

Manual de instruções

RGeasy

Sumário

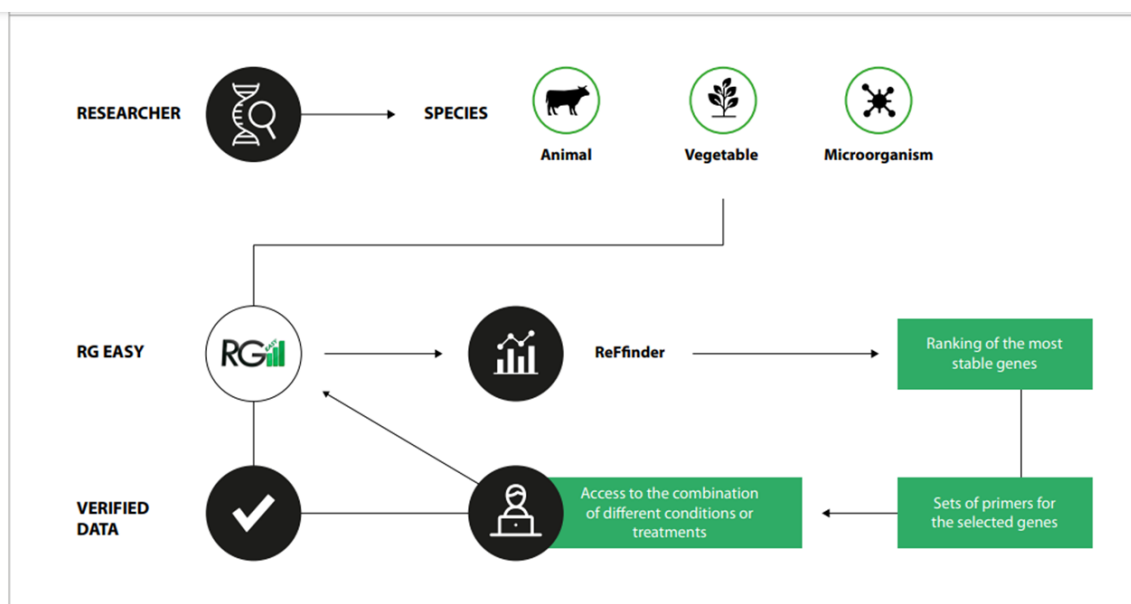
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 Cadastro.....	3
3 Acesso ao banco de dados.....	3
Figura 8. Citação para usuário do RGeasy.....	6
4 Registro de Novas Espécies.....	6
4.1 Registro de uma única espécie.....	6
4.2 Registro de mais de uma espécie.....	9

1 INTRODUÇÃO

Bem-vindo ao RGeasy!

Este manual é um guia tanto para pesquisadores que buscam genes de referência validados para análise de expressão gênica via RT-qPCR, como para aqueles que desejam registrar espécies (animal, vegetal e microorganismo) utilizadas em seus estudos de validação de genes de referência (Figura 1). Por meio do uso desta ferramenta, o acesso e o desenvolvimento da pesquisa são simplificados, por proporcionar maior divulgação de dados, reduzir o uso de recursos financeiros e diminuir o tempo necessário para o desenvolvimento de cada estudo. Além disso, devido a maior visibilidade dos estudos cadastrados no RGeasy, os mesmos poderão ser mais citados do que o usualmente, como explanado no decorrer do manual.

Figura 1- Manutenção e fluxo de trabalho do RGeasy. A partir do cadastro de espécies de animais, vegetais ou microrganismos, os pesquisadores disponibilizam para o RGeasy dados como os valores de Cq's que são imediatamente verificados. A partir daí é disponibilizado ao público todas as combinações de condições/tratamentos possíveis para cada estudo. A nova combinação de tratamentos é ranqueada pelo ReFfinder (XIE et al., 2012), e o RGeasy fornece além do ranking com os genes de referência, um conjunto de *primers* validados para cada gene.



2 Cadastro

Ao acessar a página do RGeasy o pesquisador deverá realizar seu cadastro como indicado abaixo (Figura 2).

