 HSPA8	27,2376	27,0597	,1779	1,1313	4	-,41380	
4	2	1	1	2	2	999 HSPA8	26,0874	27,5968	-1,5094	,3512	4	-,55572	
5	2	1	1	2	2	999 HSPA8	27,9030	28,7008	-,7978	,5752	4	-,51497	
6	2	1	1	2	2	999 HSPA8	28,3628	29,1938	-,8310	,5622	4	-,51733	
7	2	1	1	2	2	999 HSPA8	29,1164	28,3979	,7185	1,6455	4	-,32026	
8	2	1	1	2	2	999 HSPA8	26,4244	25,8127	,6117	1,5281	4	-,34161	
9	2	1	1	2	2	999 HSPA8	26,3491	27,9729	-1,6238	,3245	4	-,56058	
10	1	1	1	2	2	999 HSPA8	27,4196	28,3757	-,9561	,5155	4	-,52583	
11	2	1	1	2	2	999 HSPA8	27,7736	27,1956	,5781	1,4928	4	-,34804	
12	2	1	1	2	2	999 HSPA8	28,0304	26,4956	1,5348	2,8975	4	-,09249	
13	2	1	1	2	2	999 HSPA8	27,7657	27,9710	-,2053	,8673	4	-,46183	
14	1	1	1	2	2	999 HSPA8	27,4031	27,0410	,3621	1,2853	4	-,38578	
15	2	1	1	2	2	999 HSPA8	27,1107	26,6239	,4868	1,4013	4	-,36468	
16	1	1	1	2	2	999 HSPA8	26,9312	26,7134	,2177	1,1629	4	-,40805	
17	2	1	1	2	2	999 HSPA8	26,7020	27,9439	-1,2419	,4228	4	-,54269	
18	1	1	1	2	2	999 HSPA8	27,2099	27,9723	-,7625	,5895	4	-,51237	
19	2	1	1	2	2	999 HSPA8	27,8061	27,3492	,4570	1,3726	4	-,36990	
20	1	1	1	2	2	999 HSPA8	28,7165	28,5972	,1193	1,0862	4	-,42200	
21	2	1	1	2	2	999 HSPA8	27,5788	25,7370	1,8417	3,5844	4	,03247	
22	1	1	1	2	2	999 HSPA8	27,1737	27,8417	-,6680	,6294	4	-,50511	
23	1	1	1	2	2	999 HSPA8	30,8218	31,5305	-,7087	,6119	4	-,50829	

# *Outliers*