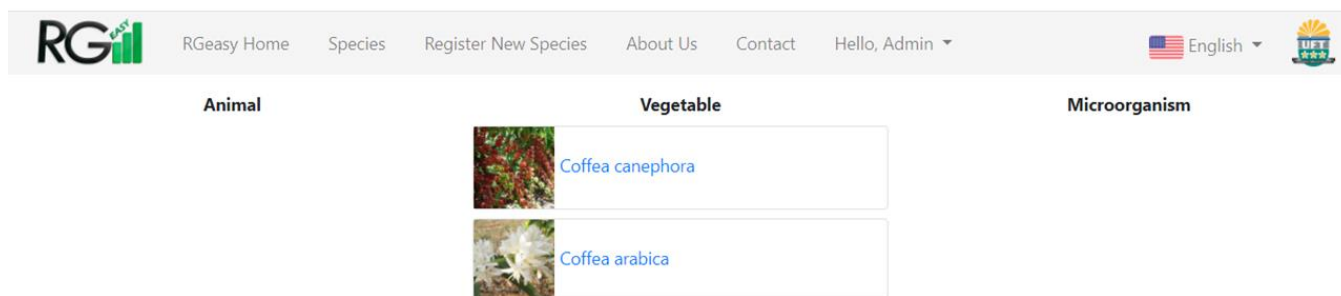
Figura 2. Cadastro do usuário na ferramenta RGeasy.

3 Acesso ao banco de dados

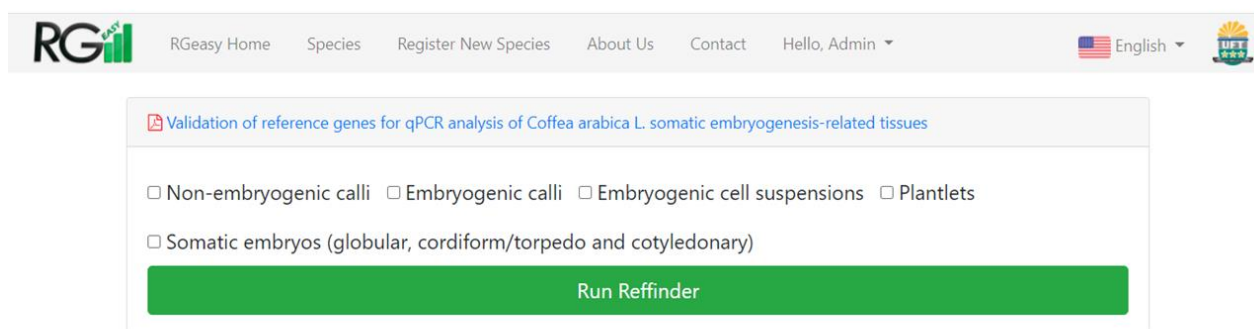
Após o login (Figura 3) o usuário tem acesso às espécies registradas, clicando em “Species” na barra de navegação localizada na parte superior.

Figura 3. Login do usuário

As espécies são separadas em três categorias: Animal, Vegetal e Microrganismo (Figura 4). Ao clicar na espécie de interesse, é exibido automaticamente todos os estudos de validação de genes de referência cadastrados. Nessa interface, o usuário tem acesso a cada estudo clicando em seu nome, e abaixo de cada artigo são exibidas as amostras analisadas.

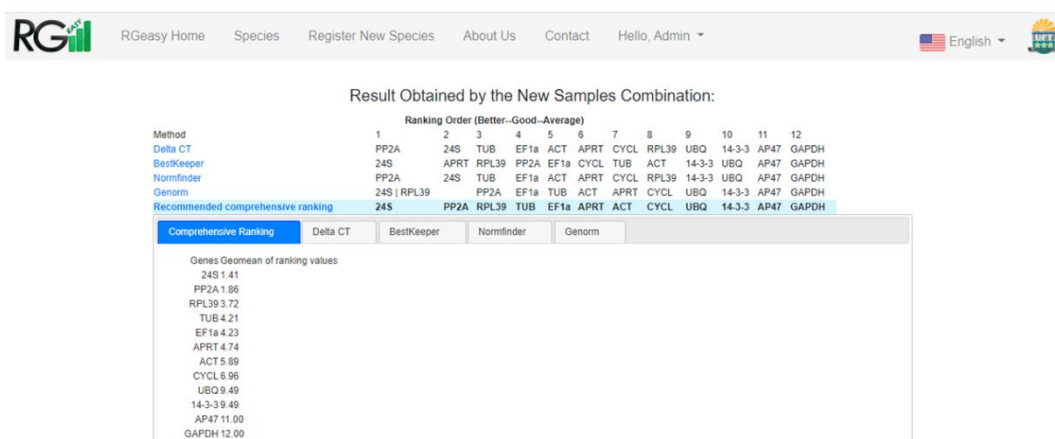
Figura 4. Categorias de espécies.

Para definir a combinação de tratamentos ou condições desejadas, o usuário deve selecionar as amostras de interesse, clicando no ícone ao lado destas (Figura 5). O resultado é exibido instantaneamente, ao se clicar em “Run RefFinder”.

Figura 5. Amostras analisadas no estudo intitulado “Validation of reference genes for qPCR analysis of Coffea arabica L. somatic embryogenesis-related tissues” de Freitas et al. (2017).

Como o RGeasy emprega a ferramenta do RefFinder para análise de estabilidade dos genes de referência, na página de resultados é gerado uma tabela com o ranking dos genes segundo os algoritmos: Delta CT, Bestkeeper, Normfinder, Genorm e por fim RefFinder, e abaixo é disponibilizado também um gráfico referente a cada algoritmo (Figura 6).

Figura 6. Resultado gerado no RGeasy para pool de amostras analisadas por Freitas et al. (2017).



Ainda na página dos resultados, o RGeasy fornece um quadro com informações gerais para cada um dos genes, de acordo com o ranking de estabilidade fornecido pelo RefFinder. Para cada gene é disponibilizado o par de *primers*, o coeficiente de correlação (R^2), eficiência (e^*), número de acesso e o banco em que a sequência foi selecionada (Figura 7).

Figura 7. Informações gerais de cada gene disponibilizado pelo RGeasy.

General Information About the Genes:							
Gene: UBQ			Gene: PSAB				
Primer Sequence (Forward)		Primer Sequence (Reverse)		Primer Sequence (Forward)		Primer Sequence (Reverse)	
TTTCCTGGCGTGGGTATTG		CGGGTTTATCTCTCCAACGAAT		TTTCCTGGCGTGGGTATTG		CGGGTTTATCTCTCCAACGAAT	
R2	e*	Accession n		R2	e*	Accession n	
0.99276	95.0	DV686961.1		0.9923	92.0	GT648763.1	
Bank				Bank			
GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI)				GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI)			

Ao selecionar genes de referência utilizando a ferramenta RGeasy é essencial que seja incluído no material e métodos a informação que consta ao final da página dos resultados. Esta informação é gerada de acordo com a pesquisa selecionada (Figura 8).

Figura 8. Citação para usuário do RGeasy.

How to Cite

The RGeasy tool (citation soon) was used for the selection of reference genes through a new combination of treatments, obtained from the study developed by FREITAS et al (2017), ranked by the RefFinder (XIE et al., 2012) tool.

References:

- [Reffinder](#)
- [Reference Genes Easy](#)
- [Validation of reference genes for qPCR analysis of Coffea arabica L. somatic embryogenesis-related tissues](#)

4 Registro de Novas Espécies

Após o login (Figura 3), é possível realizar o registro de novas espécies como descrito a seguir.

4.1 Registro de uma única espécie

A espécie deve ser cadastrada por meio do nome científico (Figura 9).

Figura 9. Registro de uma nova espécie.

Ao preencher cada campo não use “Enter” pois a ferramenta entenderá que deve automaticamente gerar a tabela, e como todos os campos ainda não estarão preenchidos, resultará em um erro como indicado na figura 10.

Figura 10. Erro gerado devido aos campos em branco no momento do registro.

O nome de todos os autores do artigo deve ser inserido no campo “Authors” e devem ser separados exclusivamente por vírgula, não podendo ser empregado pontuações como “; : .” ou o sinal “&” (Figura 11).

Figura 11. Preenchimento do campo “Authors”.

RG Home Species **Register New Species** About Us Contact Hello, Admin

Add the Species Here:

Coffea arabica x

Article: Validation of reference genes for qPCR analysis of Coffea arabica L. somatic embryoger DOI: 10.1007/s11240-016-1147-6 Year: 2017

Authors
Natália Chagas Freitas, Horllys Gomes Barreto, Christiane Noronha Fernandes-Brum, Rafael Oliveira Moreira, Antonio Chalfun-Junior, Luciano Vilela Paiva

Posteriormente ao preenchimento de todos os campos solicitados (Figura 12) será gerado uma tabela, que permite que os dados sejam editados caso necessário.

Figura 12. Registro de uma nova espécie.

RG Home Species **Register New Species** About Us Contact Hello, Admin

Add the Species Here:

Coffea arabica x

Article: Validation of reference genes for qPCR analysis of Coffea arabica L. somatic embryoger DOI: 10.1007/s11240-016-1147-6 Year: 2017

Authors
Natália Chagas Freitas, Horllys Gomes Barreto, Christiane Noronha Fernandes-Brum, Rafael Oliveira Moreira, Antonio Chalfun-Junior, Luciano Vilela Paiva

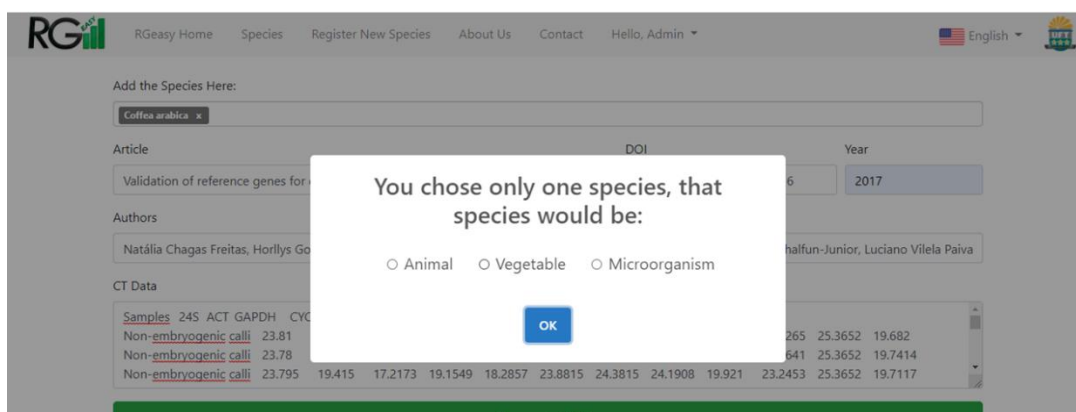
CT Data

Samples	24S	ACT	GAPDH	CYCL	EF1aTUB	PP2A	AP47	RPL39	APRT	UBQ14-3-3
Non-embryogenic calli	23.81	19.41	17.2173	19.1452	18.2951	23.8537	24.3669	24.181	19.9301	23.2265 25.3652 19.682
Non-embryogenic calli	23.78	19.42	17.2173	19.1647	18.2763	23.9093	24.3962	24.2006	19.912	23.2641 25.3652 19.7414
Non-embryogenic calli	23.795	19.415	17.2173	19.1549	18.2857	23.8815	24.3815	24.1908	19.921	23.2453 25.3652 19.7117

Generate Table

Ao clicar em “Generate table” (Figura 12) é exibido um pop-up onde deve ser selecionada a categoria em que a espécie cadastrada se enquadra (Animal, vegetal ou microrganismo) (Figura 13).

Figura 13. Pop-up com as diferentes categorias do RGeasy.



Abaixo da tabela com os valores de Cq's, é solicitado a descrição de cada gene candidato a gene de referência analisado (Figura 14). Estas informações devem ser preenchidas cuidadosamente, pois serão disponibilizadas para os usuários do RGeasy.

Figura 14. Descrição de candidatos a genes de referência.

Gene: **14-3-3** Vegetable ▾

Coffea canephora ▾

Primer Sequence (Forward)

Primer Sequence (Reverse)

R2

e*

Accession

Bank

Gene: **RPL7** Vegetable ▾

Coffea canephora ▾

Primer Sequence (Forward)

Primer Sequence (Reverse)

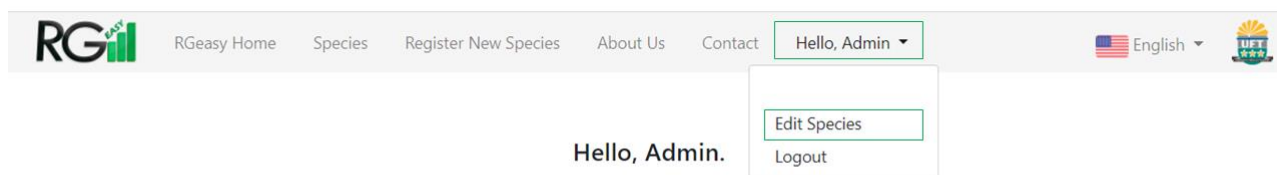
R2

e*

Accession

Bank

Para finalizar o registro da espécie, basta clicar em “Generate” após o preenchimento de todos os dados. A partir daí a espécie está registrada, e solicitamos que ao encerrar o registro, o usuário disponibilize uma imagem no formato **quadrado** que melhor represente a espécie registrada. Para isso o mesmo deve acessar a barra de navegação como indicado na figura abaixo, e editar a espécie (Figura 15). A espécie será disponibilizada aos usuários após a verificação feita pelo administrador do RGeasy.

Figura 15. Upload da imagem da espécie registrada.

4.2 Registro de mais de uma espécie

Se o estudo analisar a estabilidade do mesmo conjunto de genes para mais de uma espécie, estas podem ser registradas por meio de um único cadastro (Figura 16). Contudo, se houver um conjunto de genes específicos para cada espécie, as espécies devem ser registradas separadamente. Assim o artigo deverá ser cadastrado mais de uma vez.

Figura 16. Registro de duas espécies.

 The figure consists of two screenshots of the 'Register New Species' form. The top screenshot shows the form with one species, 'Coffea arabica', entered in the 'Add the Species Here:' field. The bottom screenshot shows the same form with two species, 'Coffea arabica' and 'Coffea canephora', entered in the same field, separated by a comma. Both screenshots show the 'Article', 'DOI' (10.1007/s11240-016-1147-6), and 'Year' (2015) fields, along with an 'Authors' field.

O nome científico de cada uma das espécies deve ser separado por vírgula (Figura 16) e na identificação das amostras deve constar o nome da espécie a que se refere (Figura 17). Nesse caso, é essencial que as amostras sejam identificadas com o nome da espécie, para que a ferramenta consiga diferenciar os tecidos, pois se os nomes dos tecidos forem idênticos para todas as espécies em um único cadastro, a ferramenta reconhecerá as amostras como apenas uma.

Figura 17. Exemplo de identificação das amostras para estudos com mais de uma espécie em um único cadastro.

CT Data

Tissue	14-3-3	RPL7	PSAB	ACTINA	DMXT	GAPDH	ADH2	UBQ
C. canephora Root	18.83401129	22.34721738	18.9538811	22.27552175	22.09	21.15589526	22.48976486	19.22130877
C. canephora Root	18.79161145	22.25786822	19.06681386	22.19844382	21.99	21.17575063	22.34972896	19.24057826
C. canephora Root	18.80009142	22.36707275	18.99152535	22.28515649	22.23	21.29488284	22.56445067	19.05751817

CT Data

Tissue	14-3-3	RPL7	PSAB	ACTINA	DMXT	GAPDH	ADH2	UBQ
C. canephora	18.83401129	22.34721738	18.9538811	22.27552175	22.09	21.15589526	22.48976486	19.22130877
C. canephora	18.79161145	22.25786822	19.06681386	22.19844382	21.99	21.17575063	22.34972896	19.24057826
C. canephora	18.80009142	22.36707275	18.99152535	22.28515649	22.23	21.29488284	22.56445067	19.05751817

Abaixo da tabela com os dados de Cq's é solicitado a descrição de cada gene candidato a gene de referência analisado, semelhante ao registro de uma única espécie (Figura 14).